



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Departamento de Ciências da Biointeração**  
**Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

**ROBERTA SANTORO DE MAGALHÃES**

Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo

**Salvador-BA**

**2014**

**ROBERTA SANTORO DE MAGALHÃES**

Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

**Salvador – BA  
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

M188 Magalhães, Roberta Santoro de

Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo / Roberta Santoro de Magalhães. – Salvador, 2014.

59 f.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Biotecnologia. 2. Bactérias. 3. Sulfato. 4. *Souring*. 5. Água. I. Chinalia, Fábio Alexandre. II Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 614.8

**ROBERTA SANTORO DE MAGALHÃES**

**ESTUDO DE BACTÉRIAS COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ORIUNDAS DE AMOSTRAS  
DE ÁGUA PRODUZIDA DE POÇOS DE PETRÓLEO**

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

Aprovada em 10 de fevereiro de 2014.

Fábio Alexandre Chinalia – Orientador \_\_\_\_\_  
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,  
U.ABERDEEN, Escócia  
Universidade Federal da Bahia

Paulo Fernando de Almeida – Co-orientador \_\_\_\_\_  
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade de Campinas,  
UNICAMP, Brasil  
Universidade Federal da Bahia

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

Edgard Basic de Carvalho  
Doutor em Engenharia Química The Pennsylvania State University,  
PSU, Estados Unidos.  
Universidade Salvador

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente sempre em minha vida.

Aos meus pais, Haroldo e Maria Inês, pela confiança, carinho, companheirismo e por acreditar em mim durante os momentos mais adversos. Aos meus irmãos, Rodrigo e Renata, que sempre estiveram ao meu lado ao longo dessa caminhada torcendo. A minha avó Odete que sempre esteve rezando por mim. Aos meus padrinhos Cecília e Osvaldo por todo apoio, incentivo e carinho. A toda a minha família por todo o amor, apoio e carinho,

Ao meu orientador Professor Doutor Fabio Chinalia pela credibilidade depositada, pelo apoio intelectual e profissional, pela amizade, pelos conselhos e por ter acreditado na concretização desse trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Paulo Almeida por todos os ensinamentos e por me receber no LABEM.

A Professora Doutora Josilene Lima por todos ensinamentos, apoio e compreensão.

A minha amiga Sueli pelo companheirismo, ajuda, ensinamentos, amizade, paciência e carinho.

Ao meu namorado Diego.

A minha amiga Mariana por todo incentivo.

A minha amiga Michele por todo apoio e ensinamento. A minha amiga Adriana por todo carinho, incentivo e companheirismos. A minha companheira de laboratório Patrícia por todo o ensinamento e paciência. Aos meus amigos de laboratório Diego e Igor pela ajuda nos experimentos, ensinamentos e muito trabalho. A Leila por toda ajuda e paciência.

Aos amigos, alunos e funcionários do LABEM: Edmundo, Aline, Paula, Brisa, Luiz, Rodrigo, Elderlei, Amanda, Jorge, Joalene, Cátia, Jacson, Betânia, Igor, Camila, Lidiane e Gabriele. Obrigado pelo apoio, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Brena, Aldinéia, Luiza, Diana, Jamile e Hendor por toda ajuda e companheirismos sempre.

A FABESB pela concessão da bolsa.

MAGALHÃES, Roberta Santoro de. Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo. 59 f. il.2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

A fase de recuperação secundária do petróleo é caracterizada por processos que objetivam restaurar a pressão interna do reservatório para assim aumentar a produtividade da jazida. Em poços distantes do continente, a água do mar, que contém cerca de 0,3% de sulfato, é comumente injetada para realizar esse processo. Portanto, estes reservatórios ficam sujeitos ao crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que produzem sulfeto causando assim grandes prejuízos a indústria petroquímica. O processo de corrosão causado pela produção de sulfeto é conhecido como *souring*. Uma das formas de controlar o *souring* é a adição de biocidas (glutaraldeído e tetrakis(hidroximetil) fosfônio sulfato (THPS), mas estes tem um potencial de gerar um significativo impacto ambiental. Acredita-se que o controle biológico seja menos impactante por se utilizar de agentes microbianos para controlar o crescimento de BRS através de processos como biocompetição. O nitrato tem sido utilizado com a intenção de estimular tal biocompetição, mas, a complexidade das interações ecofisiológicas microbianas dificultam o sucesso dessa prática. O objetivo deste trabalho, portanto, foi o de avaliar os fatores relacionados com o controle de BRS *in situ* através (i) o uso de nitrato como agente regulador da sulfetogênese e (ii) a produção potencial de inibidores metabólicos pelos organismos desnitrificantes. Para esse trabalho foram isoladas 80 cepas bacterianas de poços de petróleo localizados na Bacia do Recôncavo Baiano, sendo 30 separadas fisiologicamente e caracterizadas em desnitrificantes heterotróficos e/ou autotróficos. Apenas 02 cepas apresentaram capacidade inibitória contra BRS em teste de placas com *Desulfovibrio vulgaris*. Curvas de crescimento com *D. vulgaris* mostram que este micro-organismo produz maior biomassa na presença de nitrato. Nessa condição a adição de nitrato diminui significativamente a produção de sulfeto, mas, em contrapartida, aumenta significativamente a biomassa de BRS. Portanto o uso de nitrato é um paliativo momentâneo que futuramente pode agravar de forma considerável o *souring* por permitir o aumento da biomassa de BRS, capazes de utiliza-lo. Embora exista potencial para exclusão biocompetitiva, pouco ainda se sabe sobre as interações que controlam as atividades dessas cepas *in situ* (interações de BRS com bactérias redutoras de óxido de nitrogênio (BRON) que sejam capazes de utilizar o nitrato.

Palavras –chave: bactérias redutoras de sulfato, *souring* e água produzida

MAGALHÃES, Roberta Santoro de. Evaluating the effect caused by bacteria capable of producing an antagonist substance towards the activity of sulphate-reducing strains found in mature oil wells. 59 f. il.2014. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Secondary oil recovery strategy aims to restore by secondary means the internal pressure of the rock formation and therefore enhancing oil recovery yields. For rock formations located offshore injection of seawater rich in sulphate (0.3 %) is often used for this purpose. In this way, such oil wells are easily subjected to the activity of sulphate reducing bacteria (SRB) causing the accumulation of sulphide which is the source of corrosion. The corrosive process caused by sulphide is known as “souring”. There have been several attempts for controlling souring such as the addition of biocides in the injected seawater (glutaraldehyde and tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS)), however, these approaches can generate considerable environmental damage. Biological control is believed to generate less environmental impact for it control BRS growth through less harmful ecological processes such as bioexclusion. Nitrate is being used with such intent because it favours the competing denitrifying bacteria against BRS. However, the eco-physiological complexity characterizing bacterial interactions make the process difficult to achieve *in situ*. The aim of this study is to assess factors related to the *in situ* controls of BRS by (i) using nitrate as a regulating mediator and (ii) the effect of denitrifying bacteria inhibitory agents against BRS. For this purpose, 80 distinct bacterial strains were first isolated from oil wells located at the Recôncavo Baiano Basin and 30 strains were physiologically characterized as autotrophic and heterotrophic denitrifying bacteria. Only 2 strains showed to be capable of producing an inhibitory substance to *Desulfovibrio vulgaris* (BRS). In addition, growth curves characterization showed that *D vulgaris* is capable of growing using nitrate as electron acceptor. In such a condition, sulphide production decreases, but, on the other hand, it also enhances *D. vulgaris* biomass abundance. Thus, nitrate showed to work as a palliative and with such increase in BRS biomass, the souring problem may also increase significantly with the exhaustion of nitrate *in situ*. Although such biomass increase has been observed, it is expected that the denitrifying bacterial isolates found in this work may assist the process of BRS control by means of exclusion and the metabolic *in situ* use of produced sulphide by autotrophic denitrifiers capable of using nitrate.

Keywords: sulphate-reducing bacteria, souring and produced water.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- BRS - Bactérias redutoras de sulfato
- THPS – Tetrakis (hidroximetil) fosfônio sulfato
- BRON - Bactérias redutoras de óxido de nitrogênio
- BD-A - Bactérias desnitrificantes autotróficas
- BD-H - Bactérias desnitrificantes heterotróficas
- AP - Água produzida
- CMI - Corrosão microbiologicamente induzida
- NMP - Número mais provável
- Dsra – Enzima sulfito redutase



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01:	Esquema exemplificando o processo de recuperação secundária com injeção de água.....	16
Figura 02:	Esquema dos mecanismos de inibição da corrosão por bactérias.....	24
Figura 03:	Esquema dos mecanismos de inibição da corrosão por agentes antimicrobianos .....	24
Figura 04:	Frascos mostrando o aspecto dos meios de cultura seletivos para o isolamento de BRON (caldo nutriente, sulfeto – oxidante e tiosulfato- oxidante).....	29
Figura 05:	Tubos de ensaio contendo meio CSB dos poços A e B, respectivamente.....	34
Figura 06:	Tubos de ensaio contendo meio Postgate e amostras de AP dos poços A e B respectivamente.....	35
Figura 07:	Teste de halo com a cepa <i>Halomonas aquamarina</i> contra a cepa <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .....	37
Figura 08:	Teste de halo com a cepa <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> contra a cepa <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .....	38
Figura 09:	Análise filogenética das duas cepas de BRON isoladas nesse trabalho e depositadas no NCBI número de acesso KF824855 e KF824854 para LABEM001 e 2 respectivamente. A árvore filogenética foi construída usando neighbour-Joining e Kimura 2-parâmetros com bootstraps de 100 repetições em evidência na árvore .....	40
Figura 10:	Cinética de crescimento <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (●) densidade ótica e (□) densidade de bactéria cel mL <sup>-1</sup> .....	41
Figura 11:	Cinética de crescimento de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> em: (■) 3000 mg L <sup>-1</sup> Sulfato ; (▼) 3000 mg L <sup>-1</sup> Sulfato + 320 mg L <sup>-1</sup> Cloreto de sódio mg L <sup>-1</sup> , respectivamente ; (Δ) 3000 mg L <sup>-1</sup> Sulfato + 320 mg L <sup>-1</sup> Nitrato, respectivamente e (○) 320 mg L <sup>-1</sup> Nitrato.....	43
Figura 12:	Cinética de crescimento da <i>Halomonas aquamarina</i> no meio sulfeto oxidante a 38°C.....	45
Figura 13:	Esse esquema discute a competição por compostos orgânicos/Inibição com o aumento do potencial redox entre BRON-H e BRS.....	50
Figura 14:	Esse esquema exemplifica a associação entre BRON-A e BRS.....	50
Figura 15:	Esse esquema mostra a relação de favorecimento entre BRON-A e BRS.....	51
Tabela 1:	Características das amostras dos poços A e B dos campos de petróleo, que foram amostrados durante o estudo.....	34
Tabela 2:	Cepas de bactérias redutoras de nitrato isoladas em grupos	

	fisiológicos distintos.....	36
Tabela 3:	A atividade inibidora de <i>Halomonas aquamarina</i> em teste de inibição em placa contra a <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .....	37
Tabela 4:	A atividade inibidora de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> em teste de inibição em placa contra a <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .....	38
Tabela 5:	Parâmetros cinéticos comparando o crescimento de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> em três condições distintas de aceptores de elétrons.....	44

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1	RECUPERAÇÃO SECUNDÁRIA DO PETRÓLEO E O DESENVOLVIMENTO DE <i>SOURING</i> .....	16
3.2	<i>SOURING</i> E CORROSÃO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDA (CMI) .....	17
3.2.1	<i>Souring</i> .....	17
3.2.2	<b>Corrosão microbiologicamente induzida (CMI)</b> .....	17
3.3	CONTROLE DO <i>SOURING</i> .....	19
3.3.1	<b>Sobre a injeção de nitrato</b> .....	19
3.3.2	<b>Exemplos de estudos de caso da adição de nitrato para o controle do <i>souring</i> em poços de petróleo</b> .....	20
3.4	COMPETIÇÃO ENTRE BRON E BRS POR FONTES DE CARBONO.....	22
3.5	MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA CORROSÃO ATRAVÉS DO USO DE OUTRAS BACTÉRIAS E PELA PRODUÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	23
3.6	ALGUNS FATORES RELACIONADOS À SUBSTITUIÇÃO DO ACCEPTOR FINAL DE ELÉTRONS POR BRS.....	25
3.7	LISTAGEM DAS LIMITAÇÕES DO USO DE NITRATO PARA CONTROLE DE <i>SOURING</i> .....	25
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS - TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL.....	27
4.1.1	<b>Sobre os micro-organismos</b> .....	28
4.1.2	<b>Meios de cultura para NMP e curva de crescimento</b> .....	28
4.2	ISOLAMENTO DE CEPAS MICROBIANAS E SEPARAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM GRUPOS FISIOLÓGICOS DISTINTOS .....	29
4.2.1	<b>Composições dos meios e preparação dos frascos de incubação em atmosfera anaeróbia</b> .....	30
4.3	TESTE DE HALO PARA DETERMINAR A EFETIVIDADE CONTRA BRS E A PRODUÇÃO BIOGÊNICA DE SULFETO .....	31

4.4	IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS .....	31
4.5	CURVAS DE CRESCIMENTO.....	32
4.5.1	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> .....	32
4.5.2	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> na presença de (1) sulfato, (2) sulfato e nitrato e (3) sulfato e cloreto de sódio e (4) nitrato.....	32
4.5.3	Curva de crescimento da <i>Halomonas aquamarina</i> e justificativa da falta de dados semelhantes para <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	33
4.6	ANÁLISE DOS DADOS .....	33
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
5.1	CONTAGEM DE BRS E BRON .....	34
5.2	RESULTADO DA SEPARAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM GRUPOS FISIOLÓGICOS DISTINTOS .....	35
5.3	TESTE DE HALO .....	36
5.4	IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS INIBIDORAS DE <i>D. VULGARIS</i> .....	39
5.5	PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO .....	41
5.5.1	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> em meio <i>Desulfovibrio</i> .....	41
5.5.2	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> em meio <i>Desulfovibrio</i> com diferentes concentrações de aceptores de elétrons .....	42
5.5.3	<i>Halomonas aquamarina</i> .....	44
5.6	ECOLOGIAS DE MICRO-ORGANISMOS DE POÇOS DE PETRÓLEO: BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO, BACTÉRIAS REDUTORAS DE ÓXIDOS DE NITROGÊNIO E METANOGÊNICAS.....	45
5.7	CARACTERIZAÇÃO E METABOLISMO DE BRON.....	47
5.8	DESCRIÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICA DO PROCESSO ANTAGONISTA ENTRE BRS E BRON .....	48
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	52
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo responde pela maior parte da energia consumida pela civilização atual. É utilizado tanto como combustível quanto matéria prima de energia não renovável, e a exploração, cada vez maior em fronteiras de difícil acesso, tais como no mar, em lâminas de água profundas e a ambientes inóspitos. Nota-se que na maioria dos reservatórios ativos já foram implementados métodos para aumentar a produção e recuperar mais petróleo das jazidas reservas do que geralmente obtidos com os métodos mais comuns de recuperação primária. Estes métodos baseiam-se principalmente com a injeção de água ou gás natural, conhecidos como recuperação secundária (MUSTAFA et al., 2003).

Para restaurar a pressão interna do reservatório *offshore* comumente injeta-se água do mar que contém cerca de 0,3% de sulfato. Este tipo de reservatório portanto, está sujeito ao crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que reduzem o sulfato a sulfeto, causando grandes prejuízos à indústria petroquímica (ANTONIO et al., 2000; DAVIDOVA et al., 2001; HUBERT et al., 2005; GONZALEZ et al., 2006; HUMBERT e VOORDOUW 2007). Em ambientes naturais, a produção de H<sub>2</sub>S biogênico indica a presença e atividade metabólica das BRS (DOLLA et al., 2006).

Apesar da maior parte da produção de H<sub>2</sub>S em oleodutos originar-se da atividade metabólica das BRS, esse gás também pode ser produzido de forma química pela dissolução dos sulfetos metálicos presentes nas rochas dos reservatórios (MOUGIN et al., 2007). Com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>S ocorre um dos fatores que geram prejuízo à indústria do petróleo, que é a corrosão do aço nos tanques de armazenamento, e a contaminação do óleo armazenado, o que altera a qualidade do produto (ANTONIO et al., 2000). O processo de corrosão de um material sob influência de micro-organismos é denominado biocorrosão ou corrosão microbiológica induzida (CMI) e na indústria petrolífera, este processo é conhecido como *souring* (VIDELLA e HERRERA, 2005 ; GIEG et al., 2011).

A indústria petrolífera sofre danos com a problemática do *souring*, tanto em operações *onshore* como *offshore*. O sulfeto gerado em sistemas aquosos pode se apresentar como S<sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>S, dependendo do pH. Uma das formas de controle do *souring* é a adição de biocidas, porém este tratamento requer que os mesmos sejam injetado com frequência e a eficiência da sua utilização é limitada devido à formação de biofilme que geralmente protege as bactérias (GIEG et al., 2011; KUMARASWAMY et al., 2011).

Atualmente tem se investido muito em estudos ecofisiológicos, ou seja, aqueles que se baseiam nos mecanismos de interação entre as atividades microbianas e seus nichos de

atuação. Ecofisiologia ou fisiologia ambiental é uma disciplina da biologia que estuda a adaptação da fisiologia dos organismos às condições ambientais. É estreitamente relacionada com a fisiologia comparada e com a fisiologia evolutiva. Estudos ecofisiológicos, portanto, centralizam-se nas atividades microbianas medidas através da quantificação dos processos metabólicos, diferente dos processos baseados na identificação e no cultivo de micro-organismos em laboratório. Como muitas bactérias não são cultiváveis em laboratório ou podem mudar suas atividades metabólicas em situação diversa, os estudos ecofisiológicos são mecanismos para tentar mensurar a real contribuição de um grupo microbiano específico para um processo biológico de interesse. Portanto, tanto o processo de produção de sulfeto por BRS quanto o efeito da inibição das mesmas pelo nitrato podem ser medidos quimicamente e as inferências sobre que micro-organismo responsabilizar é feita a partir do conhecimento da fisiologia de todo um grupo e das interações e/ou local ou “nicho” onde comumente aparece (estudo ecofisiológico). Essas pesquisas tentam desenvolver formas de prevenção e controle da corrosão causado por BRS utilizando conhecimentos sobre a fisiologia e ecologia desses grupos. Para controlar a atividade metabólica das BRS, por exemplo, são usadas algumas estratégias, tais como (i) adição de inibidores metabólicos na água de injeção (como exemplo o molibdato e o nitrato), e (ii) a aplicação de agentes biocidas (como exemplo o glutaraldeído e a adição de tetrakis (hidroximetil) fosfônio sulfato (THPS)) (TANG, *et al.*, 2009). Portanto, um método de controle da atividade das BRS de forma biológica seria a utilização de compostos que estimulam o crescimento de micro-organismos competidores como os redutores de nitrato e o molibdato (ISA e ANDERSON, 2005; KJELLERUP *et al.*, 2005, REMPEL *et al.*, 2006).

Tendo em vista a importância das Bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio (BRON) em regular o crescimento das bactérias sulfetogênicas, é conveniente estudá-las para verificar a possibilidade de desenvolver a tecnologia de bioexclusão no controle e redução da produção de gás sulfídrico (GIANGIACOMO *et al.*, 1997). Estudos no assunto mostram que o controle de micro-organismos em ecossistemas complexos como os acima citados, deve ser dirigido para manter o equilíbrio entre as populações existentes, para assim evitar a exacerbação do crescimento de micro-organismos indesejáveis além da probabilidade do aparecimento de micro-organismos resistentes às substâncias antimicrobianas, tornando-se difícil, e até mesmo impossível, o seu controle (ALMEIDA *et al.*, 2006). Algumas bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio (BRON) que estão naturalmente presentes nos poços de petróleo podem atuar

consumindo o sulfeto produzido gerando sulfato ou enxofre elementar (GADEKAR et al., 2006).

Em termos ecofisiológicos a adição de nitrato aumenta o potencial redox do ambiente anaeróbio e estimula as bactérias desnitrificantes que passam a utiliza-lo como acceptor final de elétrons. No entanto, algumas BRS também possuem a capacidade de utilizar o nitrato e por isso a estratégia de injetar essa substância nem sempre favorece a bioexclusão das BRS.

Nesses casos, uma alternativa de favorecer a bioexclusão de BRS usando nitrato seria através da estimulação de bactérias desnitrificantes (reduzoras de óxido de nitrogênio) capazes de produzir compostos bioativos para inibir o crescimento de BRS. No entanto, pouco ainda se sabe da presença potencial desses micro-organismos *in situ*.

Mediante tais perspectivas torna-se necessário pesquisar as estratégias alternativas de controle da bio-sulfetogênese que explorem a própria microbiota autóctone dos poços de petróleo. Portanto, essa pesquisa vale-se dos processos metabólicos pelos quais vários micro-organismos podem afetar o crescimento e desenvolvimento das BRS. Essa questão científica é pouco discutida e este conhecimento adquirido permite novas possibilidades para o meio técnico-científico. Essa pesquisa oferece suporte ao desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de BRS em reservatório de petróleo, visando uma tecnologia mais limpa e de baixo custo. Pretende-se que essa pesquisa venha auxiliar na substituição do uso de produtos químicos para controlar BRS como os atualmente utilizados pelas indústrias petrolíferas. Dessa maneira economizando em produtos químicos que são utilizados na indústria petroquímica, pois atualmente o prejuízo causado pela corrosão metálica à indústria petrolífera é consideravelmente elevado.

## 2 OBJETIVO GERAL

- Quantificar a resposta de BRS (*Desulfovibrio vulgaris*) a adição de nitrato e isolar bactérias redutoras de nitrato, que já estão presentes na água de produção, e que são capazes de inibir o crescimento de BRS visando à aplicação *in situ*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e isolar bactérias redutoras de nitrato presentes na água produzida;
- Cultivar os micro-organismos isolados em diferentes condições nutricionais para favorecer a síntese de agentes antimicrobianos;
- Avaliar a efetividade das bactérias redutoras de nitrato isoladas de poços de petróleo contras as BRS;
- Identificar os isolados bacterianos obtidos;
- Quantificar e comparar o crescimento da BRS (*Desulfovibrio vulgaris*) na presença de nitrato e sulfato.



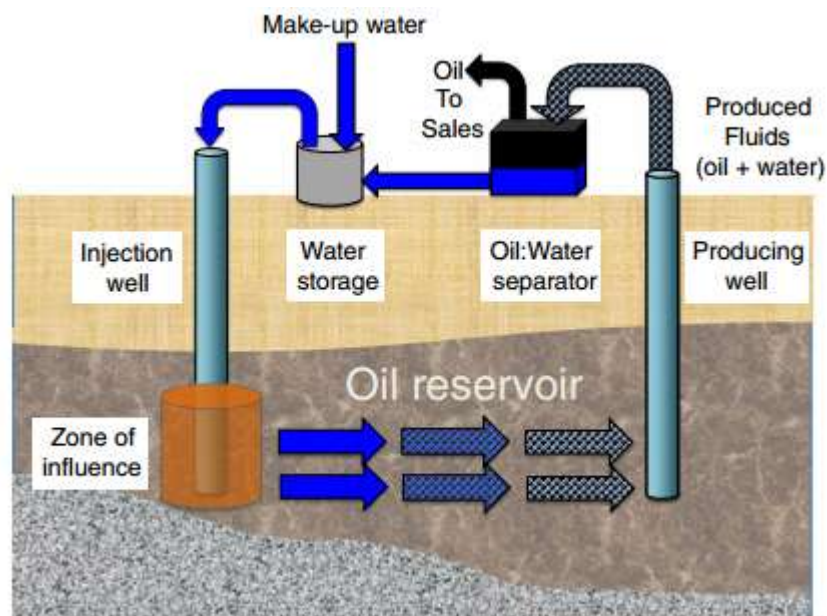
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 RECUPERAÇÃO SECUNDÁRIA DO PETRÓLEO E O DESENVOLVIMENTO DE *SOURING*

A recuperação secundária é o processo no qual a água do mar é injetada e assim desloca o óleo de um reservatório que não tem mais a sua pressão original (Figura 1). Este processo favorece o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, pois a água do mar contém 0,3% dessa substância que é utilizada para dar suporte ao metabolismo respiratório anaeróbio. Portanto, estas bactérias utilizam o sulfato presente na água como aceptor de elétrons gerando o sulfeto. O acúmulo do sulfeto formado ocasiona o *souring* (HUBERT e VOORDOUW 2007).

Para melhorar a eficiência da recuperação secundária, além da água podem também ser injetadas outras substâncias como: gás, polímeros e/ou surfactantes. Os surfactantes podem ser produzidos microbiologicamente, e possuem a propriedade de diminuir a tensão superficial e interfacial levando a estabilidade através da formação de emulsão de óleo e água, ajudando assim a máxima extração do petróleo nas formações rochosas (MARCHANT e BANAT, 2012; BACHMANN et al., 2014).

**Figura 1-** Esquema exemplificando o processo de recuperação secundária com injeção de água.



Fonte: Gieg et al., p. 264 (2011).

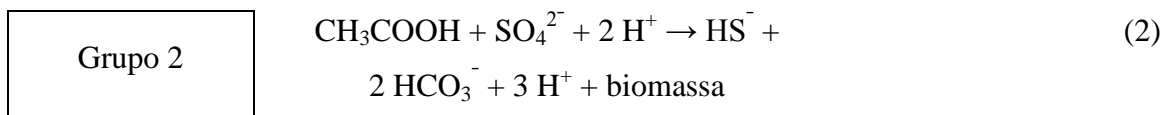
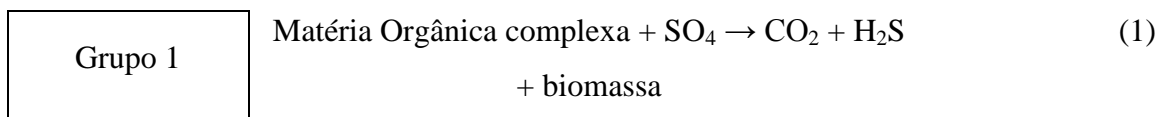
### 3.2 SOURING E CORROSÃO MICROBIOLOGICAMENTE INDUZIDA (CMI)

#### 3.2.1 Sourcing

O processo de acidificação dos reservatórios de petróleo é denominado *souring*, resultante da produção biogênica de sulfeto. Este processo é comum em campos de petróleo, devido à presença das BRS (KUMARASWAMY et al., 2011; KORENBLUM et al., 2014).

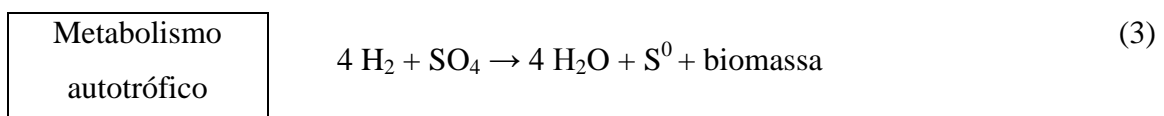
#### 3.2.2 Corrosão microbiologicamente induzida (CMI)

Nos sistemas de petróleo e gás a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) pode estar associada ao crescimento microbiano sésil e a formação de biofilmes. Desde 1926 o grupo fisiológico das BRS é citado como isolados da água de produção (GUAN et al., 2012). Esse grupo de micro-organismos degrada a matéria orgânica simples como acetato ou a mais complexa através do uso de sulfato como acceptor final de elétron. Portanto, as BRS podem ser divididas em 2 grupos de acordo com a fonte de matéria orgânica:



Existem também as bactérias redutoras de sulfato que não necessitam de compostos orgânicos como fonte de energia ou doadores de elétron. Nesse caso, o crescimento bacteriano não ocorre através de um processo heterotrófico, mas sim, autotrófico e geralmente com a produção de enxofre elementar como produto inorgânico final (MADIGAN et al., 2010).

Exemplo:



Os dois primeiros grupos de micro-organismos são os que mais contribuem para que ocorra o processo no qual o  $H_2S$  é produzido e assim afeta diretamente as superfícies metálicas que conduzem a corrosão eletroquímica e anaeróbica. A principal forma de controlar e prevenir a CMI (corrosão microbiologicamente induzida) a nível mundial é feita através da inibição da atividade metabólica e de crescimento das BRS. Anualmente os danos causados pela (CMI) chegam a 20% em relação aos gastos com matérias metálicas, e as BRS são os principais micro-organismos presentes na metade de todos os casos de biocorrosão (MARQUES et al., 2012; GUAM et al., 2013; YUAN et al., 2013). O prejuízo causado pela CMI à indústria petrolífera é consideravelmente elevado. Gonçalves et al., (2002) afirma que em 1996 os gastos gerais relacionados a CMI foram estimados de 30 a 50 bilhões de dólares anuais. Posteriormente estudos realizados nos Estados Unidos, mostram que a estimativa em relação a percentagem do PIB dos seus setores, que os custos com os processo de corrosão em todo os Estados Unidos chegam a um valor total de aos 276 bilhões de dólares (KOCH et al., 2001).

Para prevenir o crescimento das BRS, a indústria petrolífera da Argélia tem um gasto de até 30 milhões de dólares por ano em produtos químicos, como os biocidas, a fim de exterminar estas bactérias (GANA et al., 2011). Anualmente a indústria petrolífera tem um gasto de \$2 bilhões com biocidas (BALDWIN; SUMMER, 2011). De acordo com Price et al., (2013) em sua apresentação do International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems o Reino Unido sugeriu um gasto anual médio de 50 milhões de dólares apenas com a parada de equipamentos e outro gasto adicional de 4 milhões com a limpeza. A CMI é considerada uma interação sinérgica (consórcio) de micro-organismos através da formação de biofilmes que aumentam a velocidade do processo de corrosão (ALABBAS et al., 2013). Com a formação de biofilme os organismos na sua forma sésil adquirem alta resistência a antimicrobianos. Atualmente uma das formas utilizadas para controlar o crescimento bacteriano e a formação de biofilme é a utilização em conjunto de agentes inibitórios de grande espectro microbiano e o revestimento da superfície. Estes mecanismos causam a modificação da superfície por um composto antibacteriano que irá inibir a adesão da bactéria ou matar as células (GARRET et al., 2008; HÉQUET et al., 2011; KORENBLUM et al., 2014; MACHUCA et al., 2013). Portanto, os gastos gerados para o reparo aos danos causados pela CMI são muito altos, e os mecanismos utilizados para o seu combate e inibição não são totalmente eficazes, para isso torna-se necessário o desenvolvimento de novas soluções.

### 3.3 CONTROLE DO *SOURING*

A redução de sulfato pelas BRS gera a corrosão em equipamentos como bombas e tubulações, aumentando os custos durante o processamento. Para controlar o *souring* alguns métodos são aplicados tais como:

- i- A remoção de sulfato da água de injeção (método de separação por membranas);
- ii- A exposição da água a irradiação micro-ondas e ultrassom ou a aplicação de biocidas (glutaraldeído, tetrakis (hidroximetil) fosfônio sulfato (THPS), cocodiamines);
- iii- Remoção de H<sub>2</sub>S pelos métodos físicos - químicos (exemplo adição de sais de ferro);
- iv- Controle microbiológico da produção de sulfato como uso de nitrato e molibdato.

Os métodos possivelmente mais utilizados, como a aplicação de biocidas, tem um alto custo, pois a sua eficiência é curta e muitas vezes ineficaz quando biofilmes microbianos são formados (KUMARASWAMY et al., 2011; HALIM et al., 2012; TANG et al., 2009). Os biocidas são tóxicos e de difícil degradação, com isso são substâncias que podem contaminar áreas distantes do local onde foi utilizado. O meio ambiente sofre um impacto negativo, quando essas substâncias são aplicadas sem uma devida avaliação do risco ambiental. Devido a este fato, a legislação tem incentivado a substituição desses biocidas por substâncias antimicrobianas de fácil degradação no meio ambiente (SARAVIA et al., 2003).

#### 3.3.1 Sobre a injeção de nitrato

Para o controle da acidificação em campos de petróleo, uma alternativa quase sempre eficiente e menos tóxica que o uso de biocidas, é a adição de nitrato. Vários campos de petróleo no mar e continentais que usam a água de injeção com elevada concentração de sulfato utilizam a adição de nitrato para o controle da sulfetogênese, porém pouco se conhece sobre as populações microbianas que são realmente suprimidas durante este processo (GARCIA-DE-LOMAS et al., 2007; ZAHO et al., 2009; KUMARASWAMY et al., 2011 ). A adição de nitrato inibe a enzima sulfito redutase (DsrA), sendo esta essencial no metabolismo das BRS. Esta enzima catalisa a redução de sulfato a sulfeto (KUMARASWAMY et al.,

2011). Portanto, à primeira vista, a utilização de nitrato tem sido considerada como um método eficiente à produção de sulfeto por BRS em poços de petróleo. No entanto, essa prática nem sempre é bem sucedida. O controle de *souring* através da adição de nitrato é um processo complexo de ser administrado. Por exemplo, a hipótese que norteia o uso do nitrato baseia-se no fato de que essa substância estimularia o crescimento de bactérias desnitrificantes e que estas competiriam com as BRS (competição biocompetitiva) (HALIM et al., 2012 ; PILLAY e LIN, 2013). Por outro lado, algumas espécies de BRS podem ter o seu crescimento estimulado com a adição de nitrato. Dessa forma, quando o nitrato acaba no ambiente a produção de sulfeto aumentaria significativamente (DINNING et al., 2005). Assim, a adição de nitrato pode também diminuir a concentração de sulfeto no meio através da ação de bactérias oxidantes de sulfeto que utilizam o nitrato como doador de elétrons (KUMARASWAMY et al., 2011). Em alguns casos, o nitrito, que é um dos intermediários na redução de nitrato, pode se acumular em alguns locais e assim manter o potencial redox do meio alto inibindo assim as BRS. A produção biológica de sulfeto não ocorre quando o potencial redox está acima de - 100mV. (DAVIDOVA et al., 2001). O nitrito pode também reagir com o hidrogênio formando assim o ácido nítrico (HNO<sub>2</sub>) que em alguns casos pode aumentar significativamente os problemas de corrosão (ERIKSSON et al., 1993; KIELEMOES et al., 2000). O processo de adição de nitrato não foi ainda quantificado, e Vik et al., (2007) suspenderam o uso de nitrato na prática de campo, pois o processo corrosivo era mais elevado que o sulfeto gerado durante a extração do petróleo.

### **3.3.2 Exemplos de estudos de caso da adição de nitrato para o controle do *souring* em poços de petróleo**

Em um estudo realizado no Canadá, um campo salino com temperatura de aproximadamente 30 ° C foram adicionados nitrato de potássio e fosfato de sódio de forma contínua por 50 dias. Após alguns dias foi observada uma redução de 40-100% da produção de sulfeto. Após 50 dias, a adição de nitrato foi suspensa e a produção de sulfeto foi mais alta quando comparado ao início do tratamento. Durante o tratamento foram feitas análises moleculares que mostraram a mudanças na estrutura da comunidade com a adição de nitrato, sendo, no entanto dominante o grupo das bactérias oxidantes de sulfeto (GIEG et al., 2011).

Um segundo estudo de caso também realizado no Canadá, mas, em um campo com baixas temperaturas, a injeção de nitrato feita de forma alternada e contínua com baixas e

altas concentrações de nitrato injetadas semanalmente. A injeção alternada se apresentou mais eficaz do que a contínua. Em regiões mais afastadas do poço de injeção, no entanto, a produção de sulfeto não se alterou. Assim as bactérias desnitrificantes heterotróficas dominaram a área próxima ao poço de injeção consumindo o nitrato injetado em baixas concentrações. A adição alternada e em altas concentrações, estimulando assim tanto as bactérias desnitrificantes heterotróficas, que estas produziram nitrito e conseqüentemente, inibiram a produção de sulfeto nas zonas mais distantes do poço de injeção. Este estudo mostrou a importância da presença das bactérias desnitrificantes heterotróficas (BD-H) para o controle da acidificação. Neste caso foi observada uma sucessão da comunidade microbiana dominada por BD-H próximo ao poço de injeção e presenças das BRS em zonas mais distantes (GIEG et al., 2011).

Em um estudo de caso realizado no Brasil foram feitas 15 injeções de 5mM de nitrato e que não inibiram completamente a produção de sulfeto, mas diminuíram significativamente a produção de sulfeto. Para o monitoramento do grupo das BRS foram utilizadas análises moleculares (análises 16S rRNA), e através deste estudo foi possível observar que a população de BRS foi estimulada pela adição de nitrato, mas não foi observado nenhum aumento da quantidade de genes rRNA 16S. Com isso foi possível concluir que para inibir a sulfetogênese será necessário a adição contínua de nitrato, o tratamento usado no estudo se mostrou eficaz somente em superfície (GIEG et al., 2011).

Em um quarto estudo de caso realizado no mar do Norte (Gullfaks) a adição de nitrato foi eficaz no controle de BRS, porém apenas para as comunidades mesófilas que estavam localizadas próximas ao poço e em baixas temperaturas. Em outro campo também no mar do Norte (Skjold) e com temperatura de aproximadamente 80 ° C, o poço primeiramente foi pré-tratado com adição de biocidas (THPS) para posteriormente ser tratado com o nitrato. Após a adição do nitrato os níveis de sulfeto se mantiveram os mesmos que os valores observados após o pré-tratamento com o biocida, mas foi observado um aumento do grupo das bactérias mesófilas desnitrificantes heterotróficas (BD-H), que são as bactérias oxidantes de sulfeto. No entanto, após apenas dois dias de interrupção da injeção de nitrato o processo de acidificação retornou. Isto indica que as BRS foram inibidas com a injeção de nitrato, mas não foram extintas do ambiente. Os autores concluíram que o efeito do nitrato neste campo não ocorreu devido à competição das BRS com as BD-H. A produção de sulfeto diminuiu pela inibição da BRS pelo nitrito formado pelas BD-H ou pela atividade das bactérias oxidantes de sulfeto consumindo o sulfeto. Portanto, nesses dois campos localizados no mar do Norte (Gullfaks e

Veslefrikk) a injeção de baixas concentrações de 0,25 mM de nitrato de cálcio tem sido eficaz no controle da biosulfetogênese. Por outro lado, ao longo de 8 anos de estudo observou-se que o grupo das BRS permanece no ambiente em conjunto com as bactérias oxidante de sulfeto (GIEG et al., 2011).

Mais estudos são necessários para a otimização do uso do nitrato destacando as seguintes áreas: (1) maior conhecimento de como os componentes do óleo são convertidos em substrato pela comunidade microbiana para a redução de nitrato ou na oxidação de sulfeto; (2) estudar a melhor forma de utilizar o nitrato, podendo estar associado com biocidas, para que desta forma o nitrato atinja de forma eficiente áreas com a produção de sulfeto; (3) a utilização de reatores que simulem os reservatórios para a observação das possíveis opções de tratamento em diferentes condições; (4) entender as atividades sinérgicas e ecofisiológicas de uma comunidade microbiana complexa; (GIEG et al., 2011). Essa última área de desenvolvimento é muito promissora, pois, intenciona-se a utilizar micro-organismos isolados no próprio local como fonte de controle de BRS. Algumas bactérias desnitrificantes possuem a capacidade de produzir substâncias antagonistas ao crescimento de BRS.

### 3.4 COMPETIÇÃO ENTRE BRON E BRS POR FONTES DE CARBONO

As bactérias redutoras de nitrato heterotróficas (BD-H) podem também competir com as BRS por compostos orgânicos (doadores de elétrons) encontrados nos reservatórios. Esse tipo de competição pode gerar uma real diminuição na produção de sulfeto e também na biomassa de BRS (KUMARASWAMY et al., 2011).

Por outro lado, as bactérias redutoras de nitrato autotróficas (BD-A) não competem com as BRS por fonte de carbono. A presença destas pode não afetar o número de BRS no ambiente embora possa diminuir significativamente a concentração de sulfeto. Por isso, a atividade de algumas dessas bactérias pode mascarar a presença de BRS, pois, estas bactérias podem utilizar o sulfeto como fonte de energia (doadores de elétrons) durante o processo de desnitrificação. Nesse caso existe um controle da produção de  $H_2S$ , mas esse controle não acarreta diminuição de biomassa de BRS. Dessa maneira, quando a concentração de nitrato diminui, pode imediatamente aumentar a produção de sulfeto. O único mecanismo que estas bactérias possuem para competir com BRS que utilizam o nitrato é a produção de bioativos que venham a inibir o crescimento das mesmas.

### 3.5 MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA CORROSÃO ATRAVÉS DO USO DE OUTRAS BACTÉRIAS E PELA PRODUÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

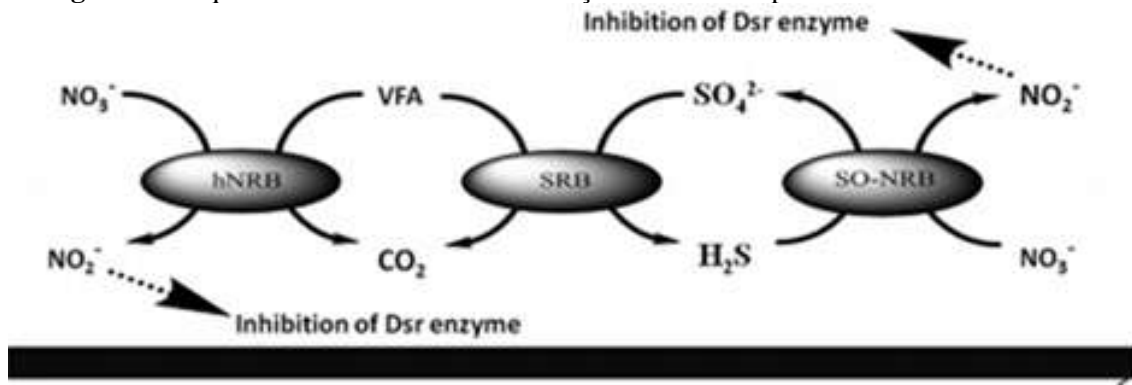
Dois mecanismos biológicos de inibição de corrosão são conhecidos (i) a inibição por outras bactérias e (ii) a inibição através da produção de agentes antimicrobianos. No mecanismo de inibição por outras bactérias, tem sido utilizada a injeção de nitrato para estimular as bactérias desnitrificantes. As mesmas competem com as BRS pelos doadores de elétrons como demonstrado no esquema representado na Figura 2.

As bactérias redutoras de nitrato heterotróficas podem competir com as BRS pela mesma fonte de carbono, como exemplificado na Figura 2, compostos estes que seriam os ácidos voláteis (VFA – acetato, propionato e o butirato). As BRS utilizam primeiro o propionato, o butirato e por último o acetato, já as bactérias redutoras de nitrato heterotróficas tem a capacidade e utilizar os três compostos simultaneamente. Com relação ao doador de elétrons as BRS utilizam o sulfato e as bactérias redutoras de nitrato heterotróficas utilizam o nitrato. Com isso o número de bactérias redutoras de nitrato heterotróficas será maior quando comparado ao grupo das BRS, pois a energia obtida a partir da redução do nitrato é maior do que a do sulfato (ZARASVAND e RAI, 2014).

As bactérias redutoras de nitrato/oxidantes de sulfeto são autotróficas e utilizam o sulfeto como doador de elétrons com isso não competem com as BRS por doadores de elétrons, que no caso das BRS utilizam os compostos orgânicos. Porém, as bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto utilizam o nitrato comoceptor final de elétron, no qual o mesmo é reduzido a nitrito, óxido nitroso e nitrogênio. O nitrito gerado pode matar as BRS, pois ele inibe a enzima sulfito redutase (DsrA), que é responsável pela redução do sulfato a sulfeto. Outra consequência é a inibição das BRS através da formação de óxido nitroso, que aumenta o potencial redox do meio. As bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto na presença do nitrato removem o  $H_2S$  do ambiente, oxidando o mesmo a sulfato. Estudos mostram que em biofilmes tratados com nitrato, ocorre uma substituição da população bacteriana nativa com uma alta diversidade, por uma população de baixa densidade de BRS, este fato gera um aumento da redução de nitrato ao invés da redução do sulfato (ZARASVAND e RAI, 2014).



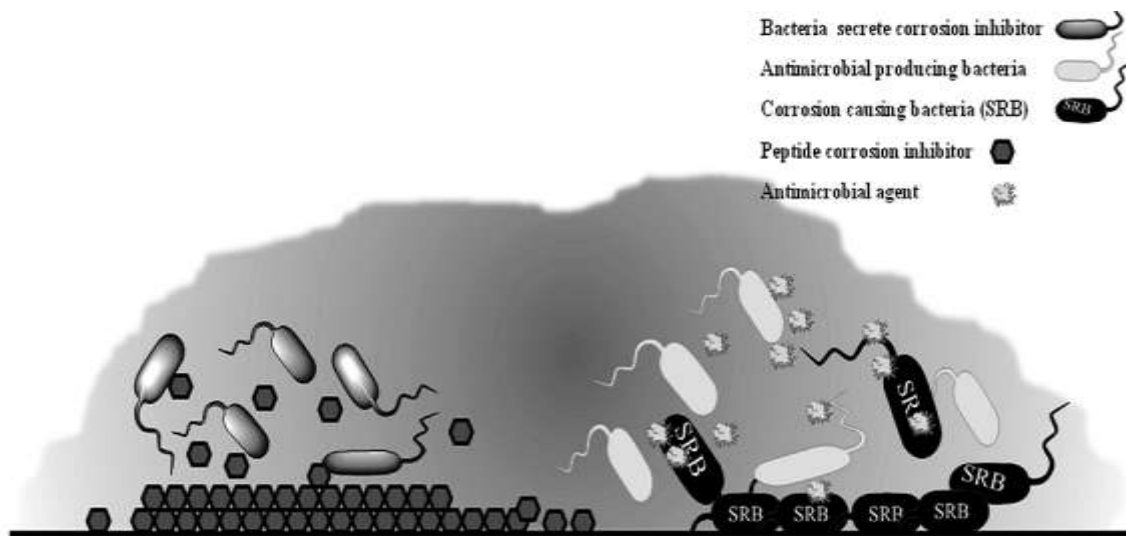
**Figura 2** - Esquema dos mecanismos de inibição da corrosão por bactérias.



Fonte: Zarasvand e Rai, p.68 (2014).

O outro mecanismo de inibição conhecido atualmente é a inibição por agentes antimicrobianos que podem ser produzidos por algumas bactérias. Estes agentes tem a capacidade de eliminar as bactérias causadoras da corrosão, como exemplificado na Figura 3. A produção destas substâncias antimicrobianas no biofilme apresentam as vantagens de evitar a dificuldade de difusão dos biocidas nos biofilmes e de mantem elevada a concentração destes compostos dentro do biofilme. (GIEG et al.,2011; ZARASVAND e RAI, 2014).

**Figura 3** - Esquema dos mecanismos de inibição da corrosão por agentes antimicrobianos.



Fonte: Zarasvand e Rai, p.68 (2014).

### 3.6 ALGUNS FATORES RELACIONADOS À SUBSTITUIÇÃO DO ACCEPTOR FINAL DE ELÉTRONS POR BRS

Algumas BRS com a adição de nitrato passam a utilizar o nitrato ao invés do sulfato e acabam gerando  $N_2$  ou  $NH_4$  dependendo da sua fisiologia. Termodinamicamente, a redução de nitrato ao gás nitrogênio (desnitrificação) fornece a mais energia livre de Gibbs do que na redução de sulfato. A inibição da estequiometria sugere que a atividade das BRS na redução de sulfato pela redução de nitrato, acontece quando as concentrações de nitrato são equivalentes às concentrações de fonte de carbono disponíveis (DINNING et al., 2005).

Nessas condições, o metabolismo das BRS (contendo genes para a redução de nitrato) resultaria na redução do nitrato. Em todos os estudos já feitos o metabolismo da BRS permanece ativo, mas não existe a produção de sulfeto (KUMARASWAMY et al., 2011; DADIDOVA et al., 2001). Uma outra alternativa metabólica é a redução do nitrato a amônia. Esse processo é uma atividade comum entre algumas espécies de BRS. A *D. vulgaris* possui a enzima de nitrato redutase e utiliza o nitrato como doador de elétrons, possuindo assim a capacidade de reduzir o nitrato a amônia (ZARASVAND e RAI, 2014).

### 3.7 LISTAGEM DAS LIMITAÇÕES DO USO DE NITRATO PARA CONTROLE DE *SOURING*

- As BRON são estimuladas, mas este processo pode ser inadequado para algumas situações. Ao adicionar o nitrato as BRON tendem a aumentar enquanto a população de BRS continua a mesma. Mas algumas BRS tem a capacidade de reduzir o nitrato ao invés do sulfato. Em todos os estudos já realizados o metabolismo da BRS permanece ativo, mas, não existe a produção de sulfeto. Com isso, a biogênese de sulfeto poderá ocorrer em uma eventual disponibilidade de sulfato, porém, com um agravante, a população de BRS estará maior em número e já adaptada às condições do meio. Consequentemente, a acidificação do reservatório será intensificada na eventual presença de sulfato (DINNING et al., 2005).

- Com a adição de nitrato as BRS-facultativas (redutoras de nitrato) crescem mais rápido que as BRS-estritas.
- É importante ressaltar que experimentos demonstram que o controle das BRS com uso de nitrato em situação de cultura mista (BRS e BRON), o risco da formação de biofilme na saída de biorreatores diminui, no entanto, aumenta o potencial de formação de biofilme (HALIM et al., 2012; HUBERT e NEMATY, 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de efluentes das indústrias do petróleo (água produzida) foram coletadas em dois poços, pertencentes à Bacia do Recôncavo Baiano (A e B) que apresentava problemas de *souring*. Após a coleta as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos - LABEM, localizado no ICS- UFBA para o início das análises através da técnica de Número Mais Provável (NMP) e posterior isolamento e caracterização dos micro-organismos.

### 4.1 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS - TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Para a quantificação de micro-organismos nas amostras coletadas foi aplicada a técnica de Número Mais Provável (NMP). Foram utilizados os meios seletivos Postgate enriquecido e modificado (de acordo com o item 4.1.1), e o meio CSB enriquecido (CARVALHO, 2010) conforme descrito nesse mesmo item; ambos foram utilizados para a quantificação de dois grupos distintos de bactérias: (i) redutoras de sulfato (BRS) e (ii) bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio (BRON).

De cada amostra coletada foram retirados 1,0 ml e inoculados em tubos de ensaio contendo 9,0 ml de meio de cultura Postgate semi-sólido enriquecido e modificado conforme procedimento descrito APHA (1998).

Para a quantificação das BRON foi utilizado procedimento similar, mas com incubação em CSB enriquecido. As análises foram realizadas em triplicata e submetidas a diluições seriadas de até  $10^{-5}$  incubadas a 38°C em câmara de anaerobiose. A primeira leitura dos tubos foi feita com 48 horas e a segunda leitura com 72 com o objetivo de estimar a população bacteriana.

Como padrão de crescimento para a análise das BRS foi utilizado o parâmetro a deposição de sulfeto de ferro (enegrecimento do meio) que ocorre quando o  $H_2S$  reage com os íons de ferro adicionados no meio. Para avaliar o crescimento das BRON foi determinada como padrão de crescimento a turbidez e/ou formação de sedimento. Os tubos que foram

considerados positivos de BRON, apresentando crescimento (turbidez e/ou formação de sedimento) foram submetidos ao isolamento dos micro-organismos.

#### 4.1.1 Sobre os micro-organismos

A cepa utilizada foi a *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579 adquiridas no ATCC *Bacteriology Collection* e atualmente pertencente a coleção de cultura do LABEM (Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos).

#### 4.1.2 Meios de cultura para NMP e curva de crescimento

O meio Postgate modificado utilizado para o NMP, é composto pelos seguintes reagentes, em proporções para 1L: NaCl - 1,%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,05%;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,1%;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - 0,1%;  $\text{CaCl}_2$  - 0,1%;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,183%; extrato de levedura - 0,1%; ácido ascórbico - 0,01%; tioglicolato de sódio - 0,0013%, citrato de sódio - 0,638%; lactato de sódio 0,175%; resazurina 0,025% (m/v) - 0,4% e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,05%. (baseado na referência CARVALHO 2010).

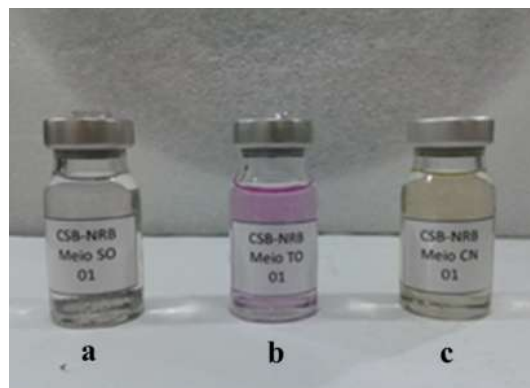
O meio CSB modificado e/ou enriquecido utilizado para NMP, é uma complementação do descrito por Kjellerup (2005) e é composto pelos seguintes reagentes, em proporções para 1L: NaCl - 6%; Ágar - 2g;  $\text{MgSO}_4$  - 0,68g;  $\text{CaCl}_2$  - 0,24g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,02g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,027g; Acetato de Sódio.  $3\text{H}_2\text{O}$  - 0,68g;  $\text{NaHCO}_3$  - 0,95g; Citrato de Sódio - 0,5g; Lactato de sódio - 0,5mL; Resazurina 0,025% m/v - 1mL; solução de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  - 0,5g/100mL (CARVALHO, 2010).

O meio Desulfovibrio, utilizado para a curva de crescimento, é composto pelos seguintes reagentes, em proporções para 1L: 0.5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.0g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.1g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2.0g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 2.0g de lactato de sódio, 1.0g de extrato de levedura, 1.0mg de resazurina, , 0.5g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.1g de tioglicolato de sódio e 0.1g de ácido ascórbico (DSMZ-Desulfovibrio-Broth).

#### 4.2 ISOLAMENTO DE CEPAS MICROBIANAS E SEPARAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM GRUPOS FISIOLÓGICOS DISTINTOS

Das amostras de ambos os poços A e B (referentes a coleta de efluentes das indústria do petróleo coletadas em 01/03/2012) que foram crescidas em meio CSB para a quantificação das BRON, foi realizado o isolamento e caracterização das colônias crescidas em placa com meio CSB sólido. Em placas contendo meio CSB sólido foram adicionados 200 µl de inóculo das culturas crescidas anteriormente em meio CSB enriquecido para a quantificação das BRON. O inóculo então foi semeado pelo método de esgotamento por estrias para o isolamento das colônias. A identificação morfológica foi feita através do método de Gram e 80 cepas isoladas a partir do meio CSB foram então isoladas e armazenadas para posterior estudo. A partir das cepas armazenadas, 30 cepas foram reativadas em três meios de cultura diferentes com objetivo de selecioná-las a partir do seu perfil metabólico (Figura 4).

**Figura 4** - Frascos mostrando o aspecto dos meios de cultura seletivos para o isolamento de BRON, (a) caldo nutriente, (b) sulfeto – oxidante e (c) tiosulfato – oxidante.



Fonte: Própria.

Foram usados três meios seletivos diferentes para o crescimento de redutoras de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) de acordo com a fonte de energia e/ou doadoras de elétrons. Os meios escolhidos foram identificados segundo sua especificidade em favorecer as seguintes fisiologias:

- (i) Desnitrificantes heterotróficas (BRON-H) (SOUZA et al., 2010) (Caldo nutriente enriquecido com nitrato);
- (ii) Desnitrificantes autotróficas (BRON-A) (ECKFORD e FEDORAK, 2002a);
- (iii) Desnitrificantes a partir do tiosulfato (BRON-A) (ECKFORD e FEDORAK, 2002b).

#### 4.2.1 Composições dos meios e preparação dos frascos de incubação em atmosfera anaeróbia

- (i) Meio para desnitrificante heterotrófica: em proporções para 1L foi acrescentado a: peptona 5,0g ; extrato de carne 1,5g; extrato de levedura 1,5g; cloreto de sódio 5,0g e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) 0,5g (SOUZA et al., 2010).
- (ii) Meio para desnitrificante autotrófica: em proporções para 1L foi acrescentado: Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,68g ; Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,24g ; Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,02g; Sulfato de amônio ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,13g; Fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,027g; Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 1,9g; Nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) 1,0g; Resazurina 0,025% (m/v) 1mg , 50ml de solução de elemento traço e uma solução de 0.1 M  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (ECKFORD e FEDORAK, 2002a).
- (iii) Meio para desnitrificantes a partir do tiosulfato: em proporções de 1L foi acrescentado: Fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1,2g; Fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,8g; Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1g; Sulfato de amônio ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,1g ; Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,03g ; Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 0,02g ; Sulfato de Manganês ( $\text{MnSO}_4$ ) 0,02g ; Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 5,0g ; Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,5g e Nitrato de potássio 5,0g, 10 ml de solução de elemento traço e 10 ml, 0.01% de Resazurina (ECKFORD e FEDORAK, 2002b).

Os meios de cultura foram distribuídos em “frascos do tipo penicilina”, posteriormente por meio de fluxo de  $\text{N}_2$  (100%) os frascos foram purgados durante 15 minutos. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos por autoclavação a 121°C e 1 atm. Nos meio de crescimento para bactérias desnitrificantes autotróficas foi utilizado a rezasurina (agente redutor).

#### 4.3 TESTE DE HALO PARA DETERMINAR A EFETIVIDADE CONTRA BRS E A PRODUÇÃO BIOGÊNICA DE SULFETO

Das 80 cepas isoladas, aleatoriamente 30 cepas foram reativadas e todas cultivadas em três meios seletivos distintos: caldo nutriente/ nitrato, sulfeto – oxidante/ nitrato e tiosulfato – oxidante/ nitrato. Com o objetivo de realizar o teste de efetividade contra a produção biogênica de sulfeto, foi feito o teste de inibição em placa com filtros. Os sobrenadantes das culturas de cada cepa crescida nos três meios diferentes acima citados foram centrifugados para remover as células bacterianas. O pH do sobrenadante foi corrigido (pH~6,5, com NaOH 5mM). O sobrenadante da cultura foi concentrado por secagem (ar seco 45° C por 4 min em fluxo laminar) e uma alíquota de 5 µl foi transferida para papéis de filtros dispostos em placas de petri contendo meio sólido *Desulfovibrio* (DSMZ-*Desulfovibrio*-Broth), previamente inoculada com *Desulfovibrio* spp. No experimento do teste de inibição foi utilizado como controle negativo a cepa de *E.coli* e como controle positivo uma cepa reconhecida como produtora de substância inibitória. Esse procedimento foi baseado em Ebrahimipour et al., (2011).

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

A partir de 30 isolados, duas cepas apresentaram resposta positiva para o teste de inibição de *D. vulgaris* (teste de halo). Essas cepas foram identificadas através do sequenciamento do 16S rRNA. A extração do DNA foi feita utilizando o kit UltraClean® (MoBio) e o PCR do gene 16S rRNA feito utilizando o método universal primers descrito por Reysenbach et al., (2000). O resultado do PCR gerou um segmento de DNA de aproximadamente 1,5 kb que foi clonado em vetor TA-cloning (Invitrogen, Brazil) e o produto foi sequenciado pela “MWG DNA sequencing services”. As sequências foram checadas para presença de chimera e a árvore filogenética foi construída usando sequências “tipo” do gene 16S rRNA bacteriano depositados em “Silva” – High Quality Ribosomal RNA Databases. As sequências foram alinhadas e analisadas pelo programa MEGA 4 usando o teste de bootstrap para 100 repetições com a técnica Neighbour-Joining gerado pelo algoritmo Kimura 2-parâmetros.



## 4.5 CURVAS DE CRESCIMENTO

### 4.5.1 *Desulfovibrio vulgaris*

A quantificação da curva de crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* foi realizada a partir de um pré-inóculo contendo 1 ml de suspensão bacteriana (overnight) em 99 ml de meio para *Desulfovibrio* (DSMZ-*Desulfovibrio*-Broth) e incubado a 38°C. A curva de crescimento foi analisada nos tempos 0h, 3h, 5h, 8h, 10h, 12h, 16h, 24h, 36h e 48h. As amostras para cada tempo de coleta foram obtidas através da destruição de culturas fechadas com crescimento sincronizadas (amostragens sacrificial) especificamente arranjadas para esse experimento. As culturas fechadas foram feitas em “frascos do tipo de penicilina” diferentes e fechados hermeticamente. Para a quantificação de células foram utilizadas técnicas de contagem por microscopia de epifluorescência com laranja de acridina e densidade ótica (D.O.) e (KUMARASWAMY et al., 2011 ; BORGLIN et al., 2009).

### 4.5.2 *Desulfovibrio vulgaris* na presença de (1) sulfato, (2) sulfato e nitrato e (3) sulfato e cloreto de sódio e (4) nitrato

Para observar o comportamento do crescimento bacteriano com diferentes concentrações de aceptores de elétrons foi realizada curva de crescimento com quatro testes: (1) sulfato, (2) sulfato com nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) na concentração de 5mM, (3) sulfato e cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) na concentração de 5mM e (4) nitrato de sódio nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) na concentração de 5mM (JURELEVICIUS et al., 2008). Foi realizado um pré-inóculo contendo 1 ml de suspensão bacteriana em 99 ml de meio *Desulfovibrio* (DSMZ-*Desulfovibrio*-Broth) e incubado a 38°C. A curva de crescimento foi analisada nos tempos 0h, 3h, 5h, 8h, 10h, 12h, 16h, 24h, 36h e 48h. As amostras para cada tempo de coleta foram obtidas através da destruição de culturas fechadas com crescimento sincronizadas (amostragens sacrificial) especificamente arranjadas para esse experimento. As culturas fechadas foram feitas em “frascos do tipo de penicilina” diferentes e fechados hermeticamente. O crescimento foi monitorado por densidade ótica (D.O.).

#### 4.5.3 Curva de crescimento da *Halomonas aquamarina* e justificativa da falta de dados semelhantes para *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Foi realizada a curva de crescimento *Halomonas aquamarina* para identificar as fases e final do período exponencial de crescimento. Foi utilizado um pré-inóculo contendo 1 ml de suspensão bacteriana (overnight) em 99 ml de meio sulfeto oxidante e incubado a 38°C. A curva de crescimento foi analisada nos tempos 0h, 3h, 5h, 8h, 10h, 12h, 16h, 24h, 36h e 48h. Foram retiradas amostras para quantificação da *Halomonas aquamarina* utilizando culturas fechadas e sincronizadas (amostragens sacrificial), para cada tempo foram utilizados frascos de penicilina diferentes e hermeticamente fechados. O crescimento foi monitorado por densidade ótica (D.O.).

Não foi possível caracterizar o crescimento de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* por dificuldades encontradas no armazenamento do isolado.

#### 4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os coeficientes de crescimento específicos foram calculados a partir da regressão linear do logaritmo Neperiano (Ln) dos dados de densidade ótica (D.O.) ou densidade de células (c.f.u/ml) e checados com os resultados obtidos com o coeficiente gerado através de ajuste de curva sigmoid 2-parâmetros (SigmaPlot, v8). Os resultados de triplicadas do crescimento em sulfato, nitrato e cloreto de sódio foram testados em ANOVA usando (MINITAB, v13).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTAGEM DE BRS E BRON

Os resultados da Tabela 1 mostram que o poço A apresentou uma densidade de BRON de  $1,6 \times 10^2$  NMP/mL, enquanto que a do poço B foi de  $4,9 \times 10$  NMP/mL (Figura 5). O crescimento bacteriano de BRS foi semelhante para os dois poços ( $2,4 \times 10$  NMP/mL) (Figura 6). Como mostra a Figura 5 foi possível observar o crescimento de bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio (BRON) em meio CSB após 120 horas de incubação. Este método de contagem de número mais provável (NMP) através do cultivo das cepas é o método mais simples e usado para a contagem das BRS em poços de petróleo. Este resultado indica que no poço A possivelmente ocorre à injeção de nitrato, estimulando as BRON e assim a sua densidade é maior quando comparada ao poço B. A densidade das BRS permanece a mesma. A adição de nitrato pode não alterar a população de BRS (GIEG et al., 2011).

**Tabela 1-** Características das amostras dos poços A e B dos campos de petróleo da bacia do Recôncavo Baiano, que foram amostrados durante o estudo.

Localização da amostra	pH	Eh potencial redox	Sulfeto	BRON (NMP/mL)	BRS (NMP/mL)
Poço A	6,86	- 92,9	82,9	$1,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10$
Poço B	6,87	- 127,1	90,85	$4,9 \times 10$	$2,4 \times 10$

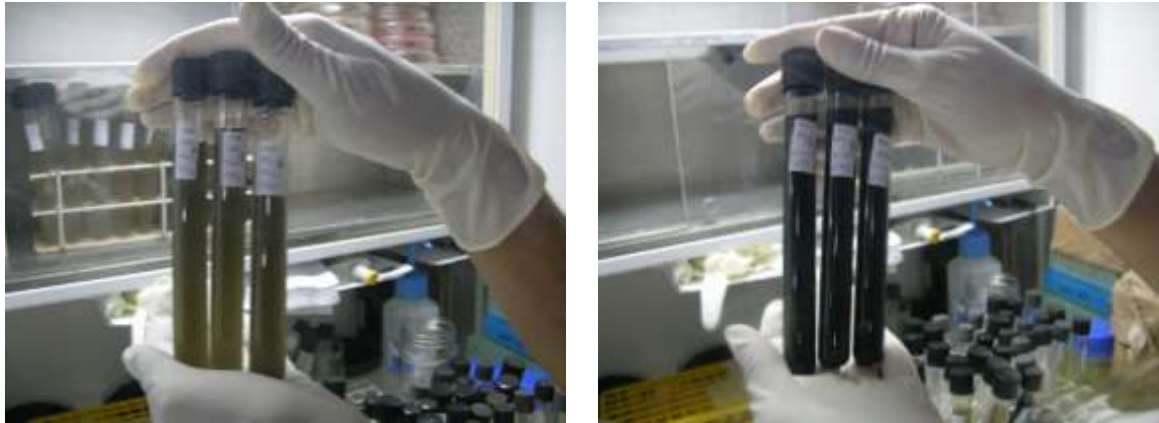
**Figura 5 -** Tubos de ensaio contendo meio CSB dos poços A e B, respectivamente.



Fonte: Própria.

Como mostra a Figura 5 foi possível observar o crescimento de bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio (BRON) em meio CSB após 120 horas de incubação.

**Figura 6** - Tubos de ensaio contendo meio Postgate e amostras de AP dos poços A e B respectivamente.



Fonte:Própria.

Como mostra a Figura 6 foi possível observar o crescimento de bactérias redutoras de sulfato evidenciado pela coloração negra caracterizada pela presença de  $H_2S$ .

## 5.2 RESULTADO DA SEPARAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM GRUPOS FISIOLÓGICOS DISTINTOS

A Tabela 2 mostra o resultado para a separação das 30 cepas utilizando três meios seletivos diferentes para o crescimento das BRON. A variável utilizada para medir o crescimento foi o de turbidez/turvação do meio. O crescimento observado de cada cepa está relacionado a especificidade em relação a sua fisiologia (doador de elétrons e aceptores final de elétrons).

**Tabela 2-** Cepas de bactérias redutoras de nitrato isoladas em grupos fisiológicos distintos.

Cepas	Meios de cultura		
	Caldo nutriente	Tiosulfato oxidante	Sulfeto oxidante
1	++	+	-
2	-	+	+
3	++	+	+
4	++	+	+
5	-	-	+
6	+++	++	++
7	+	+	+
8	-	+	+
9	+	-	-
10	+++	+++	+++
11	-	-	++
12	++	+	-
13	+++	+++	+++
14	-	+	+
15	-	++	-
16	+	+	+
17	+++	-	+
18	+	+	+
19	+++	+++	+++
20	-	-	+
21	+++	+	+
22	-	++	+
23	-	-	+
24	+++	+++	+++
25	+++	-	+
26	-	-	+
27	+++	+	+
28	-	-	+
29	-	++	+
30	+++	-	+
Controle positivo	-	+++	+

**Legenda: - negativo; + fracamente positivo; ++ positivo; +++ fortemente positivo**

### 5.3 TESTE DE HALO

Como mostra a Tabela 3 a inibição mais expressiva da cepa *Halomonas aquamarina* foi atingida quando cultivada em meio sulfeto oxidante, e os valores dos diâmetros dos halos variaram entre 0,7 mm a 1 mm, com a média de 0,9 mm. As médias de inibição com os meios caldo nutriente e tiosulfato oxidante foram de 0,7mm, respectivamente. A partir dos resultados obtidos (Tabela 3) observou-se que o meio sulfeto oxidante possivelmente apresentou condições mais favoráveis para a produção da molécula antagonista ao crescimento de *D. vulgaris*.

**Tabela 3** - A atividade inibidora de *Halomonas aquamarina* em teste de inibição em placa contra a *Desulfovibrio vulgaris*.

Meios	Diâmetro da zona do halo de inibição do crescimento Cepa <i>Halomonas aquamarina</i>			
	Teste 01	Teste 02	Teste 03	Média
Meio sulfeto oxidante	0,9mm	1,0mm	0,7mm	0,9mm
Meio Caldo Nutriente	NR	NR	0,7mm	0,7mm
Meio tiosulfato oxidante	0,7mm	0,6mm	0,9mm	0,7mm

NR: não foi observado formação de halo

Na Figura 7 pode ser observado a inibição da *Desulfovibrio vulgaris* através da formação de halos de inibição por *Halomonas aquamarina*.

**Figura 7** - Teste de halo com a cepa *Halomonas aquamarina* contra a cepa *Desulfovibrio vulgaris*.



Fonte: Própria.

**Tabela 4** - A atividade inibidora de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* em teste de inibição em placa contra a *Desulfovibrio vulgaris*,

Meios	Diâmetro da zona do halo de inibição do crescimento Cepa <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>			
	Teste 01	Teste 02	Teste 03	Média
Meio sulfeto oxidante	0,9mm	1,0mm	0,7mm	0,9mm
Meio Caldo Nutriente	0,7mm	0,8mm	1,0mm	0,8mm
Meio tiosulfato oxidante	0,7mm	0,7mm	0,9mm	0,8mm

NR: não foi observado formação de halo

De acordo com os resultados da Tabela 4 foi possível observar que não houve uma variação expressiva da medida do diâmetro dos halos comparados aos diferentes meios testados. Este resultado demonstra que a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* possivelmente tem em seu metabolismo condições que favorecem o crescimento e expressão de tal “composto” inibitório nos três diferentes meios avaliados.

Na Figura 8 pode ser observado a inibição da *Desulfovibrio vulgaris* através da formação de halos de inibição por *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

**Figura 8** - Teste de halo com a cepa *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* contra a cepa *Desulfovibrio vulgaris*.



Fonte: Própria.

Na conclusão dos testes as cepas *Halomonas aquamarina* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* apresentaram atividade inibitória contra *D.vulgaris*. A inibição observada pode ser o resultado da produção de uma molécula com a atividade antagonista as BRS. Alguns autores tem observado que algumas bactérias podem produzir um agente antimicrobiano. Zarasvand e Rai (2014) sugerem que essas substâncias microbianas produzidas pelo microrganismo podem apresentar vantagens inclusive no combate a formação do biofilme em poços de petróleo. Através da produção *in situ* destes compostos é possível assim evitar a dificuldade de difusão dos biocidas em biofilmes, e podem também permitir uma maior concentração deste antimicrobiano dentro do biofilme, mais especificamente na matriz de exopolissacarídeos (EPS) formada durante a maturação do biofilme, Este fato permite a redução da corrosão através da inibição da formação dos biofilmes por BRS. Desta forma, o uso das bactérias redutoras de nitrato no controle da corrosão é citado na literatura como uma opção ambientalmente mais correta na substituição dos biocidas (ZARASVAND e RAI, 2014).

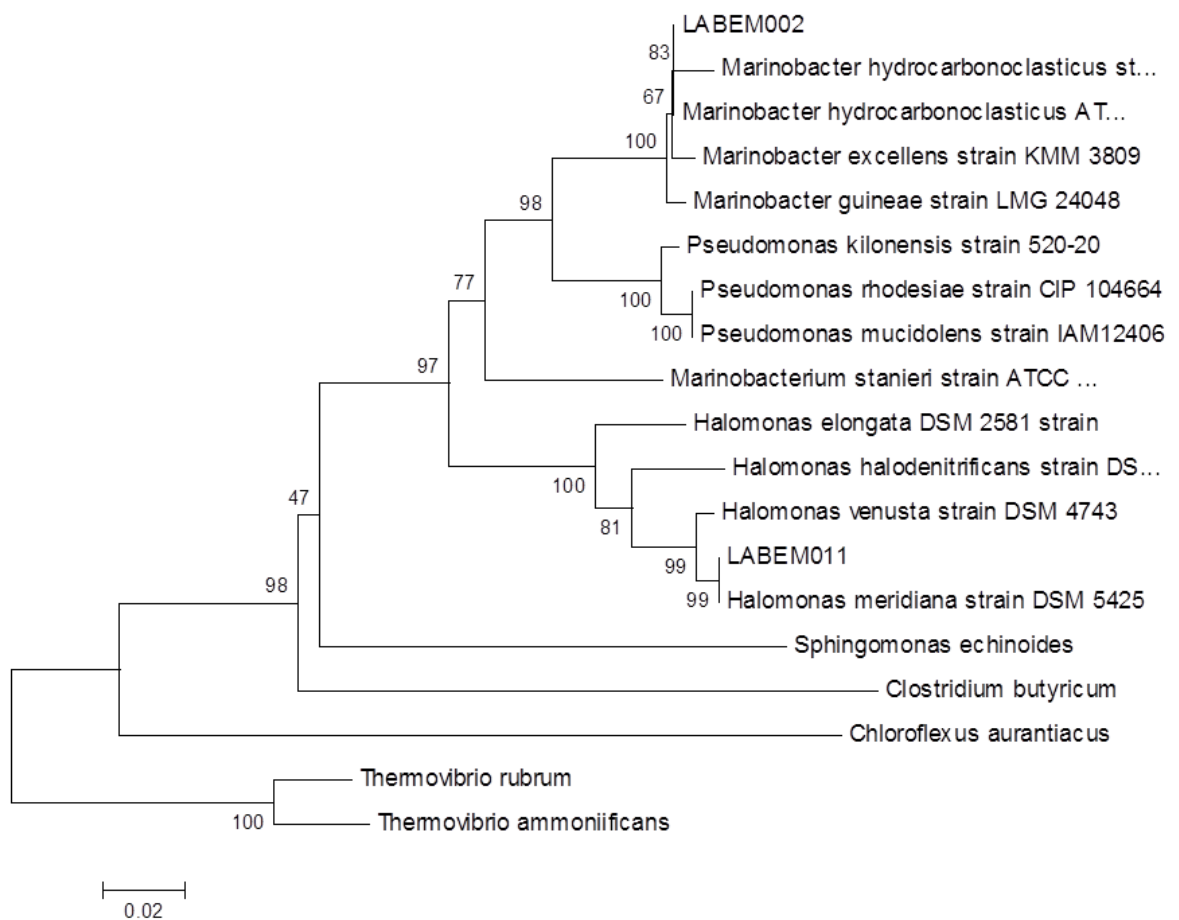
#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS INIBIDORAS DE *D. VULGARIS*

A seqüência (1,5 kb) do 16S rRNA das duas cepas que demonstraram resultado positivo para a inibição de *D. vulgaris* foram depositadas no NCBI com número de acesso Sequin-Magalhaes-2013 LABEM002 KF824854 e Sequin-Magalhaes-2013 LABEM011 KF82485. Estas revelaram uma significativa semelhança ( $P \geq 95\%$ ) com as seqüência de *Halomonas aquamarina* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* também depositadas no GeneBank do NCBI. A família Halomonadacea compreende os gêneros *Deleya* spp. e *Halomonas* spp. , esta família engloba as halotolerante e moderadamente halofílicas, são bastonetes Gram – negativo, não fermentativo e quimiorganotrófico e crescem anaerobiamente na presença de nitrato (KERSTERS, 2006; BERGEY 1994). As espécies do gênero *Marinobacter* spp. são extremamente halotolerantes, são bastonetes Gram-negativo, não fermentativo, crescem anaerobiamente na presença de nitrato, succinato e outros compostos (BERGEY 1994). Na literatura as bactérias redutoras de nitrato dos gêneros *Halomonas* spp. e *Marinobacter* spp. já foram citados como micro-organismos isolados de água produzida oriunda de poços de petróleo (GIEG et al., 2011; KUMARASWAMY et al., 2011) .



A identidade das seqüências obtidas nesse trabalho foram confirmadas através de análise filogenética comparando com micro-organismos “tipo” depositados no site “Silva” – High Quality Ribosomal RNA Databases (Figura 9).

**Figura 9-** Análise filogenética das duas cepas de BRON isoladas nesse trabalho e depositadas no NCBI número de acesso KF824855 e KF824854 para LABEM001 e 2 respectivamente. A árvore filogenética foi construída usando neighbour-Joining e Kimura 2-parâmetros com bootstraps de 100 repetições em evidência na árvore.



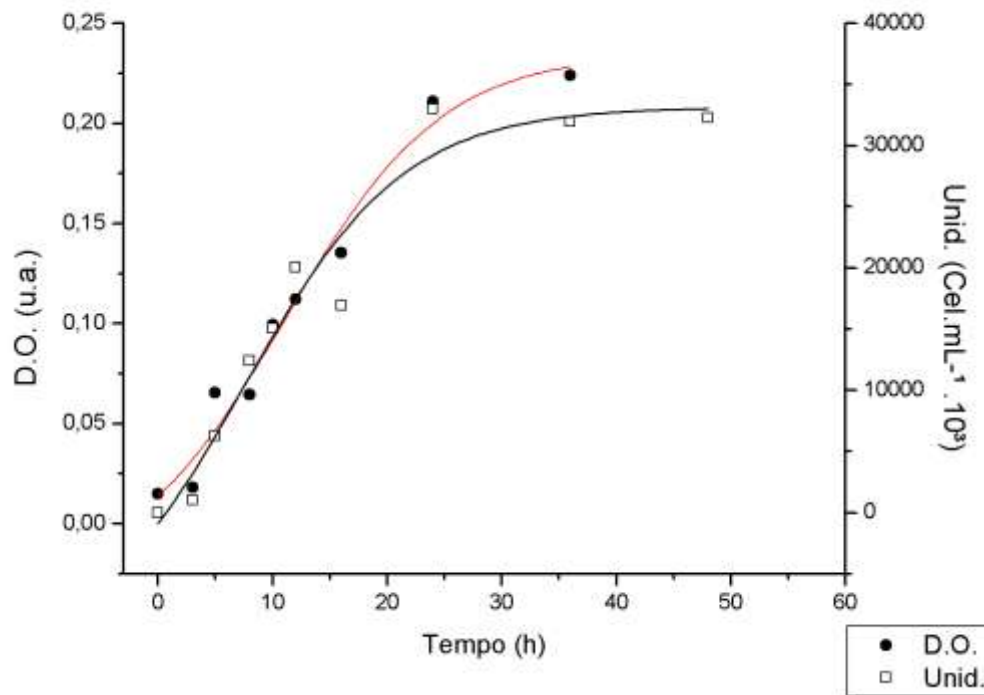
Fonte: Própria.

## 5.5 PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO

### 5.5.1 *Desulfovibrio vulgaris* em meio Desulfovibrio

A cinética de crescimento da *Desulfovibrio vulgaris* foi estimada através da densidade óptica e da contagem direta (epifluorescência). Os resultados da Figura 10 mostram um coeficiente de crescimento ( $\mu$ ) de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  utilizando 10% inóculo e meio orgânico específico para a espécie (DSMZ-Desulfovibrio-Broth). A taxa de crescimento específico da *D. vulgaris* depende de vários fatores como pH e doadores de elétrons, mas Badziong e Thauer (1978) reportam uma média de  $0.15 \text{ h}^{-1}$  para a espécie. Portanto, as condições de crescimentos nesses experimentos permitiram que a cepa alcançasse-se valores máximos.

**Figura 10** - Cinética de crescimento *Desulfovibrio vulgaris* (●) densidade óptica e (□) densidade de bactéria  $\text{cel mL}^{-1}$ .



Fonte: Própria.

### 5.5.2 *Desulfovibrio vulgaris* em meio Desulfovibrio com diferentes concentrações de aceptores de elétrons

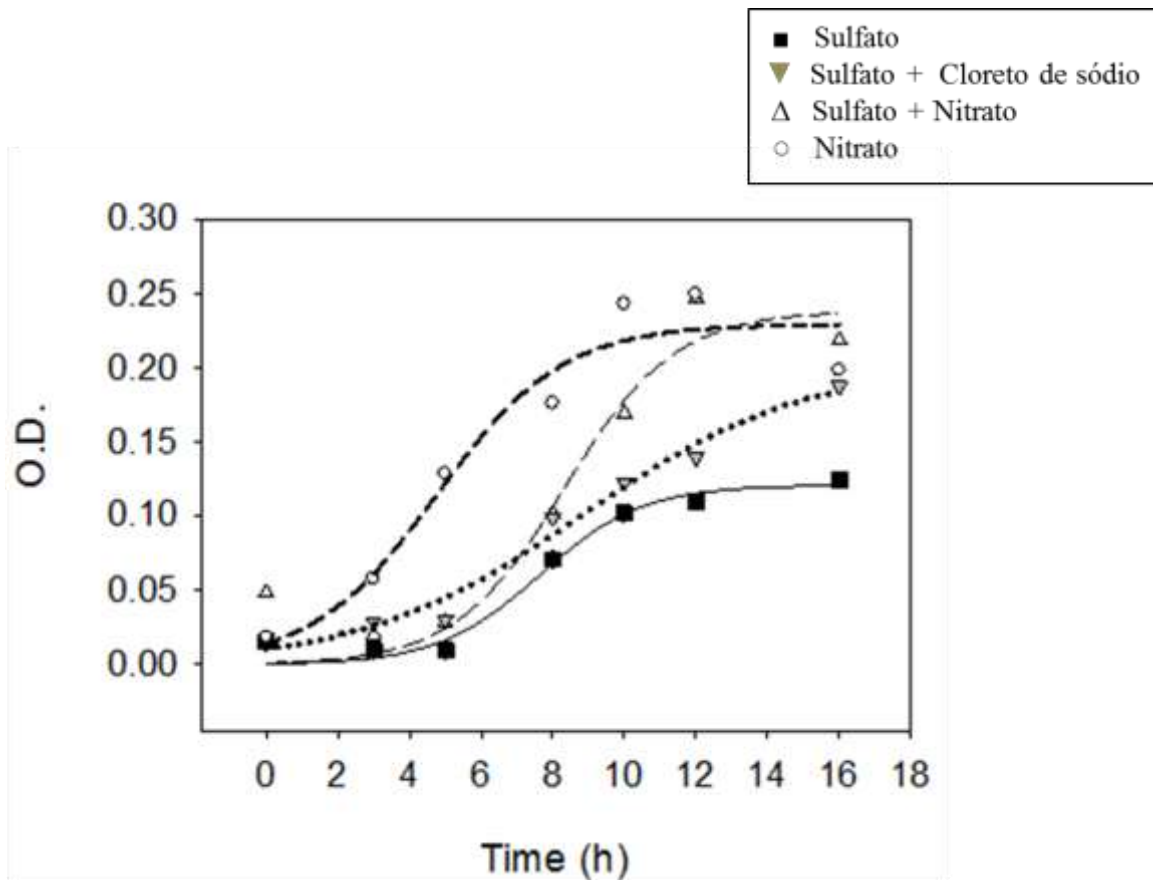
A Figura 11 compara as curvas de crescimento de *D.vulgaris* com diferentes aceptores de elétrons. A maior cinética de crescimento foi observada com nitrato seguido de sulfato com nitrato (Tabela 5), sendo este último o que exibiu a maior fase lag (5 horas).

A cinética de crescimento do tratamento contendo sulfato adicionado com nitrato e o tratamento apenas com nitrato (Tabela 5) apresentam um valor de coeficiente de crescimento específico ( $\mu$ ) próximos. No entanto, comparando os últimos tratamentos, observou-se uma maior fase lag na mistura sulfato e nitrato (3 horas). O menor coeficiente de crescimento foi observado no tratamento com sulfato acrescido de cloreto. As durações da fase exponencial em relação às fases lag e estacionária explicam as variações de biomassa observadas no gráfico (produtividade). Isto é, obteve-se maior biomassa nos tratamentos com nitrato porque a fase exponencial durou de 1 a 2 horas a mais que nos outros tratamentos permitindo um maior crescimento exponencial e produtividade. É também sabido que a redução do nitrato por *Desulfovibrio* spp. pode gerar mais energia que a redução do sulfato, dessa maneira a célula pode sustentar uma maior produção de biomassa (ECKFORD e FEDORAK, 2004; KUMARASWAMY et al., 2011).

Esse resultado tem significativa implicação para o uso de nitrato como agente controlador da produção de sulfeto. Isto é, em um primeiro momento a adição de nitrato reduz o acúmulo de sulfeto, mas faz aumentar a biomassa de *D. vulgaris*. Quando todo nitrato desaparece, essa bactéria vai utilizar o sulfato e, como consequência, aumentar significativamente a taxa cinética de produção de sulfeto, agravando ainda mais os efeitos do *souring*.

No caso dos estudos cinéticos com *Desulfovibrio vulgaris* (Figura 11) os resultados mostram claramente que o crescimento desse micro-organismo não é inibido pela adição de nitrato.

**Figura 11-** Cinética de crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* em: (■) 3000 mg L<sup>-1</sup> Sulfato ; (▼) 3000 mg L<sup>-1</sup> Sulfato + 320 mg L<sup>-1</sup> Cloreto de sódio ; (△) 3000 mg L<sup>-1</sup> Sulfato + 320 mg.L<sup>-1</sup> Nitrato e (○) 320 mg L<sup>-1</sup> Nitrato.



Fonte: Própria.

A curva de crescimento de *D. vulgaris* em meios contendo a mistura de sulfato com cloreto de sódio sugere que, quando comparado à mistura de sulfato de sódio e nitrato de sódio, não existe choque osmótico na utilização de nitrato comprovando que não existe dissimilação fosforilativa.

Os resultados sugerem que a *Desulfovibrio vulgaris* tem potencial para apresentar um comportamento de exclusão biocompetitiva contra BRON quando nitrato é adicionado no meio. Esse processo seria desvantajoso e inverso do que o esperado para o controle de BRS *in situ*, pois com a adição de nitrato o esperado seria que as BRS não utilizassem o nitrato como aceptor final de elétrons e com isso fossem inibidas ao invés de estimuladas.

Estudos citam que a adição de 0,3mM de nitrato em sistemas de água de injeção diminuem a atividade das BRS e como consequência o processo de corrosão (VOORDOUW, 2011) quando não ocorre o acúmulo de nitrito (ERIKSSON et al., 1993 e KIELEMOES et al.,

2000). No entanto, Hubert et al., (2005) afirma que a adição de 20mM de nitrato eliminou completamente a atividade das BRS e o processo de corrosão em biorreatores.

**Tabela 5** - Parâmetros cinéticos comparando o crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* em três condições distintas de aceptores de elétrons (Figura 11).

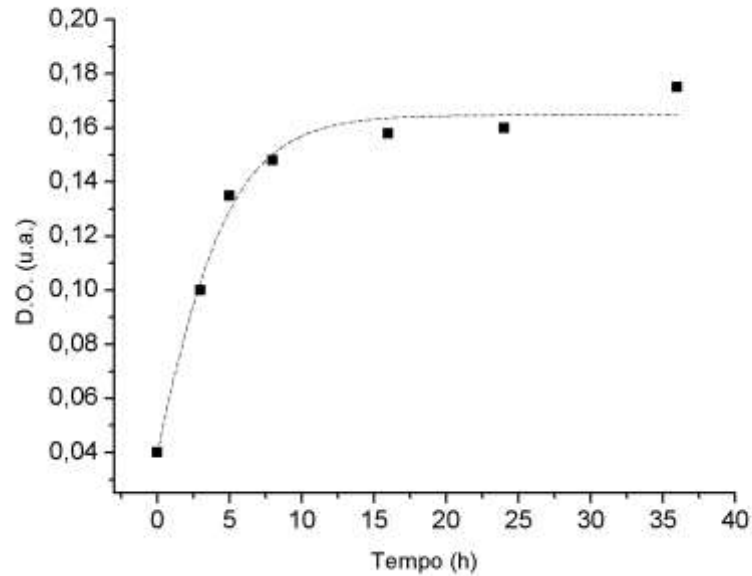
Tratamento (mg l <sup>-1</sup> )	Coefficiente de crescimento especifico (h <sup>-1</sup> )	Fase Exponencial (h)
3000 mg.L <sup>-1</sup> Sulfato	0.14	5-10
3000 mg.L <sup>-1</sup> Sulfato + 320 mg.L <sup>-1</sup> Nitrato	0.28	3-10
3000 mg.L <sup>-1</sup> Sulfato + 320 mg.L <sup>-1</sup> NaCl	0.16	3-10
320 mg.L <sup>-1</sup> Nitrato	0.27	0-8

Fonte: Própria.

### 5.5.3 *Halomonas aquamarina*

A Figura 12 ilustra a cinética de crescimento de *Halomonas aquamarina* em meio sulfeto oxidante com 40 horas de incubação e 10% de inóculo. O ajuste linear da fase logarítmica (0-5 horas) do ln dos dados estima um  $\mu$  de 0,25 h<sup>-1</sup>.

**Figura 12** - Cinética de crescimento da *Halomonas aquamarina* no meio sulfeto oxidante a 38°C.

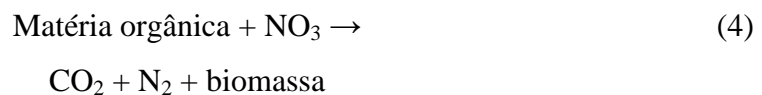


Fonte: Própria.

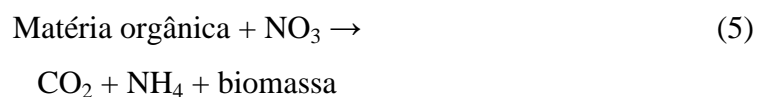
## 5.6 ECOLOGIAS DE MICRO-ORGANISMOS DE POÇOS DE PETRÓLEO: BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO, BACTÉRIAS REDUTORAS DE ÓXIDOS DE NITROGÊNIO E METANOGÊNICAS

Esse trabalho mostra que é importante ressaltar que algumas BRS podem utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons.

Algumas BRS podem substituir o sulfato por nitrato



Algumas BRS podem reduzir  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$



O exemplo acima mostra que algumas BRS apresentam uma grande versatilidade em relação aos seus receptores de elétrons e essa versatilidade torna o seu controle *in situ* um processo complexo.

Muitos micro-organismos anaeróbios facultativos ou obrigatórios podem reduzir o nitrato para gerar ATP através via de fosforilação oxidativa. Esse processo é conhecido genericamente como desnitrificação. No entanto, esse processo aparece de forma mais complicada quando se analisa as vias metabólicas das BRS. O primeiro produto da redução do nitrato é o nitrito, mas, subsequentes reduções podem gerar gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) ou amônia (NH<sub>4</sub>) (equações 4 e 5) dependendo do organismo (MITCHELL et al.,1986). Portanto, as bactérias que reduzem o nitrato (incluindo algumas BRS) podem ser divididas em (i) dissimilatória, quando é formado N<sub>2</sub> ou (ii) assimilatória, quando é formado amônia (MOURA et al., 1997). Essa classificação resulta do fato de que quando o nitrogênio gasoso é formado, este é perdido para a atmosfera. De forma contrária, quando é formada amônia, esta substância pode facilmente ser reabsorvida pelos vegetais, algas e outros organismos e, por isso, chamada de assimilatória.

Até há pouco tempo acreditava-se que o consumo de nitrato pelas BRS acontecia apenas quando expostas a concentração limites de sulfato (concentrações baixas). No entanto, com a adição de nitrato no ambiente para a redução de *souring* essa hipótese pode não necessariamente estar ocorrendo. Uma evidência de que as BRS estariam usando o nitrato seria a manutenção de alta densidade populacional mesmo quando o número de BRON aumenta significativamente após a adição do nitrato no ambiente (Tabela 1). Dalsgaard & Bak (1994) ressaltaram que a capacidade das BRS em reduzir o nitrato está ligada a concentração de sulfeto. A alta concentração desta última substância inibe, em algumas BRS, a expressão do gene da enzima responsável pela redução do nitrato. Como para cultivar BRS em laboratório utiliza-se “sulfeto” na forma de Na<sub>2</sub>S como agente sequestrante de oxigênio, subsequentes testes com nitrato podem produzir resultados negativos. Portanto, os referidos autores alertam que testes para medir o uso de nitrato pelas BRS devem ser feito sem a adição de Na<sub>2</sub>S como agente redutor. Por esse motivo que o consumo de nitrato por BRS pode ter sido subestimado em testes de laboratório. *Desulfovibrio vulgaris*, a cepa usada para teste nesse trabalho não apresenta esse controle negativo pela presença de Na<sub>2</sub>S, mas, pode ser um fenômeno comum para outras BRS presentes no ambiente.

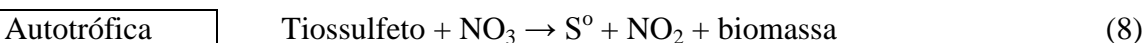
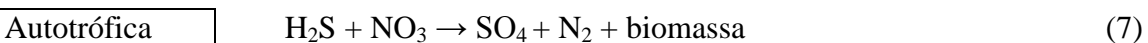
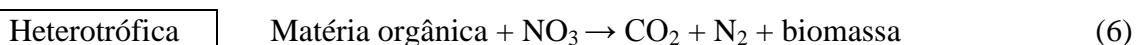
As BRS não formam um grupo monofilético. Esse metabolismo aparece em 4 grupos distintos como: (i) Gram-negativas mesófilas, (ii) Gram-positivas formadores de

endosporo, (iii) Bactérias termófila e (iv) Archaea termofílica. (ECKFORD e FEDORAK, 2004; LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007; MUYZER e STAMS, 2008; PLUGGE et al., 2011; CAO et al., 2012; BARTON e CARPENTER, 2013). Portanto, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) apresentam uma reposta ecológica complexa quando no ambiente dependendo da fonte de carbono e associações com outros micro-organismos. Por exemplo, diferentes doadores de elétrons podem resultar em diferentes coeficientes de crescimento e rendimentos na biomassa bacteriana.

É importante também ressaltar que em associações com bactérias metanogênicas as redutoras de sulfato se comportam de diferentes maneiras também mudando a sua fisiologia. Em alguns casos as BRS podem competir com as metanogênicas por hidrogênio e acetato, mas em outros casos, podem colaborar com estas para a degradação de substratos como propionato e butirato quando ambas estão na ausência de sulfato (comensalismo). Isto significa que algumas BRS somente crescem em sintotrofia com metanogênicas, processo no qual as duas bactérias se associam para degradação do substrato (PLUGGE et al., 2011) . Portanto, o estudo da fisiologia e ecologia desses micro-organismos é um processo complexo quando feito *in situ*.

## 5.7 CARACTERIZAÇÃO E METABOLISMO DE BRON

Em ambientes anaeróbios grupos principais de bactérias (quimiorganotróficas e as quimiolitotróficas) podem ser estimulados pela presença de nitrato. As bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio (BRON) podem ser classificadas de acordo com o doador de elétrons que utilizam. As bactérias quimiorganotróficas (heterotróficas) que utilizam compostos orgânicos como doadores de elétrons e fonte de carbono, quimiolitotróficas (autotróficas) que obtêm energia pela oxidação de compostos inorgânicos (sulfeto de ferro, tiosulfato e sulfato ferroso). As duas utilizam o nitrato como acceptor final de elétrons. (ECKFORD e FEDORAK, 2004), conforme reações abaixo:





As bactérias redutoras de nitrato autotróficas (BD-A) ou sulfeto oxidantes (NR-SOB) utilizam como doador de elétrons o sulfeto e tem como produto o sulfato, esse mecanismo diminui o acúmulo (ou concentração) de sulfeto (KUMARASWAMY et al., 2011).

Foram isoladas 30 cepas com atividade redutora de nitrato. A Tabela 2 mostra que a maioria é do tipo heterotrófico. As cepas que apresentaram atividade antagonista a *D. vulgaris* são *Halomonas* e *Marinobacter* que possuem o metabolismo autotrófico e heterotrófico respectivamente.

## 5.8 DESCRIÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICA DO PROCESSO ANTAGONISTA ENTRE BRS E BRON

As atividades metabólicas podem ser classificadas como quimiorganotróficas onde a fonte de energia e/ou doadoras de elétron são substâncias orgânicas; e as quimiolitotróficas onde a fonte de energia e/ou doadoras de elétron são substâncias químicas inorgânicas. As BRON podem ser classificadas em quimiolitotróficas (autotróficas) e quimiorganotróficas (heterotróficas).

O esquema 1 (Figura 13) exemplifica os dois mecanismos e mostra os pontos de interação ou potencial competição por compostos orgânicos. A inibição das BRS heterotróficas acontece também através da mudança no potencial redox. Portanto as BRON heterotróficas competem com as BRS por doadores de elétrons (compostos orgânicos). O segundo mecanismo observado no esquema 1 é a inibição, pois a presença do nitrato inibe BRS que não são capazes de utiliza-lo como acceptor de elétrons. A cepa *Marinobacter* sp. isolada neste trabalho (Figura 7) é um exemplo de organismo heterotrófico com potencial para a bioexclusão de BRS heterotrófica.

O esquema 2 (Figura 14) mostra o potencial de interação ecofisiológica positiva entre bactérias desnitrificantes autotróficas (BRON-A), que utilizam como doadores de elétrons compostos inorgânicos, reduzidos ( $H_2S$ ) e as BRS que produzem o sulfeto. O produto deste metabolismo é a formação de sulfato (ou possivelmente enxofre elementar) e nitrito ou  $N_2$ . Neste caso é possível observar dois mecanismos, o primeiro é o de favorecimento do crescimento da BRS, pois o produto desta reação pode ser o sulfato que irá favorecer o crescimento das BRS que vão utilizá-lo como acceptor final de elétrons. O segundo mecanismo observado é que as BRON-A consomem o sulfeto gerado pelas BRS e assim o removem do

meio, pois utilizam este composto como doador de elétrons (fonte de energia). A cepa *Halomonas* sp. isolada nesse trabalho (Figura 7) possui o potencial de amenizar a produção de  $H_2S$ , pois, esse microrganismo cresce autotroficamente com  $H_2S$  como doador de elétrons. Portanto, a atividade da *Halomonas* sp. remedia a concentração de sulfeto mas auxilia na sobrevivência de BRS.

O esquema 3 (Figura 15) exemplifica o potencial de interação eco-fisiológica entre as BRON-A e as BRS. Pois as BRON-A utilizam como doador de elétrons o tiosulfato de sódio e tem como produto a formação de sulfato ou enxofre elementar. No caso de ser formado o sulfato, este irá favorecer o crescimento das BRS que o utilizará como acceptor final de elétrons. Existe evidência de que a *Halomonas* sp. também pode utilizar o tiosulfato como doador de elétrons.

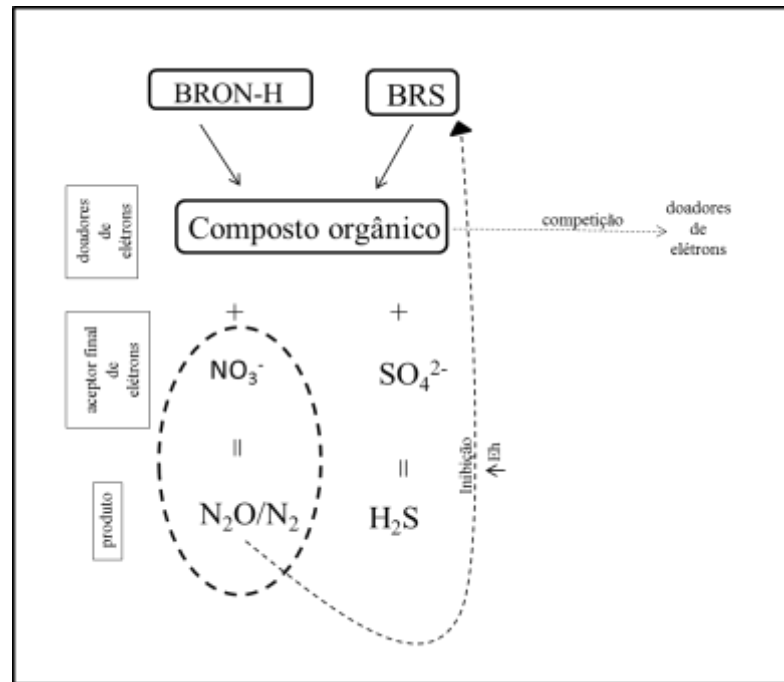
Como evidenciado acima, são complexos e intrincados os mecanismos metabólicos e ou ecológicos que modulam as interações microbianas que regulam a produção de  $H_2S$  ocasionada pela adição de nitrato.

Os esquemas das Figuras 2, 3 e 4 mostraram que o processo de inibição metabólica ou redução da produção de sulfeto em poços de petróleo pode ser o produto da ação de dois grupos distintos:

- (iv) BRON-H e;
- (v) BRON-A.

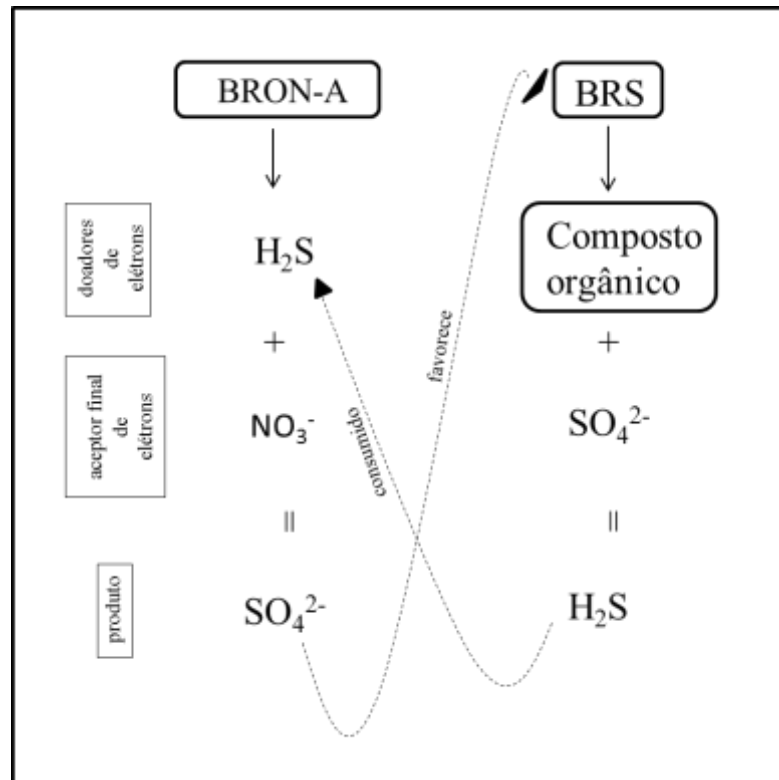
Dependendo da fisiologia da bactéria podemos utilizar o termo bioexclusão para denominar as reações estabelecidas durante os processos microbianos ocorridos entre bactérias heterotróficas e bioconsumo de  $H_2S$ , o processo anaeróbico que biologicamente oxida o sulfeto para gerar  $SO_4$  e biomassa.

**Figura 13** - Esse esquema discute a competição por compostos orgânicos/Inibição com o aumento do potencial redox entre BRON-H e BRS.



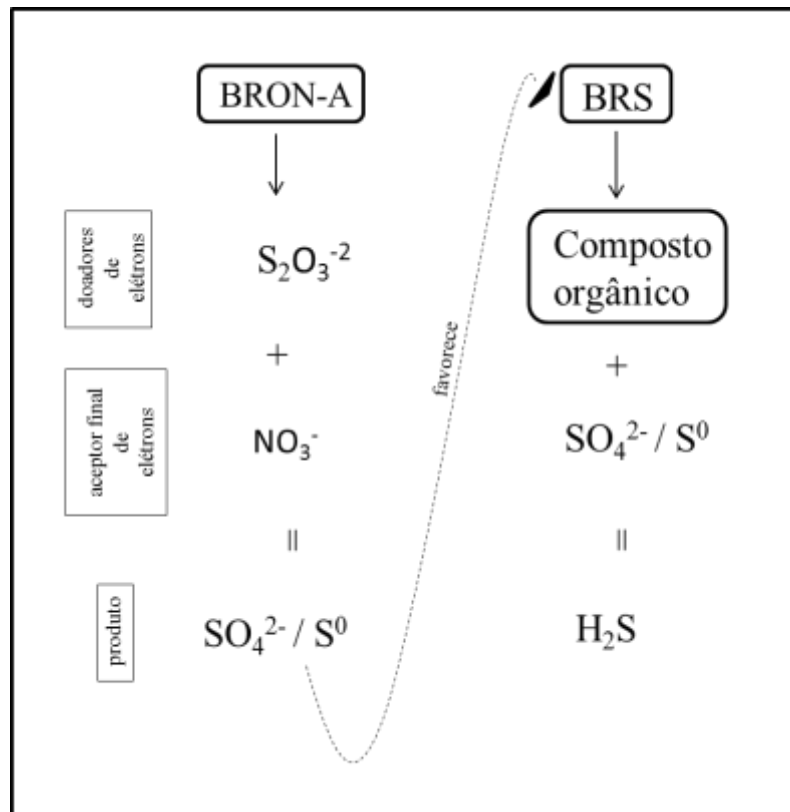
Fonte: Própria.

**Figura 14** - Esse esquema exemplifica a associação entre BRON-A e BRS.



Fonte: Própria.

**Figura 15** - Esse esquema mostra a relação de favorecimento entre BRON-A e BRS



Fonte: Própria.

A continuidade deste estudo se faz necessária, pois poderá desvendar alternativas de metodologias mais eficazes no processo de controle do *souring* através do processo de inibição da formação de sulfeto e a utilização de substâncias inibitórias que são sintetizadas pelas BRON. Assim as BRON podem ser utilizadas na substituição da aplicação dos biocidas, sendo esta uma tecnologia menos prejudicial ao meio ambiente (ZARASVAND e RAI, 2014).

## 6. CONCLUSÃO

- Foi observado que *Desulfovibrio vulgaris* pode utilizar nitrato como aceptor final de elétron e tal atividade está associada com alta produção de biomassa. A implicação desse fato é que, se o nitrato for utilizado para controlar o *souring* causado por *D. vulgaris*, existe a possibilidade da produção de H<sub>2</sub>S atingir o dobro assim que as concentrações de nitrato no ambiente forem reduzidas.

- Das 80 cepas isoladas dos poços de petróleo, 30 foram selecionadas com o metabolismo desnitrificante e apenas 2 apresentaram resposta conclusiva para a produção de bioativos inibidores da BRS *D. vulgaris*.

- As 2 cepas isoladas foram identificadas como *Halomonas aquamarina* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

- A atividade das cepas isoladas podem ser classificadas segundo a fonte de doadores de elétrons:

- Autotrófica (*Halomonas aquamarina*)
- Heterotrófica (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*)

- A abundância das BRON foi seis vezes maior do que as BRS na contagem das bactérias da água de injeção de poços de petróleo. Assim podemos observar o efeito da adição de nitrato, pois a biomassa de BRON aumenta, mas, a biomassa de BRS permanece a mesma. Isto é, não é bioexcluída, levantando questionamentos sobre a capacidade destas em utilizar o nitrato como aceptor final de elétron.

- A classificação segundo a fonte de elétrons revela dois mecanismos distintos de interação ecofisiológicas entre as BRON e as BRS (i) competição (exclusão biocompetitiva) e (ii) redução da concentração de sulfeto no ambiente.

- A atividade da *Halomonas* sp. pode reduzir o efeito do *souring* (H<sub>2</sub>S) porque estas bactérias utilizam o H<sub>2</sub>S como doador de elétrons ou fonte de energia. Nesse caso, o controle do *souring* é efetivo apenas quando a concentração de NO<sub>3</sub> é mantida acima de um valor

mínimo (que pode ser de 5mM). Segundo Jurelevicius et al., (2008) a concentração de 5mM é suficiente para controlar a produção de sulfeto, mas não para a completa eliminação.

- A atividade da *Marinobacter* sp. pode reduzir o efeito do *souring* através do fenômeno de exclusão biocompetitiva. Como essa bactéria tem o potencial de utilizar as mesmas fontes orgânicas que as BRS, crescimento desta afeta diretamente o crescimento das BRS.

- Tanto a *Marinobacter* sp. como a *Halomonas* sp. são capazes de inibir o crescimento da *D. vulgaris* (BRS) através da produção de uma substância inibitória. Esse tipo de atividade pode trazer significativo benefício aos processos de controle do *souring*. Com a inibição de crescimento das BRS ocorre um controle populacional e não apenas fisiológico. Em associação a atividade metabólica inibidora dessas duas cepas, estas podem também atuar de duas maneiras distintas para amenizar o efeito do *souring*: (i) exclusão de BRS por competição de nutrientes (*Marinobacter* sp.) e (ii) pela utilização de H<sub>2</sub>S (*Halomonas* sp.). A estratégia de controle seria repopular os poços de petróleo com essas cepas junto com a adição do nitrato.

- Conclui-se, portanto, que o uso de NO<sub>3</sub> para controlar o *souring* pode ser possível caso a sua adição seja realizada juntamente com a inoculação de BRON-autotrófica e heterotrófica com a capacidade de produzir agentes inibidores da sobrevivência ou crescimento de BRS. A capacidade que as BRON possuem de produzir inibidores foi considerado um fato determinante para viabilizar esse processo de inibição.

- A eficiência do uso de nitrato no controle de *souring* depende do entendimento dos tipos fisiológicos presentes no ambiente. O controle por nitrato não é eficiente caso as BRS presentes utilizem o NO<sub>3</sub> para sobreviver e/ou crescer.

- A eficiência do uso de nitrato no controle do *souring* pode ser mascarada pela atividade de BRON- autotróficas que utilizam o H<sub>2</sub>S como fonte de energia (doadores de elétrons). Dessa forma biomonitoramento da concentração de sulfeto após a aplicação de nitrato pode gerar informação enganosa sobre a sobrevivência das BRS.

## REFERÊNCIAS

- ALABBAS,F., WILLIAMSON,C., BHOLA,S., SPEAR,J.,OLSON,D.,MISHRA,B., KAKPOVBIA, A. Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). **International Biodeterioration & Biodegradation**, 78:34-42,2013.
- ALMEIDA,P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; CARVALHO,E.B.; SOUZA, E.R.; 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. In: **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, 2006.
- ANTONIO, M.R ; KARET, G.B.; GUZOWSKI JR, J.P. Iron chemistry in petroleum Production. **Fuel**, 79: 37-45,2000.
- APHA . Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters. **American Public Health Association**, NW, Washington DC (1998).
- BACHMANN, R.T.; JOHNSON, A.J.; EDYVEAN, R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 86 :225-237,2014.
- BADZIONG, W., THAUER, R.K. Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as the sole energy sources. **Archives of Microbiolog**, 117: 209- 214,1978.
- BALDWIN, D.; SUMMER, N. S. **Prevention and Remediation of Petroleum Reservoir Souring and Corrosion by Treatment with Virulent Bacteriophage**. U.S. Patent n. US20110171719 A1, 14 jul. 2011.
- BARTON,L.L.& CARPENTER,C.M. Suitability of fluorescence measurements to quantify sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 93 : 192–197,2013.
- BERGEY,D.H. **Bergey’s Manual of Bacteriology**. 9 ed. USA, 1994.
- BORGLIN,S.; JOYNER,D.; JACOBSEN,J.; MUKHOPADHYAY,A.; HAZEN,C.T. Overcoming the anaerobic hurdle in phenotypic microarrays: Generation and visualization of growth curve data for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Journal of Microbiological Methods**, 76:159–168, 2009.
- CAO, J.; ZHANG,G.; MAO,Z.S.; LI,Y.; FANG, Z.; YANG,C. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. **International Journal of Mineral Processing**, 106–109 / 58–64, 2012.
- CARVALHO, Alexandra Souza. **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.

DADIDOVA, I.; HICKS, M.S.; FEDORAK, P.R.; SUFLITA, JR. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production Waters. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, 27, p.80-86, 2001.

DALSGAARD, T., BAK., F. Nitrate reduction in a sulphate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: sulphide inhibition, kinetics, and regulation. **Applied Environmental Microbiology**, 60: 291-297, 1994.

DINNING, A. J.; OLIPHANT, D.; VIK, E. A.; BRUAS, L. **Initial souring monitoring and souring-mitigation testing using an online souring-mitigation cabinet (SMC) prior to live produced water reinjection (PWRI) and nitrate-based souring-mitigation treatment on Norske Shell's Draugen Platform.** In: International Symposium on Oilfield Chemistry. The Woodlands, Texas. 2005.

DOLLA, A.; FOURNIER, M.; DERMOUN, Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. **Journal of Biotechnology**, 126: 87-100, 2006.

EBRAHIMIPOUR, G.; MORADI, A.; MEHRDAD, M.; MARZBAN, A. Evaluation of antimicrobial substance produced by a bacterium isolated from *Parmacella iberica*. Howry Alae. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 4(3): 131-140, 2011.

ECKFORD, R.E & FEDORAK, P.M. Second derivative UV absorbance analysis to monitor nitrate-reduction by bacteria in most probable number determinations **Journal of Microbiological Methods**, 50:141 – 153, 2002b.

\_\_\_\_\_. Using nitrate to control microbially-produced hydrogen sulfide in oil field waters. **Studies in Surface Science and Catalysis**. 151: 307–340, 2004.

\_\_\_\_\_. Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 29, p.83-92, 2002a.

ERIKSSON, P.; JOHANSSON, L.G.; STRANDBERG, H. Initial Stages of Copper Corrosion in Humid Air Containing SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub>. **Journal of The Electrochemical Society**, 140(1): 53-59, 1993.

GADEKAR, S.; NEMATI, M.; HILL, G.A. Batch and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira* sp. CVO: Reaction kinetics and stoichiometry. **Water Research**, 40 (12) : 2436–2446, 2006.

GANA, M.L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; TOUZI, A.; ZORGANI, M.A.; PAUSSA, A.; LOUNICI, H.; MAMERI, N. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an Algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 38: 391-404, 2011.

GARCIA-DE-LOMAS, J.; CORZO, A.; PORTILLO, M.C.; GONZALEZ, J.M.; ANDRADES, J.A.; SAIZ-JIMENEZ, C.; GARCIA-ROBLEDO, E. Nitrate stimulation of indigenous nitrate-reducing, sulfide-oxidising bacterial community in wastewater anaerobic biofilms. **Water Research**, 41:3121– 3131, 2007.



GARRETT,R.T; BHAKOO,M.; ZHANG,Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, 18: 1049–1056, 2008.

GIANGIACOMO, L. A.; DANIEL,F.; DENNIS, D. M. Field Testing of the Biocompetitive Exclusion Process for Control of Iron and Hydrogen Sulfides. **Society of Petroleum Engineers**. In: SPE Rocky Mountain Regional Meeting. Casper, Wyoming.1997.

GIEG,L.M.; JACK,T.R.; FOGHT,J.M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology Biotechnology**, 92 (2): 263-282, 2011.

GONÇALVES, N.J.; SÉRVULO, E.F.C.; FRANÇA,F.P. **Ação de biocida à base de glutaraldeído e sal quaternário de amônio no controle de microrganismos sésseis**.In: 6° COTEQ-Conferência sobre tecnologia de equipamentos. 22°Conbrascorr- Congresso Brasileiro de Corrosão Salvador. Bahia.2002.

GONZÁLEZ,I.N.;WANG,E.T.;REZ,F.R.;ROMERO,J.M.RODRIGUEZ,C.H. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. **Anaerobe**, 12: 122-133, 2006.

GUAN, J.; XIA, L.P.;WANG ,Y.L.; LIU, J.F.; GU,D.J.; MU,Z.B. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and dsrAB genes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, (76):58-66, 2012.

HALIM,A.;WATKINB,E.; GUBNERA,R. Short term corrosion monitoring of carbon steel by bio-competitive exclusion of thermophilic sulphate reducing bacteria and nitrate reducing bacteria. **Electrochimica Acta**, 77: 348– 362, 2012.

HÉQUET, A.; HUMBLLOT,V.; JEAN-MARC BERJEAUD,J.M.; PRADIER, C.M. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 84 (2): 301–309. 2011.

HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate-reducing sulfurospirillum spp. that outcompete sulfate-reducing bacterial for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 2644-2652, 2007.

HUBERT,C.;NEMATIM.; JENNEMAN,G.;VOORDOUW,G. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Applied Microbiology Biotechnology**,68: 272–282,2005.

ISA,H.M ; ANDERSON,K.G. Molybdate inhibition of sulphate reduction in two-phase anaerobic digestion. **Process Biochemistry**, 40 (6): 2079–2089, 2005.

JURELEVICIUS, D., WEID,D.V.I.; KORENBLUM,E.; ERIKA,E.; PENNA,M.; SELDIN,L. Effect of nitrate injection on the bacterial community in a water-oil tank system analyzed by PCR-DGGE . **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35:251–255,2008.

KERSTERS ,K. **The Prokaryotes** : A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass.. 3 ed. Springer , 6:836-843,2006.

KIELEMOES, J.; DE BOEVER, P.; VERSTRAETE, W. Influence of Denitrification on the Corrosion of Iron and Stainless Steel Powder. **Environmental Science & Technology**, 34 (4) 663–671, 2000.

KJELLERUP, B.V., VEEH, R.H., SUMITHRARATNE, P., THOMSEN, T.R., BUCKINGHAM-MEYER, K., FRØLUND, B., STURMAN, P. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 32 (4) :163-170, 2005.

KOCH, G. H. et al. **Corrosion costs and preventive strategies in the United States**. Report by CC Technologies Laboratories, Inc. to Federal Highway Administration (FHWA), Office of Infrastructure Research and Development. Report FHWA-RD-01-156, 2001.

KORENBLUM, L., GOULART, F.R.V., RODRIGUES, I.A., ABREU, F., LINS, U., ALVES, P.B., BLANK, A.F., VALONI, E., SEBASTIÁN, G.V., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., SELDIN, L. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express a SpringerOpen Journal**, 3 (1) 1-8, 2014.

KUMARASWAMY, R.; EBERT, S.; GRAY, M.R.; FEDORAK, P.M.; FOGHT, J.M. Molecular- and cultivation-based analyses of microbial communities in oil field water and in microcosms amended with nitrate to control H<sub>2</sub>S production. **Applied Microbiology Biotechnology**, 89: 2027-2038, 2011.

LIAMLEAM, W. & ANNACHHATRE, A.P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, 25:452–463, 2007.

MACHUCA, L.L.; BAILEY, S.I.; GUBNER, R.; WATKIN, E.L.J.; GINIGE, M.P.; KAKSONEN, A.H.; HEIDERSBACH, K. Effect of oxygen and biofilms on crevice corrosion of UNS S31803 and UNS N08825 in natural seawater. **Corrosion Science**, 67: 242–255, 2013.

MADIGAN, MICHAEL T.; BROCK, THOMAS D. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

MARCHANT, R. & BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v.30 (11), 2012.

MARQUES, J.M.; ALMEIDA, F.P.; LINS, U.; SELDIN, L.; KORENBLUM, E. Nitrate treatment effects on bacterial community biofilm formed on carbon steel in produced water stirred tank bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28:2355–2363, 2012.

MITCHEL, G.J. JONES, J.G., COLE, J.A. Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. **Archives of Microbiology**, 144: 35-40, 1986.

MOUGIN, P.; LAMOUREUX-VAR V.; BARITEAU, A.; HUC, A.Y. Thermodynamic of thermochemical sulfate reduction. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 58:413-427, 2007.

MOURA, I., BURSAKOV, S., COSTA, C., MOURA, J.J.G. Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. **Anaerobe**, 3: 279-290, 1997.

MUSTAFA, G. S.; SOUZA, A. O. A. B.; ROCHA, P. S. M. V. Utilização de emissões industriais gasosas para rejuvenescimento de campos maduros de petróleo. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 8(4): 209-21, 2003.

MUYZER, G. & STAMS A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature reviews Microbiology**, 6, 2008.

PILLAY, C. & LIN, J. Metal corrosion by aerobic bacteria isolated from stimulated corrosion systems: Effects of additional nitrate sources. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 83: 158–165, 2013.

PLUGGE, C.M.; ZHANG, W.; SCHOLTEN, J.C.M.; STAMS, A.J.M. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 81 (2), 2011.

PRICE, A., JOHNSON R., FRENZEL, M. **Pipeline integrity monitoring programmes for monitoring MIC using Molecular Microbiological Methods (MMM)**. In: ISMO 4 INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON APPLIED MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY IN OIL SYSTEMS, 2013, Rio de Janeiro: CENPES, 2013, p. 5.

REMPEL, C.L.; EVITTS, R.W.; NEMAT, M. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 33: 878–886, 2006.

REYSENBACH, A.-L., LONGNECKER, K., KIRSHTEN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (9) : 3798-3806, 2000.

SARAVIA, S.G.G.; GUIAMET, R.S.; VIDELA, H.A. Prevention and protection of the effects of biocorrosion and biofouling minimizing the environmental impact. **Review Metal Madrid**, 49-54, 2003.

SOUSA, K.A.; MAGALI CRISTE CAMMAROTA, C.C. E CAMPORESE 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**, 33(2) 273-278, 2010.

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

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

VIK, E.A., JANBU, A.O., GARSHOL, F., HENNINGE, L.B., ENGBRETSSEN, S., KUIJVENHOVEN, C., OLIPHANT, D., HENDRIKS, W.P. **Nitrate-based souring mitigation of produced water-side effects and challenges from the draugen produced-water reinjection pilot.** SPE International Symposium on Oilfield Chemistry Proceedings , 406-416, 2007.

VOORDOUW, G. Production-related petroleum microbiology: progress and Prospects. **Environmental biotechnology**, 22:401–405, 2011.

YUAN, S.; LIANG, B.; ZHAO, Y.; PEHKONEN, S.O. Surface chemistry and corrosion behaviour of 304 stainless steel in simulated seawater containing inorganic sulphide and sulphate-reducing bacteria. **Corrosion Science**, 74. 353–366, 2013.

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

ZHAO, Y.G; WANG, A.J; REN, N.Q. Effect of sulfate absence and nitrate addition on bacterial community in a sulfidogenic bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, 172: 1491–1497, 2009.