

**CLARA NOGUEIRA LAGUARDIA**

**PROCARIOTOS REDUTORES DE SULFATO EM AMOSTRAS ASSOCIADAS A  
PETRÓLEO: DIVERSIDADE E SUSCEPTIBILIDADE A BIOCIDA QUÍMICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva

Coorientadores: Déborah Romaskevis G. Lopes  
Sérgio Oliveira de Paula

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

L181p  
2022

Laguardia, Clara Nogueira, 1996-

Procaríotos redutores de sulfato em amostras associadas a petróleo: diversidade e susceptibilidade a biocida químico / Clara Nogueira Laguardia. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 65-77.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.652>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Metais - Biodegradação. 2. Biocidas. 3. Metabolismo microbiano. 4. Redução (Química). 5. Enxofre. I. Silva, Cynthia Canêdo da, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Mestrado em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 620.11223

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

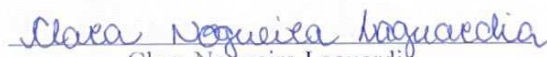
CLARA NOGUEIRA LAGUARDIA

PROCARIOTOS REDUTORES DE SULFATO EM AMOSTRAS ASSOCIADAS A  
PETRÓLEO: DIVERSIDADE E SUSCEPTIBILIDADE A BIOCIDA QUÍMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 18 de agosto de 2022.

Assentimento:

  
Clara Nogueira Laguardia  
Autora

  
Cynthia Canêdo da Silva  
Orientadora

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter guiado e iluminado toda a minha caminhada até o momento.

À Universidade Federal de Viçosa, por ser parte fundamental da minha formação como pesquisadora e cientista e pela oportunidade de realizar essa pós-graduação. Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia pela estrutura, suporte, apoio e oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e à Petrobras, pela concessão de amostras para o desenvolvimento do projeto.

A minha orientadora, professora Cynthia Canêdo da Silva, pela oportunidade de realizar esse trabalho e estímulo durante a sua realização. Aos meus Coorientadores, pelos aconselhamentos e disponibilidade.

A todos os companheiros do LAMAP, por me receberem tão bem nessa jornada da pós-graduação, por todo o conhecimento e experiência, pelos cafés e conversas diárias. Em especial ao grupo das BRS: Déborah, Helena, Maraisa, José Luiz e José Arthur, pelo trabalho e conhecimento compartilhados.

A Viçosa, que me acolheu e me fez tão feliz nos últimos sete anos, por ser palco de crescimento, amadurecimento e diversas conquistas.

A minha mãe, Leila, pelo apoio e amor incondicionais, por me ajudar a realizar meus sonhos e me dar força nos momentos que eu pensava não mais aguentar. Ao meu pai, Adaury (*in memoriam*), que não teve a oportunidade de presenciar essa conquista, mas foi incentivo, a todo momento, para alcançar esse objetivo.

A toda a minha família que sempre cuidou de mim com tanto amor e que me apoiou durante todos os anos de jornada acadêmica. Vocês me deram força e incentivo e entenderam minha ausência em grande parte do tempo, mesmo em momentos importantes.

Aos meus amigos, por serem companhia nos “rolês”, por comemorarem as alegrias e darem colo, ouvirem e acolherem nas desilusões. Em especial, a Lari, Isa e Leri, pelas fofquinhas quase diárias, que tornavam a vida mais leve e divertida. A Marcella, por dividir as angústias, felicidades e desesperos do dia a dia.

A todos que estiveram ao meu lado e contribuíram, direta ou indiretamente, para essa realização, meu muito obrigado!

## RESUMO

LAGUARDIA, Clara Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Procariotos redutores de sulfato em amostras associadas a petróleo: diversidade e susceptibilidade a biocida químico.** Orientador: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadores: Déborah Romaskevis Gomes Lopes e Sérgio Oliveira de Paula.

Os Procariotos Redutores de Sulfato (PRS) compõem um grupo diversificado de microrganismos capazes de reduzir sulfato, produzindo sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um gás tóxico e explosivo. Este grupo microbiano está associado à biocorrosão de superfícies metálicas, intensificada pela atividade bacteriana resultante da formação de biofilmes, causando prejuízos ambientais e econômicos em diversas indústrias, como a indústria petrolífera. Assim, a presença e atividade desses microrganismos é um problema relevante, tornando o monitoramento e controle populacional essencial. Para o controle microbiano, os biocidas são a principal estratégia. Esses produtos químicos são aplicados em protocolos preventivos ou corretivos, visando a eliminação de comunidades sésseis e planctônicas. Também é interessante prevenir a entrada e o desenvolvimento de PRS no sistema usando membranas de dessulfatação. O conhecimento da diversidade da comunidade, além do isolamento e identificação dos microrganismos que o compõem, é necessário para uma melhor caracterização do grupo e das comunidades em que está inserido. Portanto, este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade de amostras de membranas de dessulfatação da água do mar, bem como o isolamento e identificação taxonômica de PRS dessas amostras, sendo ambas as análises direcionadas ao gene 16S rRNA. Além disso, foi avaliada a eficiência dos tratamentos corretivo e preventivo em comunidades planctônicas e sésseis de águas de produção. Para isso, o método do Número Mais Provável, recomendado pela NACE International, e métodos independentes de cultivo foram aplicados: PCR digital, citometria de fluxo, quantificação de ATP e titulação potenciométrica de sulfeto de hidrogênio. Na análise da diversidade da membrana de dessulfatação, 31 filos, 56 classes, 124 ordens, 188 famílias e 298 gêneros foram observados, com abundância variada entre as diferentes amostras, que também apresentaram diversidade e dominância variáveis. Foram obtidos 23 isolados pertencentes ao filo Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Assim, foi possível caracterizar a comunidades de membranas de dessulfatação, ainda sendo necessários mais estudos para caracterização dos isolados. Em relação ao monitoramento de comunidades de água de produção tratadas com THPS, um efeito prolongado foi observado para aplicação preventiva do químico, com o desenvolvimento da comunidade após o sétimo dia. Enquanto

isso, no tratamento corretivo, foram observados efeitos pontuais de redução, principalmente entre os dias 5 e 7. Em geral, o tratamento preventivo apresentou maior eficiência, mas a ação química foi direcionada para a comunidade planctônica em ambos os tratamentos. Quanto às diferentes metodologias de monitoramento, foi possível perceber respostas mais uniformes e consistentes com o que se esperava na quantificação de atividade metabólica (ATP e sulfeto de hidrogênio). Assim, os resultados deste estudo seriam bem complementados com análises da diversidade e sucessão dessas comunidades, esclarecendo mudanças que ocorreram na comunidade durante os tratamentos. Quanto ao monitoramento, metodologias baseadas na atividade metabólica foram mais apropriadas para o propósito e seria interessante analisar conjuntos de amostras maiores para confirmar a aplicabilidade dessas técnicas.

Palavras-chave: PRS. Monitoramento microbiológico. Membrana de dessulfatação. Água de produção.

## ABSTRACT

LAGUARDIA, Clara Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Sulfate-reducing prokaryotes in petroleum associated samples: diversity and susceptibility to chemical biocide.** Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisors: Déborah Romaskevis Gomes Lopes and Sérgio Oliveira de Paula.

Sulfate Reducing Prokaryotes (SRP) comprises a diverse group of microorganisms capable of reducing sulfate, producing hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a toxic and explosive gas. This microbial group is associated with the biocorrosion of metallic surfaces, intensified by localized bacterial activity resulting from the formation of biofilms, causing environmental and economic damage to several industries, such as the oil industry. Thus, the presence and activity of these microorganisms is a relevant problem, making monitoring and population control essential. For microbial control, biocides are the main strategy. These chemicals are applied in preventive or corrective protocols, aiming at the elimination of planktonic and sessile communities. It is also interesting to prevent the entry and development of SRP in the system using desulfation membranes. The knowledge of the diversity of the community, in addition to the isolation and identification of microorganisms that compose it, is necessary for a better characterization of the group and the communities in which it is inserted. Therefore, this work aimed to analyze the diversity of seawater desulfation membrane samples, as well as the isolation and taxonomic identification of SRP from these samples, both analyses directed to the 16S rRNA gene. In addition, the efficiency of corrective and preventive chemical treatment in planktonic and sessile communities of production waters was evaluated. For this, the Most Probable Number method, recommended by NACE International, and cultivation-independent methods were applied: digital PCR, flow cytometry, ATP quantification and potentiometric titration of hydrogen sulfide. In the diversity analysis of the desulfation membrane, 31 phyla, 56 classes, 124 orders, 188 families and 298 genera were observed, with varied abundance among the different samples, which also presented variable diversity and dominance. Twenty-three isolates belonging to the phyla Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria were obtained. Thus, it was possible to characterize the desulfation membrane communities, requiring further studies to characterize the isolates. In the monitoring of production water communities treated with THPS, a prolonged effect was observed for preventive application of the chemical, with community development starting after the seventh day. Meanwhile, in the corrective treatment, punctual reduction effects were observed, mainly between days 5 and 7. In general, the preventive treatment showed greater

efficiency, but the chemical action were directed to the planktonic community in both treatments. As for the different monitoring methodologies, it was possible to notice responses more uniform and consistent with what was expected in the quantification of metabolic activity (ATP and hydrogen sulfide). Thus, the results of this study would be well complemented with analysis of diversity and succession of these communities, clarifying the changes that occurred in the community during the treatments. As for monitoring, methodologies based on metabolic activity were more appropriate for the purpose, and it is interesting to analyze larger sample sets to confirm the applicability of these techniques.

**Keywords:** SRP. Microbial monitoring. Desulfation membrane. Production water.

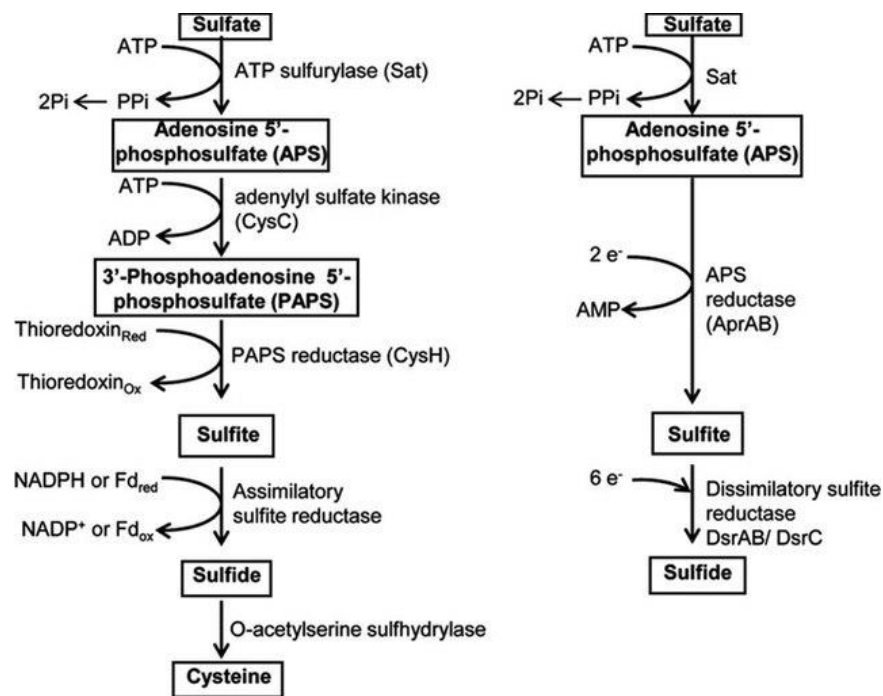
## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	10
CAPÍTULO 1 - DIVERSIDADE BACTERIANA EM SISTEMA DE DESSULFATAÇÃO DE ÁGUA DO MAR DA INDÚSTRIA PETROLÍFERA .....	17
1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivos gerais .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1 Análise de diversidade bacteriana das comunidades das membranas de dessulfatação .....	19
3.1.1 Cultivo e enriquecimento das culturas .....	19
3.1.2 Extração de DNA das comunidades microbianas .....	21
3.1.3 Sequenciamento de DNA das comunidades microbianas e análise de dados .....	21
3.2 Isolamento bacteriano e identificação taxonômica .....	22
3.2.1 Cultivo bacteriano .....	22
3.2.2 Extração de DNA dos isolados .....	22
3.2.3 Sequenciamento e identificação taxonômica dos isolados .....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1 Diversidade bacteriana no sistema de dessulfatação de água do mar .....	24
4.2 Isolamento bacteriano e identificação dos isolados .....	32
5. DISCUSSÃO .....	34
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	39
CAPÍTULO 2 - SUSCEPTIBILIDADE DA MICROBIOTA À AÇÃO PREVENTIVA E CORRETIVA DE BIOCIDA UTILIZADO NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO .....	40
1. INTRODUÇÃO .....	40
2. OBJETIVOS .....	46
2.1 Objetivo geral .....	46
2.2 Objetivos específicos .....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.1 Montagem dos microcosmos e tratamento com THPS .....	46

3.1.1	Quantificação de PRS por NMP .....	47
3.1.2	Quantificação microbiana por PCR digital (ddpcr) .....	48
3.1.3	Contagem de células microbianas por citometria de fluxo .....	49
3.1.4	Quantificação de ATP .....	49
3.1.5	Titulação de H <sub>2</sub> S .....	50
3.2	Análise estatística dos dados .....	50
4.	RESULTADOS .....	51
4.1	APLICAÇÃO CORRETIVA DE THPS .....	51
4.2	APLICAÇÃO PREVENTIVA DE THPS .....	54
5.	DISCUSSÃO .....	57
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	63
	CONCLUSÕES GERAIS .....	64
	REFERÊNCIAS .....	65
	APÊNDICE A .....	78

## Introdução geral

Procaríotos Redutores de Sulfato (PRS) compõem um grupo de organismos anaeróbios estritos caracterizados pela capacidade de utilizar o sulfato como receptor final de elétrons, seja pela via dissimilativa, em que é produzido e excretado sulfeto de hidrogênio, ou pela via assimilativa, em que sulfeto é incorporado a moléculas orgânicas, como os aminoácidos (Figura 1) (POSTGATE, 1965). Apesar do baixo rendimento energético da metabolização do sulfato, já que esse receptor apresenta baixo potencial de redução e gasto energético extra para sua ativação, os PRS são um grupo extenso, diverso e ubíquo (HAMILTON, 1983, 1985; PFENNIG; WIDDEL; TRUPER, 1981; RABUS et al., 2015).



**Figura 1:** Vias de redução assimilativa e dissimilativa de sulfato, evidenciando os compostos, enzimas e respectivos genes envolvidos. Na primeira, o sulfato absorvido pelas células é incorporado ao metabolismo por meio dos aminoácidos; na segunda, o sulfato é transformado em sulfeto de hidrogênio, excretado pelas células. Adaptado de Chandra *et al* (2020).

A etapa adicional de ativação do sulfato ocorre no início da sua metabolização pela produção de adenosina 5'-fosfosulfato (APS), com gasto de uma molécula de ATP (RABUS et al., 2015). Essa etapa de ativação afeta a taxa de crescimento desses organismos, já que apenas cerca de 10% do substrato consumido é direcionado ao aumento de massa celular (CORD-RUWISCH; KLEINITZ; WIDDEL, 1987; PFENNIG; WIDDEL; TRUPER, 1981; PLUGGE et al., 2011). Após a ativação em APS, o sulfato segue pela via de redução, em que parte do enxofre é reabsorvida pelos microrganismos para incorporação em macromoléculas, enquanto a outra parte é utilizada para produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um dos

agentes problemáticos relacionados à existência desses organismos em diversos ambientes (Figura 1) (PLUGGE et al., 2011; RABUS et al., 2015). Ademais, apesar do nome do grupo, são relatados organismos que podem utilizar outros aceptores finais de elétrons em condições de escassez de sulfato (MUYZER; STAMS, 2008; PLUGGE et al., 2011).

No que diz respeito às fontes de carbono, os PRS são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos, como ácidos graxos, álcoois e compostos aromáticos. Apesar da variedade, o lactato parece ser o composto mais utilizado (HUSSAIN et al., 2016; KLEIKEMPER et al., 2002). Quanto à utilização de carbono, esse grupo pode ser ainda dividido em dois subgrupos: aqueles que realizam degradação incompleta da fonte de carbono, produzindo acetato, e os que a degradam completamente, utilizando o acetato como substrato e produzindo dióxido de carbono (MUYZER; STAMS, 2008). Existem, ainda, relatos de PRS capazes de realizar metabolismo autotrófico a partir de dióxido de carbono (HAO, 2003; RABUS et al., 2015). A fonte de carbono utilizada influencia diretamente no biofilme formado por esse grupo. Apesar de não serem relatadas alterações bruscas na composição química, na estrutura do biofilme ou na sua biomassa, a composição e a diversidade da comunidade são significativamente alteradas (DOS SANTOS, 2019).

A variedade metabólica do grupo é fator determinante para sua ubiquidade, sendo encontrados em ambientes de escassez ou ausência de oxigênio, terrestres ou marinhos, com características ambientais distintas, sendo possível encontrá-los até em ambientes com carência de sulfato (PLUGGE et al., 2011; VIGNERON et al., 2018). Apesar de serem majoritariamente mesofílicos e neutrófilos, existem relatos desses organismos em locais de características físico-químicas extremas (MUYZER; STAMS, 2008; PLUGGE et al., 2011). Além disso, é preciso considerar que a variedade metabólica é um fator que reflete na diversidade taxonômica do grupo, o que justifica a dificuldade de monitoramento e controle desses microrganismos (HUSSAIN et al., 2016; RABUS et al., 2015).

O principal método empregado no estudo da diversidade de PRS é o uso de marcadores moleculares, com destaque para o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (RNAr), usado no estudo de bactérias em geral, e para os genes *dsrAB*, que codificam a enzima sulfito redutase, que atua na reação final da via de redução de sulfato (MUYZER; STAMS, 2008; RABUS et al., 2015; VIGNERON et al., 2018). Na literatura são relatados mais de 60 gêneros contendo representantes dos PRS, agrupados em cinco filos de bactérias e dois de arqueas. Dentre os gêneros bacterianos, se destacam, pelo número de representantes, *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (HUSSAIN et al., 2016; RABUS et al., 2015).

Análises do gene *dsrB*, apontam o registro de mais de 100 mil OTUs (*operating taxonomic units*) em nível de espécie relacionadas ao gene da redução de sulfato. Porém, destaca-se que, devido aos organismos que possuem o gene *dsrB*, mas não reduzem sulfato ativamente, o número total de organismos que realizam esse processo pode ser superestimado (RABUS et al., 2015; VIGNERON et al., 2018). Além disso, existem relatos de apenas 240 espécies cultivadas, representando menos de 0,2% dos organismos redutores de sulfato até o presente momento. As limitações para isolamento e manutenção *in vitro* dos organismos desse grupo estão relacionadas à colonização de locais extremos e não explorados cujas características dificilmente são reproduzidas artificialmente. Ainda é interessante destacar a não detecção de espécies ubíquas, sugerindo a especialização de comunidades de acordo com o local colonizado (RABUS et al., 2015; VIGNERON et al., 2018).

A formação dessas comunidades especializadas é desencadeada pelo contexto em que estão inseridas, sendo afetada tanto por fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura, quanto por fatores sociais, ou seja, os outros microrganismos que compõem essa comunidade e as diversas relações sociais estabelecidas entre os seus membros. As relações entre os microrganismos se estabelecem tanto intra-, quanto interespecies e podem ser benéficas aos envolvidos, por disponibilizar produtos metabólicos que servem de nutrientes ou tornar o ambiente mais anóxico; ou malélicas, pela disputa por nutrientes e produção de metabólitos tóxicos (CELIKER; GORE, 2013; FLEMMING; WUERTZ, 2019; RØDER et al., 2020).

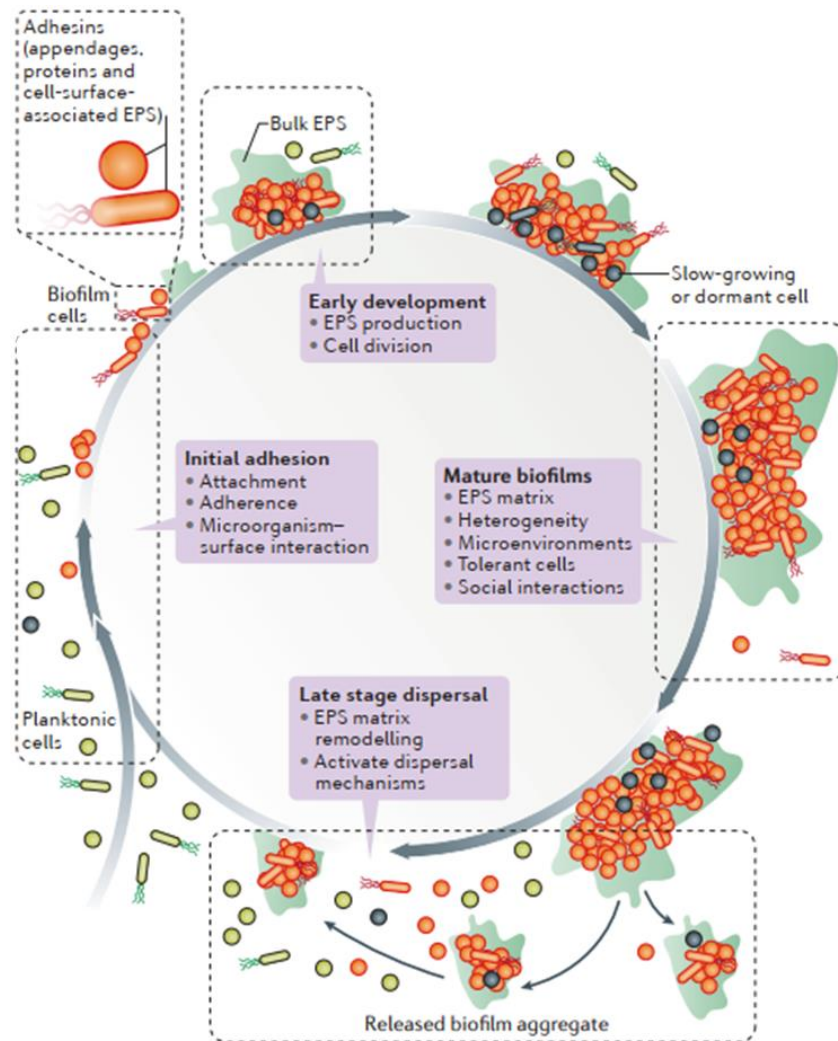
A ação desempenhada pelos PRS pode ser favorável à comunidade em que eles estão inseridos. Por exemplo, em ambientes contaminados com metais esses organismos podem ser úteis na biorremediação; em ambientes em que a presença de enxofre for indesejada e as condições de oxigenação forem apropriadas serão úteis na remoção do composto, sem produção de sulfeto de hidrogênio adicional, enquanto nos ambientes marinhos, os PRS podem ser responsáveis pela formação de biofilmes, que tornam desenvolvimento de sua comunidade mais propício (MUYZER; STAMS, 2008; PLUGGE et al., 2011; ZARASVAND; RAI, 2014).

Biofilmes são conceituados como comunidades microbianas aderidas a uma superfície ou uma interface, nas quais as células se encontram inseridas em uma matriz extracelular (COS et al., 2010). A matriz extracelular, também chamada de exopolissacarídeo (EPS), apresenta composição complexa, contendo compostos inorgânicos relacionados ao local de colonização, nutrientes e diversos metabólitos celulares, como proteínas de adesão e DNA extracelular. A

quantidade e proporção desses compostos são variáveis e determinadas pelos microrganismos da comunidade, já que cada organismo apresenta padrões próprios de produção de matriz extracelular. O acúmulo dessas substâncias aliado às interações químicas, eletrostáticas e hidrofóbicas são os responsáveis pela formação da estrutura dos biofilmes, sendo influenciada por condições ambientais e interações bacterianas (ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; MAUNDERS; WELCH, 2017; SCOFFIELD; WU, 2019).

A formação do biofilme é um processo sequencial em que, inicialmente, células se deslocam próximo à superfície, encontrando um local propício para se aderirem e iniciar o desenvolvimento da matriz extracelular (Figura 2). Essa fase depende das características físico-químicas do meio e a adesão por intermédio de estruturas celulares, e ainda é reversível. Em seguida, as células se aderem de maneira mais intensa à superfície, iniciando a produção de componentes da matriz, que substituirão as estruturas celulares na adesão à superfície. A matriz se acumula e se desenvolve ao redor as células, formando a estrutura básica do biofilme (BROWN; TURNER, 2019; COS et al., 2010; MAUNDERS; WELCH, 2017). Durante seu desenvolvimento, compostos captados do ambiente, como nutrientes, água e oxigênio, se acumulam na periferia devido à dificuldade de difusão pela matriz. Assim, os organismos se direcionam a regiões com condições mais propícias ao seu desenvolvimento, resultando na estratificação da comunidade (DRAGOŠ et al., 2019; STOODLEY et al., 2002).

Desta forma, além de disponibilizar condições apropriadas para o desenvolvimento da comunidade, o biofilme proporciona proteção às células, funcionando como uma barreira física, além de reduzir a difusão de compostos nocivos a elas. Algumas células assumem estado de dormência ao adotarem a forma de biofilmes, o que também contribui para a menor susceptibilidade aos efeitos ambientais e compostos químicos (BAS; KRAMER; STOPAR, 2017; COS et al., 2010). Além disso, a proximidade das células permite a transferência horizontal de genes, possibilitando um melhor desenvolvimento da comunidade, e a ocorrência de uma comunicação celular efetiva pelo mecanismo de *quorum-sensing*, controlando a comunidade como uma unidade (ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; DONLAN, 2002). Quando o biofilme atinge o estágio de maturação, com matriz bem desenvolvida e aderida, inicia-se a fase de dispersão, em que células individualizadas ou fragmentos do biofilme se desprendem da estrutura principal, se direcionando para a colonização de outros locais e desenvolvimento de novas estruturas de biofilme (BROWN; TURNER, 2019; COS et al., 2010; MAUNDERS; WELCH, 2017).

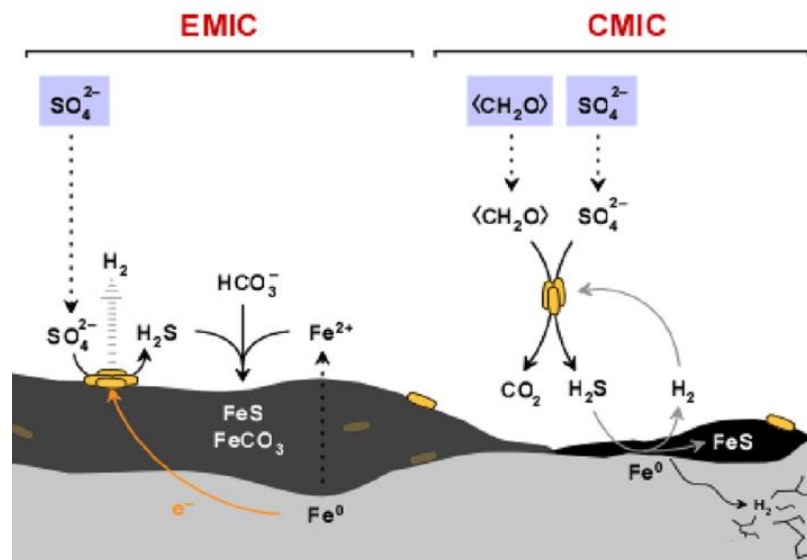


**Figura 2:** Ciclo de formação e dispersão de biofilmes. O processo é sequencial, sendo dividido em quatro etapas principais – adesão inicial, desenvolvimento, maturação e dispersão. Adaptado de Koo *et al* (2017).

A presença de PRS e outros microrganismos capazes de formar biofilmes são causa de grande preocupação na indústria petrolífera devido à capacidade de colonização e adesão a superfícies, acarretando o entupimento de tubulações e a corrosão de estruturas metálicas. A corrosão influenciada microbiologicamente (MIC, na sigla em inglês de microbiologically influenced corrosion) ocorre por ação do metabolismo celular na superfície metálica, causando sérios danos às estruturas (ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; ZARASVAND; RAI, 2014).

A MIC pode se dar por dois mecanismos distintos: EMIC (corrosão elétrica influenciada microbiologicamente) x CMIC (corrosão química influenciada microbiologicamente) (Figura 3). A primeira alternativa é também conhecida como corrosão direta. Nesse caso, o ferro da superfície metálica é utilizado como doador de elétrons para as reações metabólicas envolvendo hidrogênio e sulfato, que culminam na formação de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Já no segundo mecanismo, a corrosão acontece por ação do  $H_2S$  produzido durante o

metabolismo celular. Essa espécie química propicia a oxidação da superfície metálica, liberando hidrogênio para ser usado em reações metabólicas. Em ambos os casos pode ser observada a formação de precipitado de sulfeto de ferro (FeS), sendo que na CMIC essa reação é mais imediata (BROWN; TURNER, 2019; ENNING; GARRELFs, 2014).



**Figura 3:** Comparação dos mecanismos de EMIC e CMIC. No primeiro, a ação se dá por ação direta do metabolismo celular, que retira íons ferro da estrutura metálica. Enquanto isso, no segundo mecanismo, um produto metabólico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) é o principal envolvido, ocasionando a formação de precipitados de sulfeto de ferro (FeS). Adaptado de Enning e Garrelfs (2014).

No ambiente da indústria petrolífera, além dos compostos usualmente encontrados na matriz dos biofilmes, essa também apresenta grande quantidade de produtos de corrosão e quantidade significativa de calcário e areia (ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; BROWN; TURNER, 2019; LITTLE et al., 2020). Esses biofilmes apresentam grande diversidade microbiana em sua composição, unindo organismos com diferentes características nutricionais e fisiológicas, tornando a estrutura bastante complexa (SANDERS; STURMAN, 2005). Ainda, destaca-se a presença predominante de organismos fermentativos, redutores de sulfato e de ferro, e metanogênicos (ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; BROWN; TURNER, 2019; LITTLE et al., 2020). A presença de PRS nesse contexto acarreta problemas adicionais, resultantes da sua capacidade de produção de altos níveis de  $\text{H}_2\text{S}$ , que influencia nas taxas de corrosão, na produção e precipitação de compostos insolúveis e acarreta problemas de biossegurança nas plataformas de exploração, por ser um gás tóxico e explosivo (BROWN; TURNER, 2019; KORENBLUM et al., 2013; LITTLE et al., 2020; SENTHILMURUGAN et al., 2019).

Desta forma, o estabelecimento desses microrganismos e, conseqüentemente, a formação de biofilmes em ambientes associados à produção e à exploração de petróleo estão associados

a prejuízos para indústria petrolífera que já ultrapassam US\$ 2,5 trilhões, o que correspondia a aproximadamente 3,4% do PIB mundial em 2013. Esse valor compreende os custos para reparação de danos causados em estruturas metálicas e, principalmente, os gastos relacionados ao controle das populações de PRS (PROCÓPIO, 2020).

Diferentes técnicas podem ser empregadas para o controle populacional bacteriano, como por exemplo, o emprego de unidades de remoção de sulfato (URS) baseadas em membranas de dessulfatação – que visam retirar o sulfato da água a ser injetada nos poços para recuperação de óleo – e biocidas – que atuam na supressão do crescimento ou da atividade microbiana por meio de diferentes mecanismos e amplo espectro de ação (ARAÚJO et al., 2013; HUPSEL et al., 2020). Em ambos os casos, é interessante caracterizar a comunidade microbiana presente nas amostras antes do tratamento, visando uma maior eficiência na remoção dos microrganismos e biofilmes, e depois do tratamento, para avaliar sua real efetividade e necessidade de novas intervenções (BALDONI-ANDREY et al., 2015; CAVALCANTI, 2001).

Dessa forma, nesse trabalho avaliamos a diversidade de microrganismos nas comunidades provenientes de sistemas de dessulfatação de água do mar inseridos em indústria petrolífera, através de análise de amostras frescas e enriquecidas em diferentes meios de cultivo e de isolamento bacteriano dessas mesmas amostras. Além disso, também construímos microcosmos a partir de amostras de água de produção para monitorar o crescimento microbiano dos PRS por meio de diferentes técnicas e avaliar a efetividade de tratamentos com biocida químico. Esses estudos possibilitam o avanço do conhecimento acerca desse ambiente e desse grupo que, apesar de bastante estudado, ainda apresenta diversas lacunas. Os resultados desse trabalho permitirão a otimização de tratamentos aplicados para controle de comunidades microbianas e o avanço das técnicas de monitoramento microbiológico.

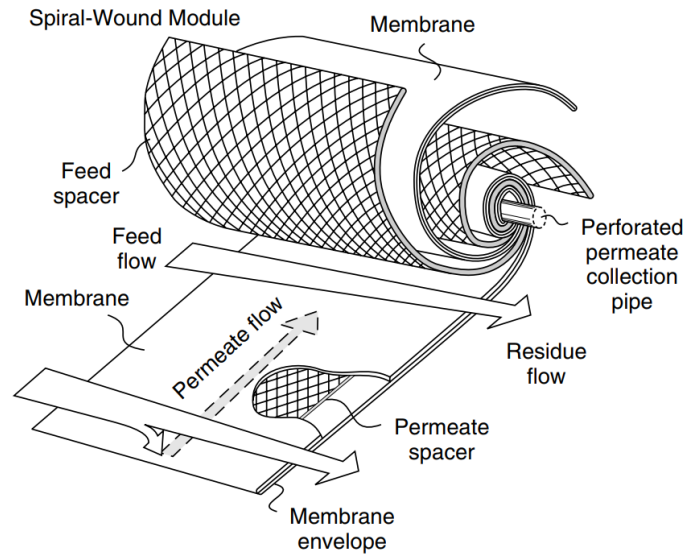
## **CAPÍTULO 1 – DIVERSIDADE BACTERIANA EM SISTEMA DE DESSULFATAÇÃO DE ÁGUA DO MAR DA INDÚSTRIA PETROLÍFERA**

### **1. Introdução**

A extração de petróleo depende diretamente da pressão interna do reservatório, no entanto ao longo do tempo de exploração, a pressão decai naturalmente e deve ser reestabelecida a partir da injeção de fluido aquoso no sistema. O fluido de injeção utilizado deve ser quimicamente compatível com o meio e não apresentar sólidos em suspensão para que esse processo não acarrete prejuízos adicionais à indústria. Uma opção de fluido já estabelecido é a água do mar, devido a sua alta disponibilidade e à salinidade compatível ao sistema (BADER, 2007; HUPSEL et al., 2020).

Apesar da ampla utilização, existem problemas associados à aplicação da água do mar como fluido de injeção dentre os quais se destaca a presença de sólidos em suspensão e sulfato em sua composição, o que contribui para a precipitação de sais insolúveis e crescimento microbiano (HUPSEL et al., 2020). Para contornar essas adversidades a opção mais eficiente e com custos de instalação e manutenção relativamente baixos é a filtração da água em membranas de nano filtração anteriormente à entrada no sistema. Esse processo promove a filtração seletiva de compostos orgânicos e inorgânicos de alto peso molecular, enquanto permitem a passagem de íons monovalentes, cooperando para a manutenção da salinidade da água do mar (BAILLIE, 2009; DA SILVA et al., 2015; HILAL et al., 2004).

As membranas de nano filtração empregadas para a dessulfatação de água do mar se apresentam em configuração espiralada (Figura 1) e estão inseridas em um sistema de tratamento complexo, que inclui etapas de pré-tratamento, bombas de injeção e desaeradores, chamado Unidade de Remoção de Sulfato (URS). O tratamento completo visa à obtenção de um filtrado com características mais apropriadas à injeção (HUPSEL et al., 2020; MOHANTY; PURKAIT, 2011). As membranas são fabricadas a partir de diferentes polímeros, apresentando poros de cerca de 1 nm e carga superficial variável. Assim, o mecanismo de filtração se baseia tanto na exclusão molecular quanto nas interações eletrostáticas entre a membrana e as moléculas do filtrado (BOCZKOWSKI; ERIKSSON; SIMIONATO, 2015; MOHAMMAD et al., 2015).



**Figura 4:** Estrutura de membrana de nano filtração para dessulfatação de água do mar. A membrana se apresenta em configuração espiralada, visando o aumento da eficiência do processo de filtração e remoção de sulfato e compostos orgânicos e inorgânicos de maior peso molecular. O fluxo da água injetada apresenta sentido perpendicular ao da espiral da membrana (setas brancas), enquanto o filtrado dessulfatado apresenta sentido semelhante ao da espiral (seta cinza pontilhada). Adaptado de Mohanty e Purkait (2011).

A utilização sucessiva dessas membranas resulta em perda da capacidade filtrante devido à formação de incrustações pelo acúmulo de sais em sua superfície, assim como pela obstrução de poros devido à formação de biofilme pelos microrganismos presentes naturalmente no ambiente marinho e que são retidos pelo sistema (HILAL et al., 2004; MOHAMMAD et al., 2015). Para solucionar essas limitações é possível modificar a superfície da membrana visando à redução da sua afinidade com os sais e as células, ou aplicar químicos, que devem ser usados em dosagens e periodicidade determinadas, promovendo um resultado eficaz e evitando o desgaste excessivo das membranas (KOCHKODAN; HILAL, 2015; KOO et al., 2017; MOHAMMAD et al., 2015).

O conhecimento da comunidade microbiana, bem como o isolamento de microrganismos das membranas de dessulfatação da água do mar possibilita a exploração da microbiota e da sua ecologia com a perspectiva de melhoria dos tratamentos aplicados e o estabelecimento de novos produtos químicos para o controle dos biofilmes microbianos.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Analisar e comparar a diversidade bacteriana de amostras de membrana de dessulfatação de água do mar antes e após enriquecimento em diferentes meios de cultivo,

determinando as condições de enriquecimento que resultam em uma comunidade mais semelhante à da amostra fresca, além de isolar e identificar taxonomicamente PRS a partir de amostras de sistema de dessulfatação de água do mar.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Cultivar a amostra de membrana de dessulfatação em diferentes meios de enriquecimento durante um e seis meses;
- Extrair DNA de amostras frescas de membrana de dessulfatação de água do mar e após o enriquecimento em diferentes meios;
- Sequenciar amostras de DNA de membrana enriquecidas e não enriquecidas para análise da diversidade bacteriana;
- Isolar PRS de amostras provenientes de sistema de dessulfatação de água do mar;
- Extrair o DNA e sequenciar o gene 16S RNAr de isolados obtidos de amostras de membrana de dessulfatação de água do mar;
- Identificar os isolados obtidos da membrana com base no sequenciamento parcial do gene 16S RNAr.

## **3. Material e Métodos**

### **3.1 Análise da diversidade bacteriana das membranas de dessulfatação**

#### **3.1.1 Cultivo e enriquecimento das culturas**

A partir de uma membrana de dessulfatação de água do mar foram feitos recortes de 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm) de cada porção (entrada e saída), abrangendo três camadas de sua estrutura. O biofilme presente na superfície dessas porções foi solubilizado em solução salina redutora (3,5 % de sal e 0,124 g/L de tioglicolato de sódio). Alíquotas da suspensão celular de cada amostra foram reservadas para extração de DNA referente à amostra fresca, enquanto outras alíquotas das mesmas porções foram inoculadas em meios de enriquecimento, onde foram incubadas por 30 dias e seis meses a 30 °C (Tabela 1), quando foram obtidas novas alíquotas para extração de DNA e avaliação das comunidades enriquecidas. Os meios utilizados para enriquecimento, visando à comunidade de PRS, foram: Postgate E, para PRS; BANHT, para bactérias anaeróbias totais; e BFHT, para bactérias anaeróbias facultativas.

**Tabela 1 – Identificação das amostras do sistema de dessulfatação de água do mar.** As siglas apresentadas serão usadas para referência às respectivas amostras nos resultados.

<b>Amostra</b>	<b>Sigla</b>
Entrada da membrana fresca	EF
Saída da membrana fresca	SF
Entrada da membrana enriquecida por um mês em meio Postgate E	E1P
Saída da membrana enriquecida por um mês em meio Postgate E	S1P
Entrada da membrana enriquecida por um mês em meio BANHT	E1BAN
Saída da membrana enriquecida por um mês em meio BANHT	S1BAN
Entrada da membrana enriquecida por um mês em meio BFHT	E1BF
Saída da membrana enriquecida por um mês em meio BFHT	S1BF
Entrada da membrana enriquecida por seis meses em meio Postgate E	E6P
Saída da membrana enriquecida por seis meses em meio Postgate E	S6P
Entrada da membrana enriquecida por seis meses em meio BANHT	E6BAN
Saída da membrana enriquecida por seis meses em meio BANHT	S6BAN
Entrada da membrana enriquecida por seis meses em meio BFHT	E6BF
Saída da membrana enriquecida por seis meses em meio BFHT	S6BF

O meio Postgate E, por litro, consiste em 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,0 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1,0 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,83 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , 1,0 g de extrato de levedura, 0,5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,9 g ágar, 7,0 mL de lactato de sódio (50% p/v) e 4 mL de solução 0,025% p/v de resazurina. O meio foi preparado com água do mar natural e o pH ajustado para 7,6. Após envase anaeróbio e esterilização em autoclave, o meio foi suplementado com 1% (v/v) do volume final de solução de tioglicolato de sódio (12,4 g/L).

O meio BANHT, por litro, consiste em 5,0 g de glicose, 4,0 g de peptona universal, 1,0 g de extrato de levedura e 4 mL de solução 0,025% p/v de resazurina. O meio foi preparado com água do mar natural e o pH ajustado para 7,6. O meio de cultura foi preparado sob agitação e purga constante de nitrogênio e a esterilização foi feita em autoclave. Em seguida, o meio de cultura é suplementado com solução de tioglicolato de sódio (12,4 g/L) com volume correspondente a 1% (v/v) do volume final.

O meio BFHT, por litro, consiste em 1,0 g de glicose, 5,0 g de peptona, 1,0 g de extrato de levedura e 4 mL de solução 0,025% (m/v) de resazurina. Além disso, 0,1 g de citrato de ferro

foram solubilizados separadamente e adicionado ao meio após o resfriamento. O meio foi preparado com água do mar natural e o pH ajustado para 7,6.

### 3.1.2 Extração de DNA das comunidades microbianas

Uma alíquota de 20 mL da amostra fresca, assim como alíquotas dos três meios de enriquecimento nos tempos de 1 e 6 meses, foi centrifugada a 6000 g por 10 minutos e o *pellet* foi lavado duas vezes com tampão SET (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA) e ressuspendido em 500 µL do mesmo. Os *pellets* ressuspendidos foram usados para iniciar o protocolo de extração descrito por Silva e colaboradores (2010). Cada amostra foi tratada com 50 µL de lisozima (GE Health Care®) na concentração de 100 mg/mL e incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 25 µL de proteinase K (Sigma®) 10 mg/mL e 100 µL de SDS 10 % (m/v) e a amostra foi incubada por 60 minutos a 60 °C. Na sequência, foram realizados três ciclos de *freeze-thaw* (2 minutos em nitrogênio líquido e 2 minutos a 65°C em cada ciclo). Então, foi adicionado igual volume de fenol saturado (pH 8) e os tubos foram agitados vigorosamente por 30 minutos. Após centrifugação a 12000 g por 5 minutos, a fase aquosa foi recuperada em um novo tubo, onde foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após 30 minutos de agitação vigorosa, foi repetida a centrifugação anterior. Novamente a fase aquosa foi recuperada em um novo tubo e nele foram adicionados 0,1 volume de NaCl 5 M e um volume de isopropanol gelado. Os tubos foram centrifugados a 12000 g por 20 minutos e o *pellet* foi lavado com etanol 70 % (v/v) gelado e deixado para secar. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de água ultrapura autoclavada, quantificado usando espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) e visualizado em gel de agarose 1,0 % (m/v).

### 3.1.3 Sequenciamento de DNA das comunidades microbianas e análise de dados

O DNA extraído de cada amostra foi liofilizado e enviado para sequenciamento das regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene 16S do RNA ribossomal, com o par de *primers* 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') na empresa Novogene (<https://en.novogene.com>, Beijing, China) pela plataforma Illumina MiSeq. Os dados obtidos foram processados por meio do pacote *dada2* versão 1.16.0 no *software* R versão 1.4.1106. As sequências foram filtradas e trimadas, os *contigs* foram montados, e as quimeras foram removidas. As *amplicon sequence variant* (ASVs) foram definidas com base no banco de dados Silva, em sua versão 138.1 (<https://www.arb-silva.de/>).

As análises de diversidade e multivariada foram realizadas utilizando o pacote *mctoolsr* versão 0.1.1.2 no *software* R versão 1.4.1106 e o *software* Past 3. A análise de predição funcional foi realizada utilizando o *software* FAPROTAX 1.1 e a comparação entre as comunidades frescas e enriquecidas foi realizada no *jvenn* (BARDOU et al., 2014).

## **3.2 Isolamento bacteriano e identificação taxonômica**

### **3.2.1 Cultivo bacteriano**

Um recorte de 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm) de três camadas da membrana de dessulfatação de água do mar, nas porções de entrada e saída, foi utilizado e o biofilme presente nessa porção foi solubilizado em meio Postgate E adaptado (sem ferro e sem ágar), preparado em condições anaeróbias. Em seguida, essas culturas foram plaqueadas em meio Postgate E sólido contendo ferro pelo método de *spread-plate*. A partir dessas placas incubadas e repiques sucessivos em estrias simples e compostas foi realizado o isolamento das diferentes colônias. As colônias isoladas foram transferidas para tubos Hungate contendo 9 mL de meio Postgate E adaptado (sem ferro e sem ágar) para cultivo contínuo.

Uma amostra de rejeito do sistema de dessulfatação, que consiste no resíduo da filtração da água do mar, também foi utilizada para isolamento bacteriano. O rejeito foi filtrado em membrana 0,22 µM e as células retidas foram solubilizadas em meio Postgate E adaptado (sem ferro e sem ágar). Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão foi plaqueada pelo método de *spread-plate* em meio Postgate E sólido, com ferro. A partir de sucessivos repiques, colônias isoladas foram obtidas e transferidas para tubos Hungate contendo 9 mL de meio Postgate E adaptado (sem ferro e sem ágar) para cultivo contínuo.

### **3.2.2 Extração de DNA dos isolados**

Os isolados obtidos das amostras do sistema de dessulfatação de água do mar tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo descrito por Pospiech e Neumann (1995). Inicialmente, a cultura foi centrifugada a 6000 g por 10 minutos e lavada com tampão SET (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA) por duas vezes, sendo o *pellet* ressuspendido em 500 µL do mesmo tampão. Em seguida, foram adicionados 5 µL de lisozima (GE Health Care®) em concentração de 100 mg/mL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos, e em seguida foram adicionados 0,1 volume de SDS 10 % (m/v) do volume de SDS 10 % e 25 µL de proteinase K (Sigma®) 10 mg/mL e os tubos foram incubados novamente a 60 °C por 1 hora. Foi acrescentado igual volume de clorofórmio e os tubos foram homogeneizados por 30 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram

centrifugados por 10 minutos a 12000 g e o sobrenadante foi recolhido em novo tubo, onde foi adicionado um volume de isopropanol e um terço do volume de NaCl 5M. A solução foi homogeneizada e centrifugada novamente a 12000 g por 10 minutos. Após repetir a centrifugação anterior, o *pellet* foi lavado com etanol 70 % (v/v) gelado. Depois de o DNA estar seco, foi ressuscitado em volume apropriado de água destilada autoclavada. O DNA extraído passou por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para confirmar sua integridade e, por último, foi quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts - USA).

### 3.2.3 Sequenciamento e identificação taxonômica dos isolados

O DNA extraído dos isolados foi amplificado por PCR com os *primers* 10F e 1100R (LANE *et al.*, 1991) homólogos para regiões conservadas do gene codificante da subunidade 16S do RNA ribossomal (RNAr). Para uma reação com volume total de 25 µL, foram adicionados 2,5 µL de tampão 2X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de cada primer (20 µM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,25 µL de enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerase (5,0 U/µL) (Promega, USA), 2 µL de DNA bacteriano (50 ng/µL) e água mili-Q autoclavada para completar o volume. A amplificação foi realizada em termociclador C100 Touch (BIO-RAD, Hercules - USA), usando o seguinte programa: 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 59 °C por 25 segundos e 72°C por 1 minuto; em seguida, uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos. A amplificação do gene de interesse na PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e quantificados no Qubit 4 (Invitrogen, Carlsbad - USA), para que fossem diluídos na concentração apropriada do sequenciamento. Os produtos de PCR obtidos foram enviados ao Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) para sequenciamento pelo método de Sanger.

As sequências obtidas foram analisadas pelo *software* DNA Baser Assembler (Heracle BioSoft S.R.L., Romania) para montagem dos *contigs*, que foram comparados a sequências armazenadas na base de dados “nucleotide collection nr/nt” do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os resultados obtidos para cada sequência de isolado foram ordenados de acordo com a identidade entre as sequências, em ordem decrescente, e foram analisados os 100 primeiros resultados.

A identificação taxonômica foi realizada por comparação com as sequências de DNA selecionadas na etapa anterior e que estivessem depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e/ou no RDP (*Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>)). A árvore filogenética foi construída usando o *software* MEGA X e

foi aplicado o método de *Neighbour-Joining* com *bootstrap* de 1000 e método de substituição Kimura 2 parâmetros, em que são consideradas transições e transversões.

## 4. Resultados

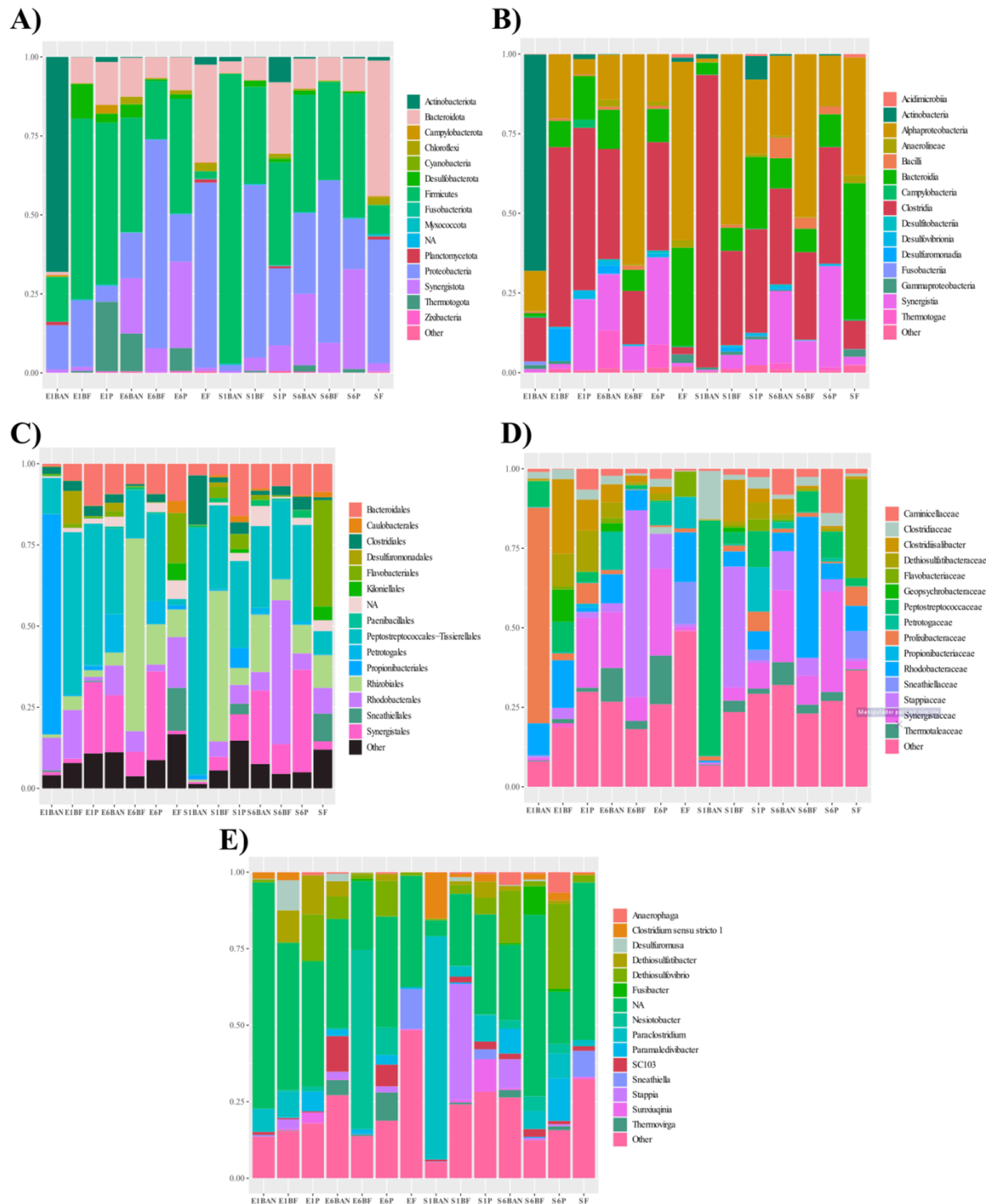
### 4.1 Diversidade bacteriana no sistema de dessulfatação de água do mar

Os fragmentos do gene 16S RNAr gerados a partir das diferentes amostras avaliadas foram associados a um total de 5976 ASVs, agrupadas em 26 filós, 50 classes, 122 ordens, 188 famílias e 298 gêneros (Figura 2). Ao analisar os filós relacionados às amostras frescas e enriquecidas, é possível observar a presença unânime de Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria e Synergistota (Figura 2A). Bacteroidota e Firmicutes se mostraram mais abundantes em SF e S1BAN, respectivamente, e Proteobacteria foi observado em maior número em EF. O filo Actinobacteriota esteve ausente em amostras de BFHT e Postgate E e apresentou abundância destacada em E1BAN. Foi possível observar a presença de Thermotoga nas amostras enriquecidas por seis meses nos meios BANHT e Postgate E (E6BAN, E6P, S6BAN, S6P), sendo maior a abundância na entrada da membrana (E6BAN e E6P). Chloroflexi e Desulfobacterota não foram observados nas amostras enriquecidas por seis meses no meio BFHT (E6BF e S6BF), mas foram os mais abundantes nas amostras de entrada enriquecidas por seis meses em BANHT e Postgate E (E6BAN e E6P).

No nível de classe (Figura 2B) foi observada a presença de nove das mais abundantes em todas as amostras, sendo elas: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Anaerolineae, Bacilli, Bacteroidia, Clostridia, Desulfovibrionia, Gammaproteobacteria e Synergistia. Para o nível de ordem (Figura 2C), nove das mais abundantes foram presentes em todas as amostras: Bacteroidales, Caulobacterales, Clostridiales, Flavobacteriales, Peptostreptococcales-Tissierellales, Petrotogales, Rhizobiales, Rhodobacterales e Synergistales. No nível de família (Figura 2D), apenas quatro das mais abundantes não foram observadas em todas as amostras, sendo elas Geopsychrobacteraceae, Petrotogaceae, Propionibacteraceae e Sneathiellaceae.

Na análise de gêneros (Figura 2E), observa-se uma maior variação entre as amostras. Quatro gêneros foram observados em todas as amostras, sendo eles: *Anaerophaga*, *Dethiosulfatibacter*, *Dethiosulfovibrio* e *Paramaledivibacter*. Nas amostras frescas, foi observada a presença de *Desulfuromusa* apenas na saída da membrana (SF), além da maior abundância de *Dethiosulfovibrio* e *Nitratireductor* nessa mesma amostra e da maior abundância de *Sneathiella* na amostra de entrada da membrana (EF). O gênero *Desulfuromusa* também estava presente em ambas as amostras enriquecidas por um mês no meio BFHT

(E1BF e S1BF) e na de entrada enriquecida por um mês no meio Postgate E (E1P), com abundância reduzida na última. Além disso, a grande abundância de *Nesiotobacter* na amostra de entrada em meio BFHT enriquecida por seis meses (E6BF) também se destaca.



**Figura 2:** Abundância relativa dos diferentes táxons de microrganismos presentes nas amostras frescas da entrada e saída de membrana de dessulfatação de água do mar e enriquecidas em meios de cultura por um e seis meses. Para cada táxon foram representados os 15 mais abundantes e os restantes foram agrupados em “Other”.  
**A) Filo. B) Classe. C) Ordem. D) Família. E) Gênero.**

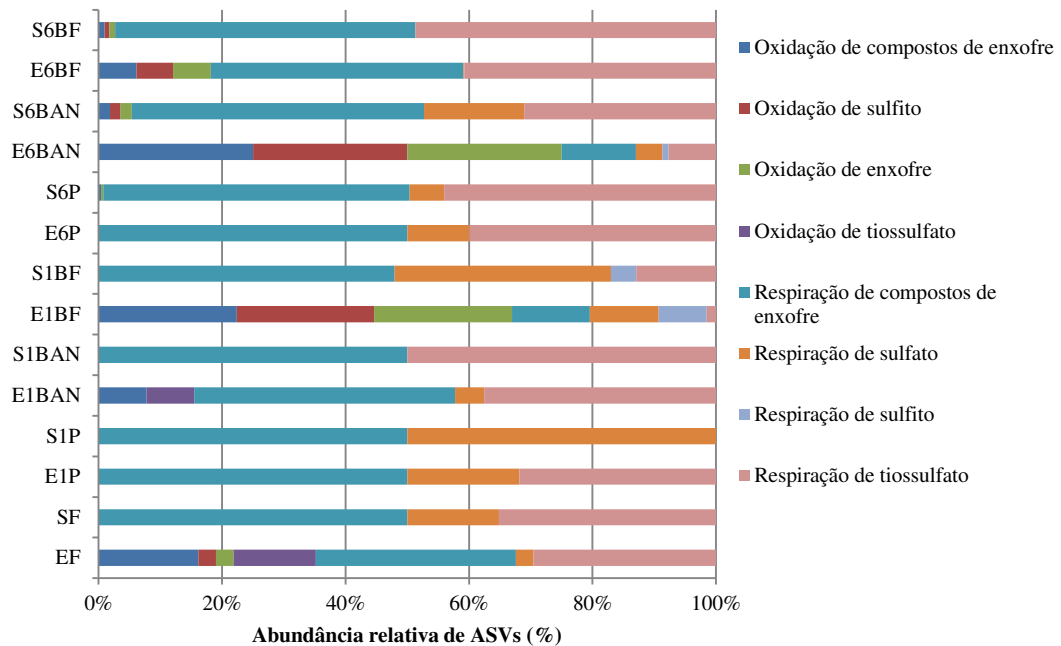
No que diz respeito ao grupo dos PRS, foco de maior interesse nesse trabalho, foram encontrados diversos gêneros pertencentes ao grupo, como *Desulfitibacter*, *Desulfocella*, *Desulfobulbus* e *Sulfitobacter*. *Fusibacter* foi encontrado em todas as amostras analisadas, enquanto *Desulfovibrio* estava presente em amostras de todos os meios de enriquecimento. Além disso, *Desulfobulbus* e *Desulfuromusa* estavam presentes nas amostras enriquecidas e *Dethiosulfatibacter* e *Dethiosulfovibrio* foram observados em todas as amostras analisadas. A representatividade dos PRS em relação à comunidade total variou entre 0,57 % e 29,93 % nas diferentes amostras analisadas, sendo a menor porcentagem referente à amostra de saída enriquecida por um mês em meio BANHT e a maior correspondente à amostra de saída enriquecida por seis meses em meio Postgate E (Tabela 2).

**Tabela 2 – Representatividade da população de PRS em relação à comunidade total.**

<b>Amostra</b>	<b>Representatividade de PRS (%)</b>
EF	1,12
SF	2,57
E1P	28,38
S1P	10,78
E1BAN	1,20
S1BAN	0,57
E1BF	20,60
S1BF	5,57
E6P	14,08
S6P	29,93
E6BAN	15,02
S6BAN	19,71
E6BF	2,76
S6BF	11,53

Na análise de predição funcional (Figura 3), foram observadas oito diferentes funções relacionadas ao metabolismo de enxofre, com destaque para a respiração de compostos de enxofre e de tiosulfato, observadas em todas as amostras analisadas. Além dessas funções, a respiração de sulfato foi observada em ambas as amostras frescas e nas amostras de enriquecimento em meio Postgate E. As amostras de entrada também apresentam, com

unanimidade, essas funções já citadas. Para o meio Postgate E, em ambos os tempos de enriquecimento, foi observado aumento de abundância das funções de respiração e redução das de oxidação. De maneira geral, houve predominância das funções de respiração sobre as de oxidação e as alterações de abundância das funções não apresentou nenhum padrão claro em relação ao meio ou tempo de cultivo utilizado no enriquecimento.

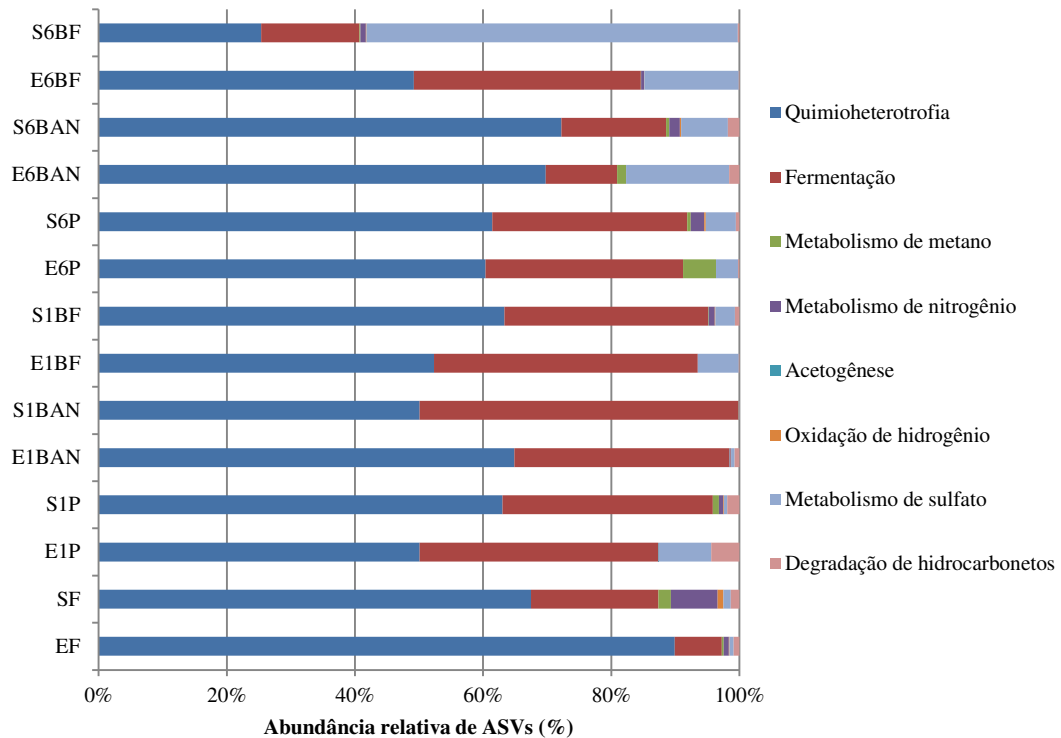


**Figura 3:** Abundância relativa de ASVs relacionadas a funções do metabolismo de enxofre em análise de predição funcional.

Uma visão mais geral da análise de predição funcional (Figura 4) demonstrou oito funções metabólicas principais relacionadas nas amostras analisadas. Degradação de hidrocarbonetos, quimioheterotrofia, fermentação e metabolismo de sulfato foram funções relacionadas a todas as amostras analisadas. Nas amostras frescas, apenas a acetogênese estava ausente, enquanto as amostras enriquecidas por um mês apresentavam apenas as funções observadas em todas as amostras como unânimes e as amostras enriquecidas por seis meses demonstraram, o metabolismo de metano, além das funções já citadas como presentes em todas as amostras. A quimioheterotrofia foi a função predominante em todas as amostras, com exceção da amostra de saída enriquecida por seis meses em meio BFHT (S6BF), que apresentou o metabolismo de sulfato como função de maior destaque. Enquanto isso, a acetogênese foi a de menor abundância em todas as amostras analisadas.

Essa análise evidenciou a perda de determinadas funções presentes nas amostras frescas em razão da especialização da comunidade devido ao enriquecimento da amostra, como o

metabolismo de metano e nitrogênio nas amostras de entrada cultivadas por um mês nos meios Postgate E e BFHT. Outras funções, como a degradação de hidrocarbonetos e a oxidação de hidrogênio, foram reduzidas nas amostras enriquecidas, mas não chegaram a ser perdidas. Além disso, o enriquecimento originou aumento de abundância de determinadas funções, como é o caso do metabolismo de sulfato nas amostras enriquecidas em Postgate E.



**Figura 4:** Abundância relativa de ASVs relacionadas a funções metabólicas gerais em análise de predição funcional.

Em relação aos índices de diversidade, *Shannon* apresentou média de 3,38 (Tabela 3). O maior valor observado foi da amostra de entrada da membrana (EF - 4,49), seguido da amostra de entrada enriquecida por seis meses em meio BANHT (E6BAN - 4,29) e da amostra de saída enriquecida por um mês em Postgate E (S1P - 4,19), as únicas com valores superiores a 4. O menor valor foi observado para a amostra de saída enriquecida por um mês em meio BANHT (S1BAN - 1,37), único valor de índice abaixo de 2.

Ao comparar as duas porções distintas da membrana, entrada e saída, não houve diferença significativa entre suas diversidades. Entre os diferentes meios de cultivo, BFHT e BANHT (2,99 e 2,98, respectivamente) apresentaram diversidade reduzida em relação às amostras frescas (4,21), mas que não diferem significativamente entre si, enquanto o meio Postgate E não apresenta diferença significativa em relação a nenhum dos dois conjuntos. Quanto ao

tempo de enriquecimento, o conjunto de amostras enriquecidas por um mês apresenta índice de diversidade significativamente menor que as amostras frescas (3,09 e 4,21, respectivamente), enquanto as amostras enriquecidas por seis meses, não apresentam diferença significativa em relação a nenhum dos outros conjuntos.

As amostras apresentaram riqueza média de 380, sendo o mínimo 214 – para S1BAN – e o máximo 626 – para EF (Tabela 3). As amostras frescas apresentam maior riqueza que as amostras enriquecidas nos diferentes meios de cultivo e não apresentam discrepância entre as porções de membrana (EF – 626 e SF – 592). Para as amostras enriquecidas, ao comparar os diferentes meios de cultivo, Postgate E, BFHT e BANHT apresentaram riquezas semelhante (327, 343 e 354, respectivamente); em relação ao tempo de cultivo, as amostras enriquecidas por um e seis meses apresentaram riqueza semelhante e menor que as amostras frescas (313, 369 e 609, respectivamente). Novamente, não foi observada diferença significativa entre os índices referentes às diferentes porções da membrana analisadas.

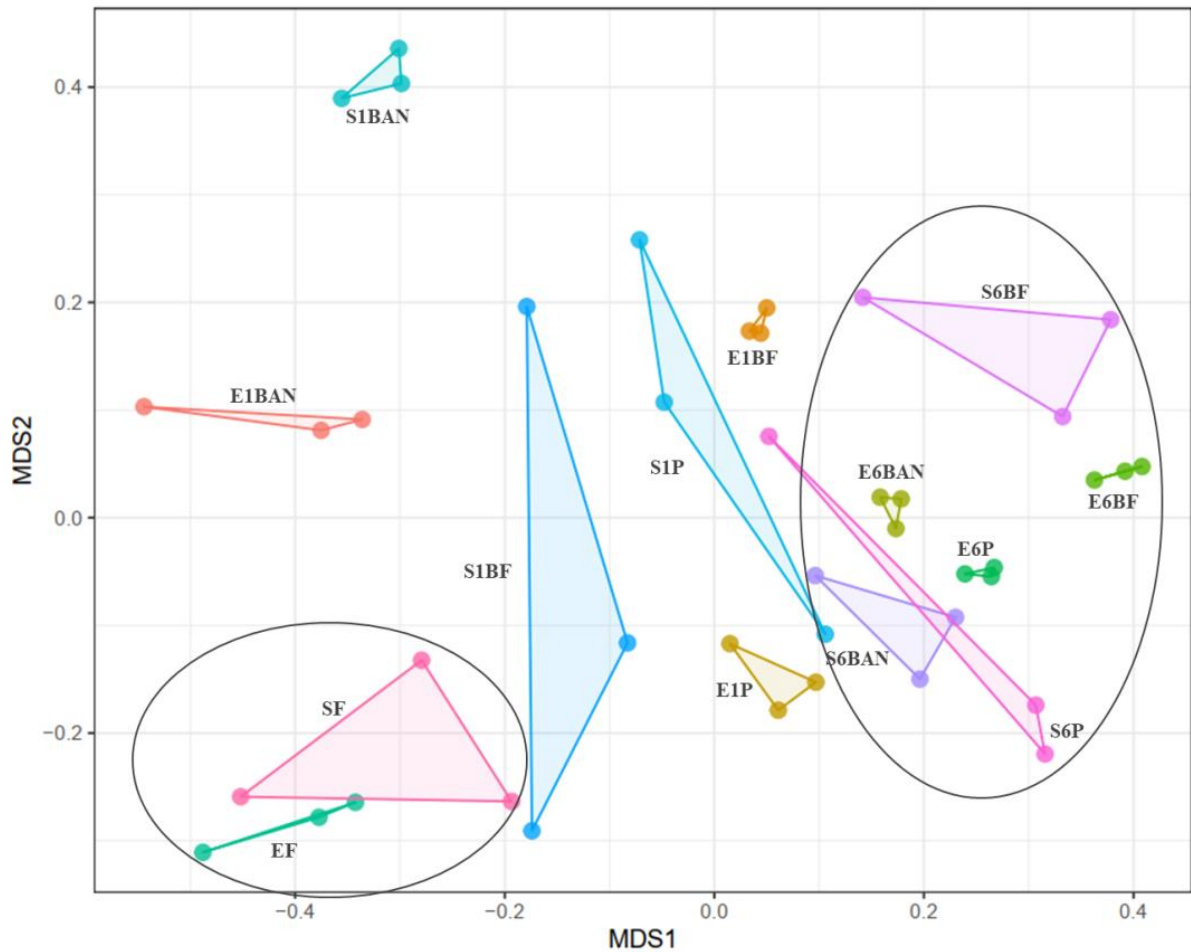
No quesito riqueza esperada, representada pelo índice de Chao-1 (Tabela 3), o valor médio foi de 417,7, sendo o maior 720,3 – para EF – e o menor 242,2 – para S1BAN. As amostras frescas (693,7) apresentaram índice maior que as enriquecidas nos diferentes meios (350,7 para Postgate E, 377,3 para BFHT e 387,1 para BANHT), sendo que esses não apresentaram diferenças significativas entre si. Em relação ao tempo de enriquecimento, não houve diferença entre um e seis meses (337,8 e 405,6, respectivamente), que apresentaram índice mais baixo do que as amostras frescas (693,7). Novamente, não foi observada diferença entre as porções de entrada e saída da membrana analisada. É importante destacar que a riqueza esperada foi maior que a observada para todas as amostras, mas as diferenças não foram muito altas, indicando boa cobertura da análise.

No que diz respeito à dominância, de modo geral, os índices mostraram uma baixa dominância entre as populações, sendo a amostra S1BAN a de maior índice (0,52) (Tabela 3). Opondo as amostras frescas às amostras enriquecidas, foi possível notar que, apesar do aumento dos índices para as amostras enriquecidas, apenas existe diferença significativa entre os meios de cultivo BANHT e Postgate E (0,22 e 0,07) Em relação ao tempo, não houve diferença entre os índices observados (0,181 para um mês e 0,138 para seis meses), assim como para as diferentes porções da membrana (0,12 para entrada e 0,17 para saída).

**Tabela 3** – Índices de diversidade de espécies de amostras frescas da entrada e saída de membrana de dessulfatação de água do mar e enriquecidas em meios de cultura por um e seis meses.

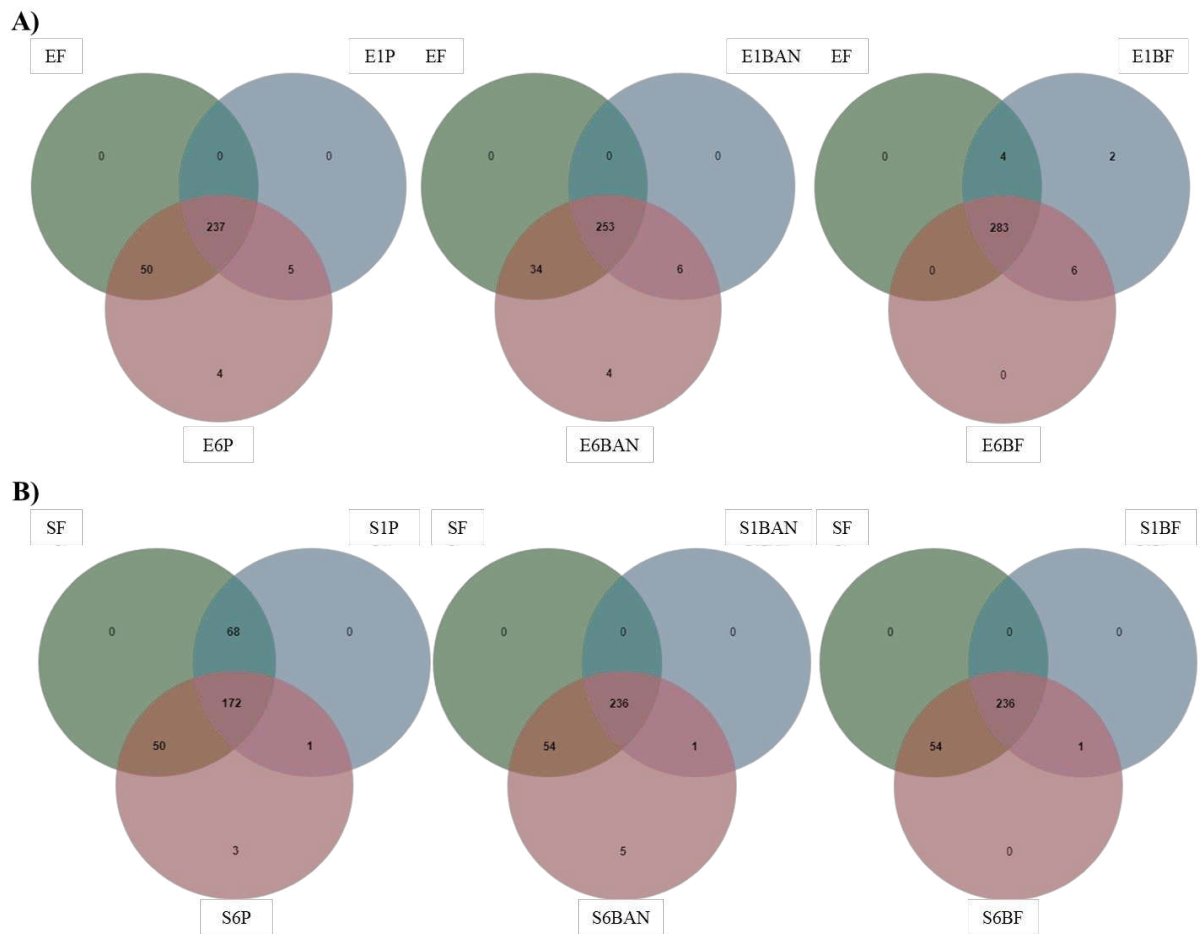
	<b>Diversidade</b> ( <i>Shannon</i> )	<b>Riqueza (S)</b>	<b>Chao-1</b>	<b>Dominância</b> ( <i>Simpson</i> )
<b>EF</b>	4,49	626	720,30	0,03
<b>SF</b>	3,93	592	667,10	0,09
<b>E1P</b>	3,71	238	256,03	0,05
<b>S1P</b>	4,19	413	426,23	0,05
<b>E1BAN</b>	2,42	258	273,50	0,24
<b>S1BAN</b>	1,37	214	242,20	0,52
<b>E1BF</b>	3,60	374	416,27	0,08
<b>S1BF</b>	3,24	382	412,33	0,15
<b>E6P</b>	3,92	321	362,20	0,05
<b>S6P</b>	3,13	336	358,43	0,13
<b>E6BAN</b>	4,29	486	533,67	0,04
<b>S6BAN</b>	3,86	460	499,03	0,07
<b>E6BF</b>	2,32	320	358,20	0,34
<b>S6BF</b>	2,79	294	322,37	0,20

A análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) usando o índice de Bray-Curtis mostrou que a maioria das amostras apresentaram uma comunidade microbiana particular (Figura 5). Observamos que as amostras enriquecidas por 6 meses apresentam menor dissimilaridade entre si e o mesmo pode ser observado para as amostras frescas, EF e SF. As amostras enriquecidas por um mês se encontraram dispersas, mostrando maior dissimilaridade entre as comunidades microbianas. As amostras se agruparam de acordo com o tempo de enriquecimento, independente da origem da amostra (se entrada ou saída da membrana) e do meio de enriquecimento. Dentre os diferentes meios de cultivo, as amostras enriquecidas em meio BANHT apresentaram maior dissimilaridade das comunidades.



**Figura 5:** Análise de escalonamento multidimensional não métrica (NMDS) usando índice de Bray-Curtis das amostras frescas da entrada e saída de membrana de dessulfatação de água do mar e enriquecidas em meios de cultura por um e seis meses. As amostras enriquecidas durante um mês apresentaram alta dissimilaridade, se encontrando dispersas horizontalmente, enquanto as amostras frescas apresentam baixa dissimilaridade, formando um grupo bastante coeso, assim como as amostras enriquecidas por seis meses (em destaque nos círculos cinza).

A análise de composição de cada amostra em nível de gênero (Figura 6) evidenciou que, apesar das diferenças demonstradas nos outros parâmetros analisados, existe grande semelhança entre ASVs encontradas. Ao contrapor os diferentes enriquecimentos às amostras frescas correspondentes, a sobreposição varia entre 76,6 % e 100 %, sendo a menor referente à amostra de saída enriquecida por seis meses em meio Postgate E e a maior compartilhada pelas amostras de entrada enriquecidas por seis meses em meio Postgate E e BANHT e por um mês em meio BFHT e de saída enriquecidas por 6 meses em meio BANHT e BFHT.

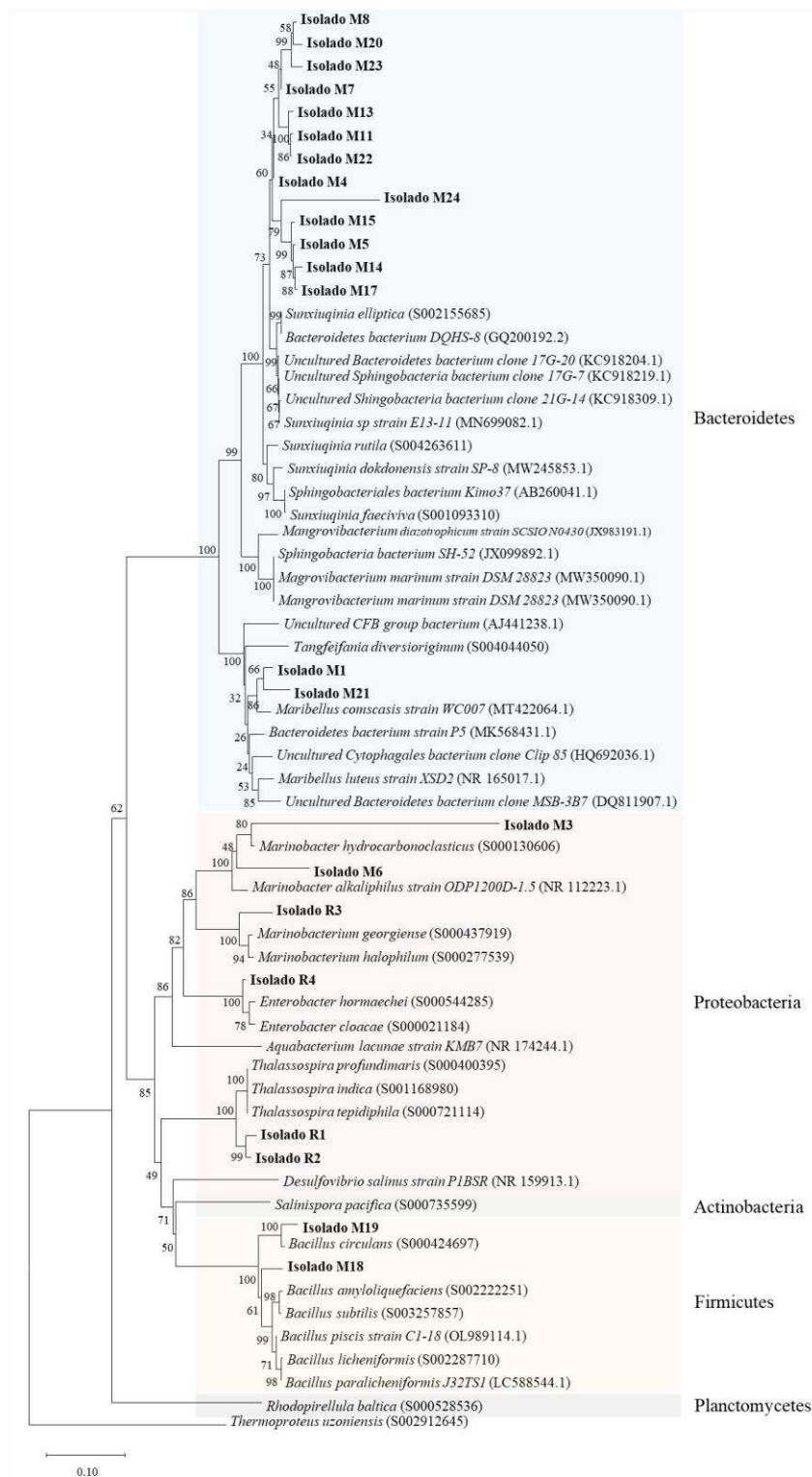


**Figura 6:** Diagramas de Venn referentes à comparação da composição em nível de gênero das comunidades das amostras frescas e enriquecidas nos diferentes meios de cultivo utilizados nesse trabalho de **A)** entrada e **B)** saída da membrana de dessulfatação de água do mar.

## 4.2 Isolamento bacteriano e identificação dos isolados

Foram obtidos 23 isolados, dos quais 10 foram provenientes da amostra da porção da entrada da membrana de dessulfatação, nove da amostra da saída da membrana e outros quatro foram obtidos a partir da amostra do rejeito do sistema. Todos eles foram nomeados com uma letra e um número, sendo a letra referente ao local de isolamento (M – membrana e R – rejeito) e o número referente à ordem de isolamento.

A comparação das sequências do gene RNAr 16S proveniente dos isolados com as existentes no banco de dados NCBI mostrou que os primeiros *hits* foram associados a sequências de organismos ainda não cultivados e, portanto, não identificados, além de sequências com identificação apenas de gênero. A análise filogenética dos 23 isolados mostrou a distribuição em três filos, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes, sendo que a maioria foi afiliada a este último (Figura 7).



**Figura 7:** Árvore filogenética dos isolados provenientes das amostras de sistema de dessulfatação de água do mar (membrana de dessulfatação e rejeito). Os códigos apresentados entre parênteses indicam o número de acesso das sequências da análise nos bancos de dados utilizados. Os códigos iniciados em S são ligados ao RDP e indicam organismos tipo, enquanto os iniciados em outras letras são relacionados ao *GenBank*. O organismo *Thermoproteus uzoniensis* foi utilizado como *outgroup* nessa análise.

Um grupo foi composto por organismos dos filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. Nesse agrupamento, dois dos isolados (M18 e M19) estão associados às sequências do filo Firmicutes, sendo que M19 se encontra em um braço ligado diretamente à *Bacillus circulans* (Figura 7). Outros seis isolados se mostraram mais próximos ao filo Proteobacteria, sendo dois isolados (R1 e R2) relacionados ao gênero *Thalassospira* (classe Alphaproteobacteria), quatro isolados (M3, M6, R3 e R4) relacionados à classe Gammaproteobacteria, sendo M3 e M6 mais próximos do gênero *Marinobacter*, R3 mais próximo do gênero *Marinobacterium* e R4 mais relacionado a *Enterobacter*.

Outro grupo, onde se encontra a maioria dos isolados, apresenta organismos pertencentes ao filo Bacteroidetes. Dos quinze isolados relacionados a esse filo, M1 e M21 se mostraram mais próximos aos organismos do gênero *Maribellus*, enquanto os outros treze se localizaram próximos ao gênero *Sunxiuqinia*, entretanto mostraram maior relação entre si do que com as sequências desse gênero depositadas no banco de dados.

Os *bootstraps* foram variáveis e os valores mais baixos foram associados a braços que envolveram isolados e/ou sequências de organismos não cultivados. Porém, existiram braços que relacionam isolados e organismos identificados até gênero ou espécie com *bootstrap* de 80-100 %, como M19 com *Bacillus circulans*, R1 e R2 com o gênero *Thalassospira*, R4 com o gênero *Enterobacter*, R3 com o gênero *Marinobacterium*, M3 com *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e M1 e M21 com *Maribellus comscasis*.

## 5. Discussão

As membranas de dessulfatação são tópico frequente de estudo em outras áreas do conhecimento, como na avaliação de modificações superficiais visando à otimização do fluxo e das condições de funcionamento do sistema de filtração (HUANG et al., 2021; NADY et al., 2011) e recebem certa atenção no campo da microbiologia, com estudos que abordam a redução de incrustações biológicas (KOCHKODAN; HILAL, 2015; MOHAMMAD et al., 2015). Entretanto, não são encontrados trabalhos na literatura relacionados à microbiota associada a essas membranas, de modo que os resultados do presente estudo apresentam grande aplicação tanto para a indústria petrolífera, como para os diversos setores em que membranas de nanofiltração semelhantes são aplicadas.

A comunidade microbiana identificada nesse estudo apresentou semelhanças com comunidades de água do mar provenientes da região da Califórnia, da costa da Índia, do mar Mediterrâneo, do oceano Atlântico e da costa brasileira no que diz respeito aos táxons mais abundantes, principalmente em nível de filo (RAIYANI; SINGH, 2020; UL-HASAN et al.,

2019; ZHOU et al., 2018). Alguns gêneros observados por Raiyani e Singh (2020) em elevada abundância, como *Bacillus*, *Marinobacter* e *Thalassospira*, foram observados nesse estudo, mesmo que não estejam entre os 15 de maior abundância. Amostras de sedimentos anóxicos marinhos também apresentam certas semelhanças de táxons com o presente estudo, como os filos Chloroflexi, Proteobacteria, Planctomycetes e Firmicutes (HOSHINO et al., 2020).

Além disso, a partir de diversos estudos de diversidade de comunidades microbianas marinhas, foi possível determinar alguns táxons “chave” desse ambiente, como o clado SAR11 de Alphaproteobacteria e os gêneros *Flavobacteria* e *Prochlorococcus* (SEYMOUR, 2014), que figuram nos resultados presentes na literatura assim como nos do presente estudo, mesmo que não entre os mais abundantes. Ainda, os índices de diversidade observados para as amostras frescas da membrana não foram muito diferente aos observados para as águas marinhas da costa californiana e indiana, com as maiores diferenças notadas no quesito dominância (RAIYANI; SINGH, 2020; UL-HASAN et al., 2019).

Apesar das semelhanças observadas, verificamos que as membranas apresentam estrutura de comunidade própria, com diferenças significativas em relação às comunidades de águas marinhas. Isso se deve ao fato de que as membranas estão inseridas em um ambiente complexo e sofrem ação de diversos químicos (HUPSEL et al., 2020; MOHANTY; PURKAIT, 2011). Além disso, é preciso considerar que a localização geográfica e, conseqüentemente, as diferentes condições físico-químicas a que cada comunidade está submetida (SEYMOUR, 2014) também apresentam influência sobre a comunidade observada.

A influência das condições físico-químicas sobre a comunidade é um elemento importante a ser considerado no momento do delineamento de procedimentos de limpeza e manutenção das membranas. Isso se deve ao fato de que, para maior eficiência do tratamento, ele deve ser direcionado à comunidade em questão, evitando a presença de população residual ou a seleção de microrganismos resistentes (ARAÚJO et al., 2013; SALGAR-CHAPARRO et al., 2020). Dessa forma, tratamentos alternativos, como a utilização de bacteriófagos ou diferentes antimicrobianos, poderia ser uma opção aos tratamentos com biocidas químicos frequentemente utilizados (LIN; BALLIM, 2012; MOTLAGH; BHATTACHARJEE; GOEL, 2016; ZAIN; SALLEH; ABDULLAH, 2018). Além disso, no contexto das membranas, é importante também adequar os tratamentos, visando um menor desgaste de sua estrutura (KOCHKODAN; HILAL, 2015; MOHAMMAD et al., 2015; MOHANTY; PURKAIT, 2011), e essas alternativas também poderiam contribuir nesse quesito.

A análise de predição funcional fornece uma visão geral das funções metabólicas presentes nas comunidades analisadas, evidenciando alterações nas funções de cada comunidade por ação do enriquecimento, não sendo possível determinar um efeito claro das condições utilizadas para o cultivo. Além disso, é preciso destacar que essa análise apresenta uma limitação bastante destacada, que é o fato de ser baseada em dados encontrados na literatura. Isso pode implicar na subestimação das funções encontradas, já que diversos microrganismos podem apresentar a função metabólica, mas essa ainda não está descrita e registrada (SANSUPA et al., 2021). Além disso, as nossas análises demonstraram grande abundância de organismos não identificados, o que também apresenta grande influência no resultado dessa análise.

Outro ponto interessante é a influência dos fatores tempo e meio de cultivo de enriquecimento na comunidade observada. Foi possível notar que o tempo que a amostra foi cultivada teve uma importância maior do que o meio utilizado para tal na composição da comunidade microbiana. Esse fato pode ser explicado pela semelhança na composição dos meios de cultivo utilizados, que são direcionados a grupos microbianos que apresentam certo grau de sobreposição (heterotróficos anaeróbios, heterotróficos anaeróbios facultativos e PRS), além do cultivo em condições semelhantes de temperatura. Caso fossem utilizados meios de cultivo de diferentes composições associados a diferentes condições de cultivo (JOINT; MÜHLING; QUERELLOU, 2010; MU et al., 2021), poderia ser observada uma importância maior desse fator na comunidade microbiana analisada.

Segundo Weissbecker, Buscot e Wubet (2017), a sobreposição de 70-80% de ASVs em relação à amostra controle é suficiente para caracterizar um método de preservação ou conservação como apropriado para manutenção da comunidade original. No nosso trabalho, todos os enriquecimentos apresentaram percentual de sobreposição em relação ao controle acima desse limite, sendo caracterizados como apropriados para a manutenção da comunidade das amostras frescas provenientes da membrana de dessulfatação de água do mar. Apesar de todas as condições de enriquecimento se mostrarem apropriadas à manutenção da comunidade, em uma visão geral de todas as análises, o meio Postgate E se mostra mais promissor para a manutenção dessas amostras. Além disso, esse meio é seletivo para os PRS e todos os esses fatores justificam a sua utilização no isolamento a partir das amostras de membrana de dessulfatação e nos experimentos subsequentes desse trabalho.

É interessante destacar que a membrana em análise nesse trabalho é utilizada para a remoção de sulfato da água de injeção, com o objetivo de reduzir a concentração desse

composto no sistema de exploração, contribuindo diretamente para o controle populacional do grupo dos redutores de sulfato (HUPSEL et al., 2020). Devido à possível concentração do composto nesse ambiente, nas nossas amostras foram observados alguns gêneros comumente relacionados ao grupo dos PRS, como *Desulfobulbus*, *Desulfocella*, *Desulfoplanes* e *Desulfovibrio* (PIRES et al., 2021; RABUS et al., 2015; SANTOS et al., 2020). Além disso, é preciso salientar que devido ao tamanho dos poros da membrana, ela também serve como barreira física à passagem desses microrganismos para espaços subsequentes do sistema de exploração de petróleo, contribuindo para a redução dos danos causados por eles nesse contexto (ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; ZARASVAND; RAI, 2014).

Devido à sua inserção em comunidades complexas, como as observadas nesse estudo, e à sua capacidade de formação de biofilmes, PRS frequentemente se encontram associados a outros microrganismos, os chamados satélites (KUSHKEVYCH, 2020; MUYZER; STAMS, 2008; RØDER et al., 2020). Esse é um fator limitante para a purificação e manutenção *in vitro* de representantes desse grupo microbiano. Além da utilização de um meio de cultivo seletivo para esses organismos, como o meio Postgate E anaeróbico, existem alternativas para auxiliar na separação dos PRS dos microrganismos satélites. Em nosso trabalho, a aplicação do meio de cultivo seletivo sem a utilização nenhuma alternativa adicional, permitiu a obtenção de colônias isoladas de coloração escura, o que era um indicativo da capacidade de redução de sulfato (KUSHKEVYCH, 2020).

A coloração escura das colônias é observada devido à precipitação de sulfato ferroso advindo da reação entre o  $H_2S$  produzido pelos microrganismos e o ferro adicionado ao meio. Apesar da via clássica para produção de sulfeto de hidrogênio ser a redução de sulfato, esse gás pode ser produzido por outras vias metabólicas microbianas, como a proteólise em ambientes anóxicos (DUNNETTE; CHYNOWETH; MANCY, 1985). Considerando que o cultivo dos isolados ocorreu em anaerobiose, essa pode ser uma possível explicação para a observação das colônias escuras de organismos que não foram relacionados com gêneros ou espécies de PRS descritos pela literatura, que ainda relata que *Sunxiuqinia elliptica* DQHS4 é capaz de produzir sulfeto de hidrogênio a partir de cisteína quando cultivada em Ágar 2216E a 30 °C (QU et al., 2011).

Ainda é preciso considerar que linhagens diferentes da mesma espécie bacteriana apresentem capacidades distintas de produção de sulfeto (TILLEY, 1923). Então, é possível que as sequências selecionadas para comparação filogenética sejam pertencentes a linhagens incapazes de produzir sulfeto e os isolados sejam capazes de produzir esse composto.

Portanto, é razoável considerar a possibilidade de os isolados produzirem sulfeto de hidrogênio por vias alternativas, o que justifica a observação das colônias de coloração escura.

O *Bootstrap* é um método estatístico que permite inferir sobre a confiança de relações estabelecidas a partir da construção de uma árvore filogenética. A técnica consiste em realizar réplicas da árvore com alinhamento de subconjuntos de sequências do alinhamento original, ou seja, com grupos amostrais distintos. Assim, o valor atribuído pela análise representa a porcentagem de aparições de determinado braço entre todas as árvores-réplica. Determinar um valor que indique a qualidade mínima não é simples, mas, frequentemente, *bootstraps* de 70 são adotados como referência de corte (CALDART et al., 2016; FELSENSTEIN, 1985).

Tomando esse valor como referência, observamos diversos braços que atenderam ao requisito de qualidade. A partir dessas relações foi possível verificar a identidade do isolado M19 como *Bacillus circulans* e a proximidade entre os pares de isolados: R1 e R2, M11 e M22, M14 e M17. Sobre os outros isolados, com base na topologia da árvore foi possível afirmar apenas a qual grupo foi relacionado, não sendo possível chegar de forma confiável à espécie. Portanto, análises complementares, como o sequenciamento de outros genes conservados – como *gyrB*, *recA* ou *rpoB*, genes funcionais com alta taxa de conservação (SANTOS; OCHMAN, 2004) – e testes de caracterização bioquímica – como produção de sulfeto de hidrogênio e de ácido, utilização de nitrato, citrato e de diferentes carboidratos (MANDRAGUTTI et al., 2021) – poderiam ampliar o conhecimento sobre esses isolados e fornecer resultados mais esclarecedores acerca de sua espécie.

Estudos que realizaram isolamento bacteriano a partir de amostras de sistema de dessulfatação não foram encontrados na literatura. Nenhum dos isolados obtidos foi relacionado aos filos Planctomycetes, Actinobacteria, nem às classes Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria, táxons que apresentam espécies capazes de reduzir sulfato, entretanto foram elencados como pertencentes a alguns dos filos mais abundantes em amostras relacionadas ao ambiente marinho (UL-HASAN et al., 2019).

Assim, os organismos que apresentaram relação com os isolados obtidos apresentam origens de isolamento condizentes com os resultados desse trabalho. Parte das sequências selecionadas para análise foi proveniente de isolados de ambiente marinho, como sedimentos marinhos, áreas costeiras e águas salgadas (CHANG et al., 2013, 2007; HUANG et al., 2014; KODAMA et al., 2008; QU et al., 2011; TAKAI et al., 2013; YOON; KASAI, 2014; ZHOU et al., 2019). Ainda, os organismos do gênero *Enterobacter* citados foram isolados a partir de efluentes industriais e *Thalassospira tepidiphila* apresenta relação mais direta com a indústria

petrolífera, já que foi isolada a partir de amostras de água contaminada por petróleo (KODAMA et al., 2008).

Ademais, um ponto bastante interessante a se destacar é a correlação entre os resultados da análise de diversidade e do isolamento realizados nesse estudo. De todos os gêneros observados na identificação dos isolados (Figura 7), apenas *Mangrovibacterium* e *Maribellus* não foram encontrados entre os táxons da análise de diversidade das amostras da membrana de dessulfatação de água do mar. Devido à presença de táxons não identificados, ainda é possível que esses organismos estejam presentes nas comunidades analisadas. Ainda, é interessante observar que o gênero *Sunxiuqinia*, ao qual 56,5% dos isolados foi relacionada, figura entre os 15 mais abundantes nas comunidades analisadas, presente em ambas as amostras frescas, demonstrando sua importância nesse contexto.

## 6. Conclusões e perspectivas

A análise de diversidade das amostras de membrana de dessulfatação de água do mar permite a ampliação do conhecimento acerca das comunidades microbianas existentes nesse ambiente ainda não explorado. Além disso, através da comparação de táxons, foi possível confirmar que essas comunidades apresentam semelhanças com comunidades de ambientes marinhos, mas exibem alguns grupos distintos que estão relacionados à sua inserção no sistema complexo da indústria petrolífera. Adicionalmente, foram observados gêneros de PRS, que chegam a representar quase 30% das comunidades em determinadas condições de enriquecimento utilizadas, confirmando a presença desse grupo nas membranas de dessulfatação. O conhecimento dessas comunidades permite uma tomada de decisão mais assertiva para combate e prevenção às bioincrustações.

Ainda, por meio da comparação das amostras frescas e das enriquecidas, foi possível concluir que o tempo de enriquecimento representa um fator com maior influência sobre a composição da comunidade do que o meio de cultivo selecionado para esse processo. Essa é uma observação interessante a ser levada em conta durante o planejamento de um experimento de enriquecimento. Além disso, de acordo com as sobreposições observadas entre as amostras frescas e enriquecidas em nível de gênero, é possível manter as amostras originais preservadas por até seis meses nos meios BANHT, BFHT ou Postgate E, sendo as comunidades obtidas representativas daquelas analisadas nas amostras frescas. Assim, é possível a manutenção dessas amostras em laboratório, permitindo a realização de diferentes análises a partir das amostras de membrana de dessulfatação de água do mar.

A análise de amostras de membranas de dessulfatação de diferentes localidades seria uma adição interessante aos resultados apresentados nesse trabalho, permitindo a comparação dos resultados com os de amostras do mesmo tipo e o melhor entendimento sobre a influência das condições físico-químicas do ambiente na composição dessas comunidades microbianas.

Os 23 isolados obtidos a partir das amostras de sistema de dessulfatação são relacionados aos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Apesar do desenvolvimento da coloração escura no meio Postgate E com ferro, os isolados não foram identificados como pertencentes ao grupo dos PRS, sendo agrupados em sete gêneros, *Sunxiuqinia*, *Bacillus*, *Maribellus*, *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Enterobacter* e *Thalassospira*. O conhecimento acerca destes isolados é promissor, pois viabiliza o controle populacional das comunidades em que estão inseridos, e este trabalho foi o primeiro que isolou microrganismos desse tipo de amostra. A partir disso, é possível pensar na realização de isolamentos em diferentes meios e condições de cultivo e amostras de outros sistemas de dessulfatação, visando o maior conhecimento da fisiologia dos microrganismos que colonizam esse sistema.

Além disso, é de extrema importância a realização da caracterização bioquímica e da análise filogenética a partir de outros genes desses isolados. Ambas as análises fornecerão informações relevantes desses isolados e dos papéis que desempenham na comunidade em questão, que apresenta grande relevância industrial e ambiental.

## **CAPÍTULO 2 - SUSCEPTIBILIDADE DA MICROBIOTA À AÇÃO PREVENTIVA E CORRETIVA DE BIOCIDA UTILIZADO NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO**

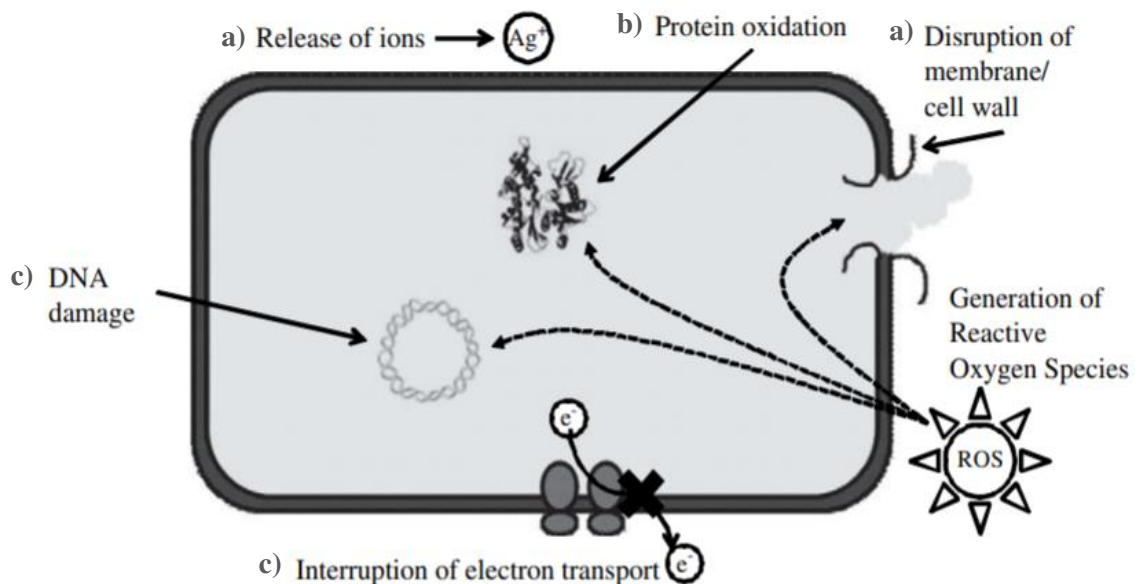
### **1. Introdução**

A extração de petróleo é um processo que depende diretamente da pressão interna do reservatório. Ao longo do tempo de exploração, a pressão dos reservatórios decai naturalmente e deve ser reestabelecida. Para isso, é necessária a injeção de um fluido aquoso, chamado de água de injeção (AI), para que a pressão se eleve novamente e permita que o petróleo seja extraído com maior eficiência (HUPSEL et al., 2020). No interior dos poços, essa água entra em contato com a água de formação (AF), de origem geológica e composição variável de acordo com a localidade e quando esse conjunto entra em contato com os químicos de produção (aqueles inseridos em qualquer fase da exploração), é formada a água de produção (AP) (AL-GHOUTI et al., 2019; NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011).

A AP é um dos produtos gerados na exploração de petróleo e sua produção é crescente ao longo do tempo de exploração do poço. Em plataformas nas quais a exploração é recente, representa 5-15 % do volume total de petróleo, podendo chegar até 90 % com o passar do tempo, devido ao aumento do montante de AI adicionada àquele poço (DE SOUZA et al., 2017). Na composição da AP são observados compostos orgânicos e inorgânicos, diluídos e em suspensão, que variam com as propriedades do poço, como profundidade e características geoquímicas (AL-GHOUTI et al., 2019). Assim como o poço, toda a extensão da plataforma é colonizada por microrganismos, que estão associados a problemas operacionais e prejuízos para indústria petrolífera, com destaque para a corrosão influenciada microbiologicamente (MIC, microbiologically influenced corrosion) de estruturas metálicas (LITTLE et al., 2020). Assim, é essencial atuar no controle e na remoção dos microrganismos desse ambiente.

Dentre as diversas opções para controle microbiano em ambientes associados à produção de petróleo, como a limitação de sulfato, a remoção física de biofilmes, a aplicação de nitrito ou nitrato e o uso de bacteriófagos (MOTLAGH; BHATTACHARJEE; GOEL, 2016; SHEN et al., 2018; SOKOLOVA et al., 2021; XUE; VOORDOUW, 2015), a técnica mais aplicada é a utilização de biocidas químicos (ARAÚJO et al., 2013). Os biocidas químicos são formulações contendo solventes e aditivos, visando aumento da eficácia, além do composto ativo, o verdadeiro responsável pela ação antimicrobiana (JACK, T.R; WESTLAKE, 1995).

Os principais compostos ativos aplicados na indústria petrolífera são o glutaraldeído e os sais quaternários de amônio e fosfônio (CAVALCANTI, 2001; JURELEVICIUS et al., 2020). A ação desses químicos se dá por supressão do crescimento e/ou atividade metabólica, que ocorre em função de diferentes mecanismos, como (a) modificações na membrana celular, aumentando sua permeabilidade e ocasionando perda de material intracelular; (b) interferência na estrutura e ação de proteínas chave do metabolismo celular ou (c) danos ao seu material genético, ocasionando a morte dos organismos (Figura 1) (ARAÚJO et al., 2013; CAVALCANTI, 2001). Diferentemente dos antibióticos, os biocidas apresentam amplo espectro de ação, visando efeitos sobre a comunidade bacteriana como um todo, o que fica evidenciado pelos seus possíveis mecanismos de ação. Porém, é possível que alguns organismos apresentem mecanismos intrínsecos de resistência a determinados biocidas ou os adquiram, devido ao uso inapropriado dos químicos (KEASLER et al., 2017).



**Figura 1:** Mecanismos de ação de biocidas químicos em células microbianas. A ação pode ocorrer por: a) modificações na membrana celular, b) interferência em estrutura ou atividade proteica ou c) danos ao material genético. Adaptada de Li *et al* (2008).

O Sulfato de Tetrakis Hidroximetil Fosfônio (THPS) é um dos biocidas amplamente utilizado na indústria petrolífera (HAACK, THOMAS K., DOWNWARD; TALBOT, 1997). Esse químico apresenta baixo potencial de bioacumulação e é biodegradável, o que são características interessantes para sua aplicação em contexto ambiental. Além disso, a hidrólise do composto ocorre nas condições em que ele é aplicado, sendo dependente de pH e resultando em meia vida entre 72 e 7 dias (pH 7-9) (BENSON et al., 2000; EHS SUPPORT,

2021). Dentre os possíveis mecanismos de ação dos biocidas, o THPS age, principalmente, sobre as proteínas celulares. Mais especificamente, esse químico atua pela interferência em ligações do tipo dissulfeto e grupos tiol, resultando em desnaturação proteica e desestabilização celular (CAVALCANTI, 2001; KEASLER et al., 2017; MORRIS; VAN DER KRAAN, 2017). Outro efeito importante desse biocida para um contexto em que PRS estão inseridos é a redução do teor de H<sub>2</sub>S em solução por ação de espécies químicas liberadas no meio durante sua aplicação, resultando na neutralização desse composto nocivo à indústria e ao ambiente (MOISEEV; JAMES, 2020).

Esses compostos podem ser aplicados em diferentes protocolos, que se diferenciam, principalmente, pela finalidade e frequência do tratamento. Além disso, também é possível pensar na utilização de sondas mecânicas para auxiliar na distribuição do químico e eficácia do tratamento. Frequentemente, esse tratamento está associado ao uso de outros químicos, como quelantes de cátions e inibidores de corrosão, de maneira a tornar o controle biológico ainda mais efetivo (CAVALCANTI, 2001; JACK, T.R; WESTLAKE, 1995). Além disso, a forma de vida das bactérias também é um fator determinante na eficiência do tratamento, já que organismos sésseis contam com uma resistência adicional, que se deve tanto à barreira física constituída pela matriz extracelular, quanto à redução do metabolismo celular nessas condições (BAS; KRAMER; STOPAR, 2017; COS et al., 2010).

Assim, visando a maior eficiência do tratamento, é preciso (1) escolher um biocida apropriado ao contexto; (2) determinar a concentração apropriada para erradicação da comunidade microbiana e (3) encontrar o protocolo adequado de dosagem para que a comunidade seja controlada por um período considerável. Esses fatores devem ser pensados visando ação sobre a maior parte dos organismos da comunidade e o não desenvolvimento de novos mecanismos de resistência dos organismos, o que tornaria o tratamento ineficiente (ARAÚJO et al., 2013; JACK, T.R; WESTLAKE, 1995).

Para determinar a abordagem mais apropriada para o tratamento com biocida, o monitoramento da comunidade microbiana é uma etapa fundamental (BENNET, 2017; SKOVHUS; ECKERT; RODRIGUES, 2017). A quantificação de microrganismos auxilia no entendimento do contexto inicial da comunidade e na escolha do tratamento mais adequado, assim como permite avaliar a eficiência do tratamento e determinar a periodicidade de novas dosagens. Para a quantificação das comunidades microbianas podem ser usados métodos dependentes ou independentes do cultivo microbiano (BENNET, 2016; KEASLER et al., 2013). Atualmente, os métodos dependentes de cultivo são mais aplicados na indústria de

petróleo devido à padronização já estabelecida pela *NACE International* (NACE, 2004), autoridade mundial em soluções para controle da corrosão.

Dentre as técnicas mais aplicadas, a do Número Mais Provável (NMP), que consiste na estimativa do grupo microbiano alvo na amostra avaliada, se destaca. Para o grupo dos Procariotos Redutores de Sulfato (PRS), um dos principais responsáveis pela MIC na indústria de petróleo (BROWN; TURNER, 2019; ECKERT; SKOVHUS, 2018; KHOUZANI et al., 2019; SOKOLOVA et al., 2021), é utilizado meio de cultivo anaeróbio contendo ferro, cuja reação com o sulfeto metabólico forma precipitado, que é utilizado como indicador de crescimento microbiano. Diluições seriadas da amostra e o cultivo em triplicata resultam na maior confiabilidade da técnica (BENNET, 2016; BHAGOBATY, 2014; NACE, 2004).

Apesar de ser uma técnica de baixo custo, o NMP é laborioso e, para os PRS, necessita de incubação da cultura por 28 dias, período muito longo para tomada de decisão corretiva (BENNET, 2016). Além disso, a detecção por esse método depende dos organismos estarem metabolicamente ativos e é estimado que até 80% das comunidades ambientais podem estar dormentes ou inativas (KEASLER et al., 2013) e a manipulação da cultura durante a amostragem, somada a alteração das condições naturais de crescimento podem causar a morte de organismos da comunidade, podendo reduzir a viabilidade a 10% das populações originais (BENNET, 2016). Assim, como em todas as técnicas dependentes de cultivo, o maior entrave do NMP é a detecção de uma comunidade diferente da real, além da impossibilidade de quantificar indivíduos que não podem ser cultivados em condições artificiais de laboratório (MAUERHOFER et al., 2019; SKOVHUS; ECKERT; RODRIGUES, 2017).

Devido às limitações dessa técnica, existe uma crescente tendência de estudos para aplicação de métodos moleculares para a caracterização e o monitoramento de comunidades microbianas (BONADONNA; BRIANCESCO; LA ROSA, 2019; KEASLER et al., 2013; MARTIN-SANCHEZ; GORBUSHINA; TOEPEL, 2018; MAUERHOFER et al., 2019; SENTHILMURUGAN et al., 2021). Esses métodos poderiam agilizar a obtenção de resultados, reduzir o limite inferior de detecção e ainda tornar a quantificação mais precisa e representativa, por possibilitarem a detecção de indivíduos ainda não cultiváveis (KEASLER et al., 2013; SENTHILMURUGAN et al., 2021). Nesse contexto, são propostas alternativas como técnicas quantitativas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como qPCR ou ddPCR, ou a citometria de fluxo aliada à utilização de sondas (*Flow-FISH*) (KEASLER et al., 2013; MARTIN-SANCHEZ; GORBUSHINA; TOEPEL, 2018). Ainda, a utilização de técnicas baseadas na quantificação de metabólitos, como o ATP ou da produção de sulfeto,

representariam uma forma promissora de monitorar a atividade microbiana (BONADONNA; BRIANCESCO; LA ROSA, 2019).

O ddPCR se baseia na partição da amostra a ser avaliada em nano gotas e na ocorrência da reação de PCR em cada uma das partições, o que contribui para a redução do limite de detecção. Ao associar essa distribuição à estatística de Poisson, é possível realizar a quantificação de DNA na amostra, sem o uso de curvas de calibração ou padrões. Essa é uma técnica potencialmente mais precisa e reproduzível que a PCR quantitativa (qPCR). Além disso, a técnica permite também a detecção de organismos não cultiváveis, já que é independente de cultivo (BONADONNA; BRIANCESCO; LA ROSA, 2019; CAO et al., 2020; NETZER et al., 2021). A principal desvantagem da técnica está relacionada ao alto custo, o que pode inviabilizar sua aplicação em larga escala (BONADONNA; BRIANCESCO; LA ROSA, 2019). Além disso, a recente aplicação da metodologia em contexto ambiental representa uma limitação, exigindo maiores esforços e estudos para sua correta aplicação. Essa limitação deve ser superada rapidamente com a difusão da metodologia (CAO et al., 2020; NETZER et al., 2021).

A citometria de fluxo possibilita a quantificação do número total de células presente em uma amostra, além da presença de determinados genes ou viabilidade celular por meio de marcação com corantes e sondas específicas (HAMMES et al., 2008; LIU et al., 2013; SAFFORD; BISCHEL, 2019; VAN NEVEL et al., 2017; WANG et al., 2010). Outras vantagens da técnica são a rapidez e a independência de etapa de extração e como desvantagens, podem ser destacadas a análise de dados sofisticada, a dependência de um laboratório e mão de obra especializada (WANG et al., 2010). Além disso, é possível que o tempo de resposta da análise seja maior que o de outras metodologias de monitoramento microbiológico independentes de cultivo (VAN NEVEL et al., 2017).

O ATP é uma molécula presente em todas as células vivas e está diretamente envolvida no metabolismo celular e sua quantificação em amostras permite a avaliação da atividade biológica e microbiana em determinado contexto. Para isso, as células da amostra são lisadas e o conteúdo de ATP é quantificado por reação enzimática fluorescente. Essa técnica é rápida, apresenta um baixo limite de detecção, inclui os organismos não cultiváveis na análise e, em teoria, pode ser realizada em campo. Por outro lado, a precisão da técnica é baixa em comunidades com contagem celular muito reduzida e, dependendo do protocolo aplicado, não é possível diferenciar a origem do ATP quantificado (intra- ou extracelular) (BONADONNA; BRIANCESCO; LA ROSA, 2019; ZHANG et al., 2019).

Todas as técnicas supracitadas representam alternativas para a resolução dos gargalos apresentados na técnica de NMP, que é o padrão utilizado para avaliação da eficiência de biocidas químicos. Desta forma, neste trabalho utilizamos essas metodologias para quantificação de PRS antes e depois da aplicação do biocida THPS.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da aplicação corretiva e preventiva de THPS na dinâmica da comunidade de PRS e de bactérias totais de água de produção por diferentes metodologias.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Montar os tratamentos corretivo e preventivo, pela inoculação de água de produção de petróleo em meio de cultivo para PRS com e sem adição de THPS;
- Quantificar PRS planctônicas e sésseis nos tratamentos corretivo e preventivo com e sem adição de THPS por NMP;
- Quantificar PRS, pelo gene *dsr*, e bactérias totais, pelo gene 16S RNAr, presentes nas comunidades planctônica e sésil dos tratamentos corretivo e preventivo com e sem adição de THPS por PCR digital;
- Quantificar a produção de ATP de comunidades planctônica e sésil dos tratamentos corretivo e preventivo com e sem adição de THPS por fluorescência;
- Quantificar a produção de H<sub>2</sub>S nos tratamentos corretivo e preventivo com e sem adição de THPS por titulação potenciométrica;
- Comparar as metodologias de quantificação microbiana e monitoramento de PRS.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1 Montagem dos microcosmos e tratamentos com THPS**

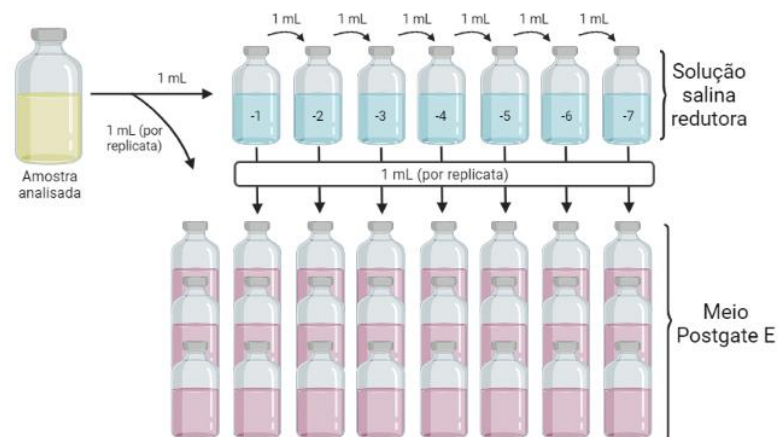
Foram realizados dois tipos de tratamento usando biocida: um corretivo, em que se observa a capacidade de ação do químico sobre uma comunidade planctônica já desenvolvida e de eliminação de biofilmes já formados; e outro preventivo, em que se analisa a capacidade do biocida de impedir ou retardar o desenvolvimento da comunidade e a consequente formação de biofilmes. Para ambos, a dosagem e os tempos de análise foram determinados com base nos padrões estabelecidos pela NACE Standard TM0194-2004 (NACE, 2004).

- **Experimento corretivo:** foram adicionados em tubos de penicilina de 50 mL, 45 mL de meio Postgate E adaptado (sem ferro e sem ágar) e 5 mL de amostra de água de produção. Esses tubos ficaram incubados a 30 °C, sem agitação, por 72 horas. Após esse tempo, foram adicionados em cada um dos tubos quatro cupons de aço de 3 cm<sup>2</sup> (3 cm x 1 cm), sendo três para extração de DNA, NMP e citometria, e outro para quantificação de ATP. Após 3, 5, 7 e 9 dias de incubação do microcosmo foi feita a dosagem de biocida de 200 ppm de THPS (Sulfato de Tetrakis Hidroximetil Fosfônio) em cada tubo e as análises de quantificação foram realizadas após 4 e 24 horas do tratamento.

- **Experimento preventivo:** foram adicionados em tubos de penicilina de 50 mL, 45 mL de meio Postgate E adaptado (sem ferro e sem ágar) e 5 mL de amostra de água de produção. Esses tubos ficaram incubados a 30 °C, sem agitação, por 72 horas. Após esse tempo, foram adicionados em cada um dos tubos quatro cupons de aço de 3 cm<sup>2</sup> (3 cm x 1 cm), sendo três para extração de DNA, NMP e citometria, e outro para quantificação de ATP. Logo após a montagem do microcosmo, foi feita a dosagem de 200 ppm de THPS (Sulfato de Tetrakis Hidroximetil Fosfônio) em cada tubo. Os tubos permaneceram incubados por 3, 5, 7 e 9 dias, períodos em que os cupons foram retirados para análise.

### 3.1.1 Quantificação de PRS por NMP

Para a montagem dos kits de NMP foram utilizados tubos de penicilina de 10 mL contendo meio Postgate E (seção 3.1.1 do Capítulo 1) ou solução salina redutora (3,5% m/v de cloreto de sódio e 0,124 g/L de tioglicolato de sódio), sendo que cada kit o continha oito tubos de penicilina com Postgate E em triplicata, totalizando 24 tubos, e 7 tubos de penicilina com solução salina para diluição seriada do inóculo ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) (Figura 1).



**Figura 2:** Esquema do método de Número Mais Provável (NMP). Imagem criada com BioRender (<https://app.biorender.com>).

Para a quantificação da comunidade planctônica, uma alíquota de 4 mL do sobrenadante do microcosmo foi retirada para o NMP, sendo 1 mL usado para a diluição seriada e os demais 3 mL para aplicação de 1 mL em cada tubo da triplicata sem diluição. No caso dos biofilmes, os três cupons inoculados foram sonicados (3 ciclos de 1 minuto, 40 HTz, 135 W) em solução salina redutora (3,5% m/v de cloreto de sódio e 0,124 g/L de tioglicolato de sódio) e uma alíquota de 4 mL foi utilizada para quantificação por NMP, conforme descrito acima para a comunidade planctônica.

Após 28 dias de incubação a 30 °C, o número de tubos positivos – aqueles em que é observado precipitado escuro de sulfato de ferro – de cada diluição foi utilizado para obtenção do NMP de PRS em cada amostra avaliada (BENNET; HOFFMANN, 2018; NACE, 2004).

### **3.1.2 Quantificação microbiana por PCR digital (ddPCR)**

Para a quantificação da comunidade planctônica do microcosmo por ddPCR, a cultura líquida foi centrifugada a 6000 g por 10 minutos, o *pellet* foi lavado duas vezes com tampão SET (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA) e ressuspendido em 500 µL do mesmo tampão.

Já para a comunidade sésil, cada um dos três cupons incubados para extração de DNA foi transferido para um tubo de penicilina de 10 mL contendo 10 mL de solução salina (3,5 % m/v) acrescida de 1 % (v/v) de solução de tioglicolato de sódio (12,4 g/L). Os cupons foram submetidos a três ciclos de sonicação (40 HTz, 135 W) de 1 minuto cada e os 30 mL de solução salina foram centrifugados a 6000 g por 10 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com tampão SET (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA) e ressuspendido em 500 µL do mesmo tampão.

Os *pellets* ressuspendidos foram submetidos à extração de DNA pelo protocolo descrito por Silva e colaboradores (2010) (seção 3.1.3 do Capítulo 1). O DNA extraído foi ressuspendido em 100 µL de água destilada autoclavada, no caso das células planctônicas, e em 50 µL, no caso das células sésseis. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% (m/v) e em seguida foi quantificado no Qubit 4 (Invitrogen, Carlsbad - USA). As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 1,5 pg/mL.

A técnica de PCR digital em gota se divide em quatro etapas: montagem da reação de PCR, formação de gotas, amplificação e leitura das gotas. A reação de PCR continha 10 µL de QX200 ddPCR *EvaGreen Supermix* (BIO-RAD, Hercules - USA), 1 µL de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) na concentração de 2 µM, 3 µL de DNA diluído e 5 µL de água

ultrapura. Todo o volume da reação de PCR foi transferido para suportes apropriados junto com 60 µL de óleo para geração de gotas e o suporte foi levado ao equipamento de formação de gotas (BIO-RAD, Hercules - USA). As gotas prontas foram recuperadas e transferidas para uma placa de PCR de 96 poços, que foi vedada e levada para o termociclador (BIO-RAD, Hercules - USA). Após a finalização da reação de amplificação, a placa foi levada para o contador de gotas e o *threshold* da leitura foi ajustado manualmente para cada *primer* de acordo com o controle sem DNA (branco).

Para a quantificação de bactérias totais foram usados *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (LANE *et al.*, 1991) e 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993) para o gene 16S RNAr. Para a quantificação dos PRS foram usados *primers* dsr1F-deg (5'-ACSCAYTGGAARCACG-3') e PJdsr853-deg (5'-CGGTGMAGYTCRTCCTG-3') (QUILLET *et al.*, 2012) para o gene *dsr*.

O programa usado para amplificação foi de 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 1 minuto – para o gene 16S RNAr – ou 55 °C por 1 minuto e 30 segundos – para o gene *dsr* – e 72 °C por 2 minutos; 4 °C por 5 minutos e por último 90 °C por 5 minutos, antes do resfriamento final a 4 °C. Em todos os passos, foi adicionada rampa de temperatura de 2°C/segundo.

### 3.1.3 Contagem de células microbianas por citometria de fluxo

Para quantificação das células totais das amostras, alíquotas de 1 mL de cada amostra foram fixadas com paraformaldeído 3,7% (v/v), na proporção de 1:3 Essa mistura foi armazenada em geladeira até o momento da análise, quando foi lavada com água destilada. Após lavagem e centrifugação a 12000 g por 10 minutos, as células foram ressuspensas em 1 mL da água mili-Q autoclavada. A contagem de células totais foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, New Jersey - USA) e a leitura foi fixada para o volume de 50 µL de amostra.

### 3.1.4 Quantificação de ATP

O kit *QuenchGone™ Organic Modified* (QGO-M™) (LuminUltra, Canada) foi utilizado para avaliação da comunidade planctônica, onde uma alíquota de 1 mL do sobrenadante do microcosmo foi recolhida e a análise procedeu de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante até a leitura da amostra.

No caso da comunidade do biofilme, foi utilizado o kit *Deposit & Surface Analysis* (DSA™) (LuminUltra, Canada). Os cupons de 3 cm<sup>2</sup> retirados dos microcosmos foram usados diretamente para análise, que procedeu de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante até a leitura da amostra.

A leitura foi realizada no equipamento PhotonMaster™ (LuminUltra, Canada). Inicialmente, o leitor foi calibrado utilizando um tubo teste, onde foram adicionadas 2 gotas de UltraCheck1 (LuminUltra, Canada) e 100 µL de Luminase (LuminUltra, Canada). Em seguida, em novos tubos foram adicionados 100 µL de cada amostra e 100 µL de Luminase (LuminUltra, Canadá) e as amostras foram lidas.

Para as amostras da comunidade planctônica, o resultado da quantificação foi calculado a partir da fórmula:  $cATP = \frac{RLU_{cATP}}{RLU_{ATP}} \times \frac{10000}{V}$ , onde  $RLU_{cATP}$  é o valor de leitura de cada amostra,  $RLU_{ATP}$  é o valor de leitura da calibração e  $V$  é o volume de alíquota usado para o protocolo, em mL. O valor final de  $cATP$  é dado em pg ATP/mL.

Para as amostras de biofilme, o resultado da quantificação foi calculado a partir da fórmula:  $tATP = \frac{RLU_{tATP}}{RLU_{ATP1}} \times \frac{50000}{\text{área}}$ , onde  $RLU_{tATP}$  é o valor de leitura de cada amostra,  $RLU_{ATP1}$  é o valor da leitura de calibração e área é a área do cupom analisado em cm<sup>2</sup>. O valor final de  $tATP$  é dado em pg ATP/cm<sup>2</sup>.

### 3.1.5 Titulação de H<sub>2</sub>S

A quantificação da produção de sulfeto de hidrogênio dos microcosmos foi realizada utilizando um titulador compacto automático G10S (Mettler Toledo, Columbus - USA). Alíquotas de 1 mL de meio foram retiradas dos microcosmos, com seringa estéril e adicionadas a um copo de titulação contendo 50 mL de NaOH 1 M e 5 mL de solução concentrada de NH<sub>4</sub>OH. As amostras foram tituladas com solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1 M.

### 3.2 Análise estatística dos dados

Todas as análises foram realizadas em triplicata. A comparação das médias foi realizada usando o *software* MiniTab 17.1.0 (Minitab Inc., State College - USA) por ANOVA, seguida de teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de p-valor menores que 0,05 foram considerados significantes.

## 4. Resultados

### 4.1 Aplicação corretiva de THPS

O Número Mais Provável (NMP) de Procariotos Redutores de Sulfato (PRS) dos tratamentos apresentou diferenças em relação ao controle nos diferentes tempos analisados (Figuras 3A e 3B). Destaca-se que, para ambas as populações, planctônica e sésil, houve um ponto que resultou no aumento da quantificação celular mesmo após o tratamento com o biocida: aplicação do THPS por 4 horas após 9 dias de incubação para a comunidade planctônica e após 3 dias de incubação para a comunidade sésil. O efeito do tratamento com THPS foi evidente após 5 dias de crescimento para a comunidade planctônica, enquanto a comunidade sésil apresentou maior susceptibilidade ao químico no terceiro dia de maturação.

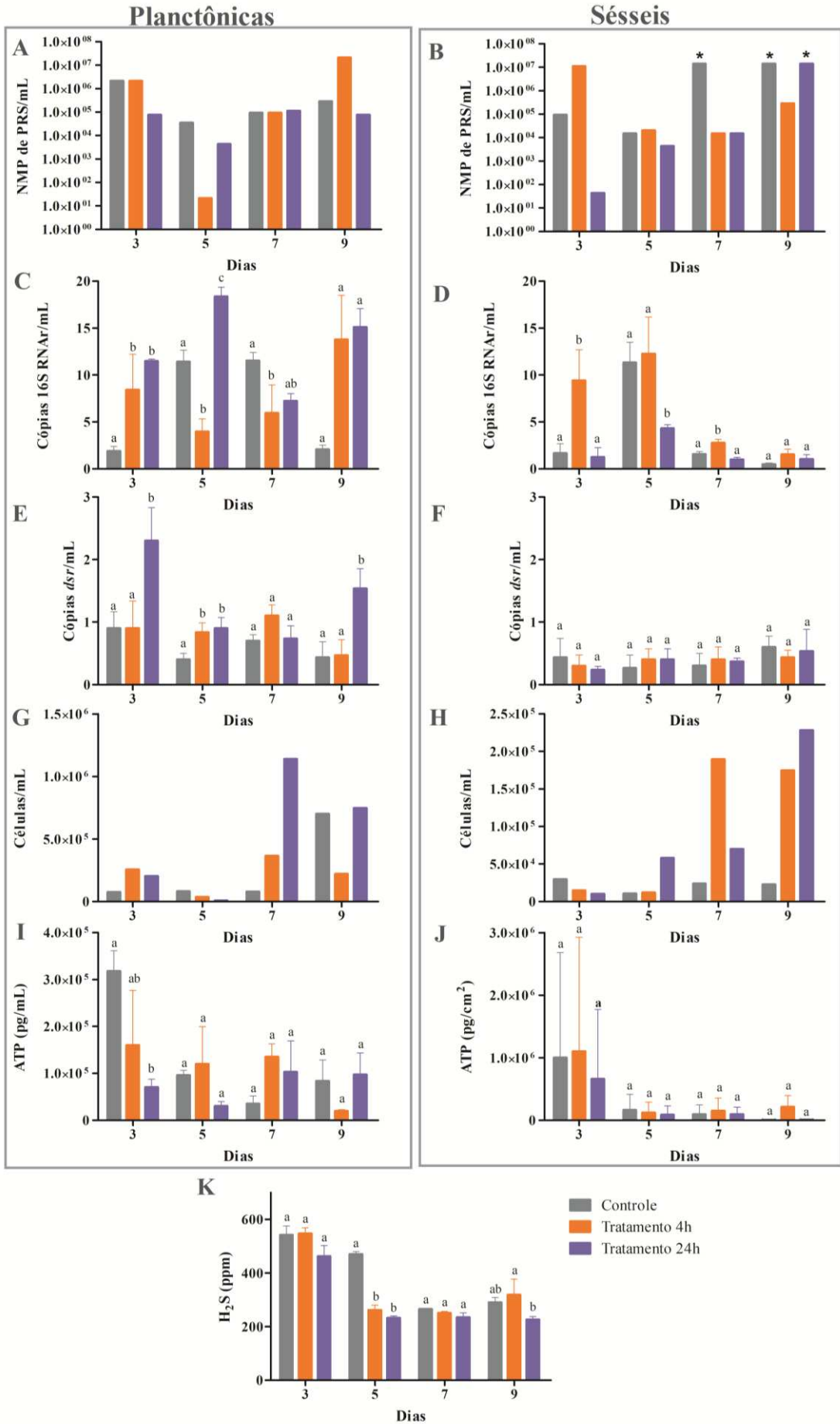
Na comunidade planctônica (Figura 3A), verificou-se que o tratamento com THPS tanto por 4 quanto por 24 horas dos microcosmos incubados por 5 dias resultou na maior redução populacional, da ordem de  $10^3$  e  $10^1$  células, respectivamente. Nos tratamentos das culturas com 3 e 7 dias de incubação, após 4 horas de ação do biocida, o NMP de PRS/mL não sofreu alteração e no tempo de 9 dias de incubação, se observa o aumento populacional com 4 horas de tratamento, da ordem de  $10^2$ . Após 24 horas de ação do THPS, nos tempos de 3, 7 e 9 dias de maturação, não observamos alteração do NMP de BRS/mL. Para a comunidade sésil (Figura 3B), a melhor ação do THPS foi observada após 24 horas de ação do biocida para a cultura com 3 dias de crescimento, quando foi observada redução da ordem de  $10^2$  no número de BRS/mL em relação ao controle, e após 4 e 24 horas para a cultura com 7 dias de cultivo.

A quantificação da comunidade bacteriana total (gene 16S RNAr) e de PRS (gene *dsr*) a partir do ddPCR também evidenciou padrões diferentes de resposta ao tratamento para as comunidades planctônica e sésil nos diferentes tempos de maturação avaliados (Figuras 3C a 3F). Para a população de bactérias totais (Figuras 3C e 3D), de modo geral, observamos o aumento da quantificação do gene 16S rRNA após adição do THPS nas comunidades planctônica e sésil (Figuras 3C e 3D). Para a comunidade planctônica, observamos redução da quantificação desse gene apenas após de 4 horas de aplicação do biocida nas culturas com 5 e 7 dias de incubação (Figura 3C). Para a comunidade sésil, houve redução do número de cópias do gene após 24 horas de aplicação do biocida na cultura crescida por 5 dias.

De modo geral, a quantificação da população de PRS pelo PCR digital não mostrou redução populacional significativa por ação do THPS em nenhuma das condições avaliadas e, inclusive, foi observado um aumento populacional em relação ao controle na comunidade planctônica nos tempos de 3 e 9 dias de crescimento, após 24 horas de adição do biocida

(Figuras 3E e 3F). Na contagem de células microbianas totais por citometria de fluxo, notamos que, em ambas as comunidades, planctônica e sésil, predominou o aumento da contagem celular por ação do biocida. Os aumentos mais expressivos para a comunidade planctônica ocorreram após 7 dias de incubação tanto para o tempo de ação de 4h, como para 24 horas (Figura 3G). No caso da comunidade sésil, foi observado aumento expressivo da quantificação celular após 4 e 24 horas de aplicação do tratamento quando a cultura havia sido maturada por 7 e 9 dias (Figura 3H).

Na quantificação de ATP não observamos variação significativa entre os tratamento e o controle em nenhuma das comunidades avaliadas, exceto para a comunidade planctônica crescida por 3 dias e tratada com o THPS por 24 horas que apresentou cerca de três vezes menos ATP que o observado no controle (Figuras 3I e 3J). A quantificação de sulfeto demonstrou a redução de mais de 200 ppm de sulfeto produzido, em relação ao controle, na cultura incubada por 5 dias e tratada com THPS por 4 e 24 horas (Figura 3K). Além disso, é importante pontuar que, no tempo de 3 dias de maturação da cultura, a produção de sulfeto já está próxima a 600 ppm tanto no controle quanto no tratamento com o biocida. Essa produção foi a máxima obtida nesse estudo.



**Figura 3:** Quantificação, por diferentes métodos, da comunidade planctônica e sésil após adição corretiva de THPS por 4 e 24 horas em microcosmo de água de produção em diferentes estágios de maturação (3, 5, 7 e 9 dias). **A)** NMP de células planctônicas. **B)** NMP de células sésseis. **C)** ddPCR do gene 16S de células planctônicas. **D)** ddPCR do gene 16S de células sésseis. **E)** ddPCR do gene *dsr* de células planctônicas. **F)** ddPCR do gene *dsr* de células sésseis. **G)** Contagem de células totais da comunidade planctônica por citometria. **H)** Contagem de células totais da comunidade sésil por citometria. **I)** Quantificação de ATP de células planctônicas. **J)** Quantificação de ATP de células sésseis. **K)** Quantificação de sulfeto total produzido pela comunidade. O “\*” destaca resultados que extrapolaram o limite de quantificação do NMP e as letras (a, b e ab) indicam os resultados da análise estatística e as diferenças significativas encontradas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Aplicação preventiva de THPS

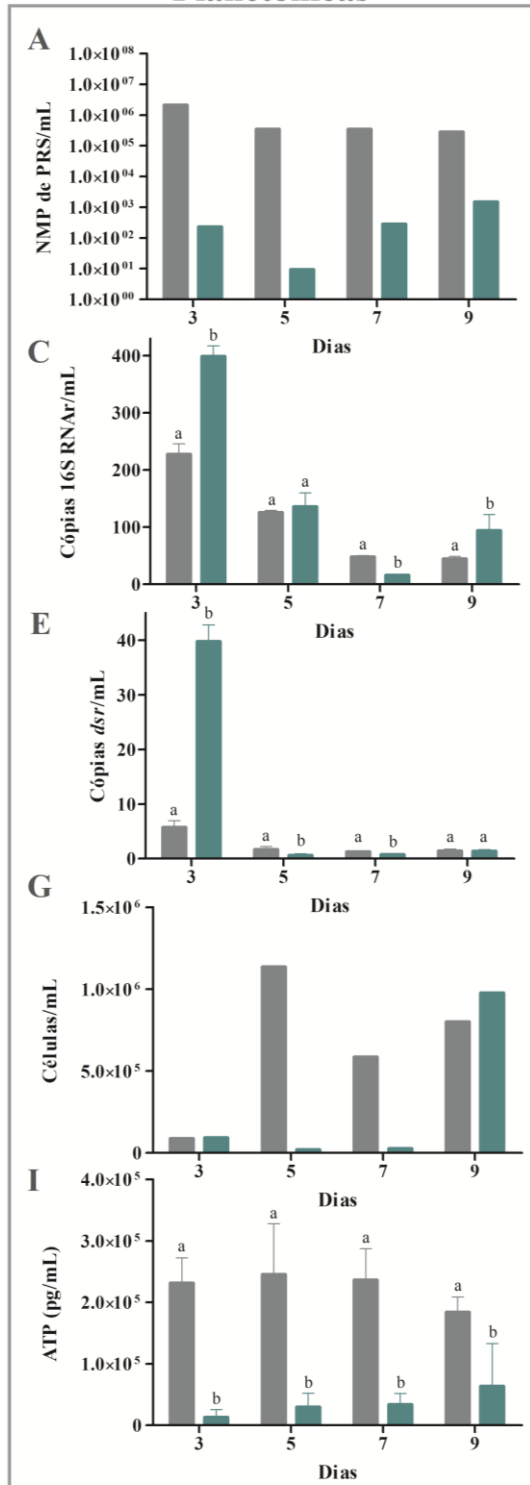
A quantificação por NMP evidenciou que a ação do biocida foi mais eficiente após 5 dias de tratamento tanto para a comunidade planctônica, quanto para a sésil. A partir do sétimo dia após a aplicação do químico, observamos o aumento do NMP de PRS/mL para ambas as comunidades (Figuras 4A e 4B).

Assim como no experimento corretivo, o resultado do PCR digital evidenciou padrões diferentes de ação do químico na comunidade, tanto para as bactérias totais, quanto para os PRS (Figuras 4C a 4F). Para a comunidade planctônica de bactérias totais observamos um aumento significativo da quantificação gênica após 3 dias de tratamento e apenas observamos a redução do número de cópias do gene 16S rRNA após 7 dias de tratamento (Figura 4C). Para a comunidade sésil, foi observada apenas uma alteração significativa da quantificação, sendo essa a redução do número de cópias do gene 16S RNAr após 5 dias de aplicação do biocida (Figura 4D). Enquanto isso, para o gene *dsr*, observamos aumento significativo da quantificação após 3 dias de tratamento da comunidade planctônica e 5 dias da comunidade sésil (Figura 4E). Além disso, foi observada redução do número de cópias do gene analisado após 5 e 7 da adição do THPS na comunidade planctônica e após 3 dias na comunidade sésil (Figura 4F). A citometria de fluxo mostrou redução no número de células totais após 5 e 7 dias de adição de THPS na comunidade planctônica e um aumento após 9 dias de tratamento (Figura 4G). No caso da comunidade sésil, foi observada redução da quantificação celular somente após 7 dias de tratamento, sendo notado aumento em todos os outros tempos analisados (Figura 4H).

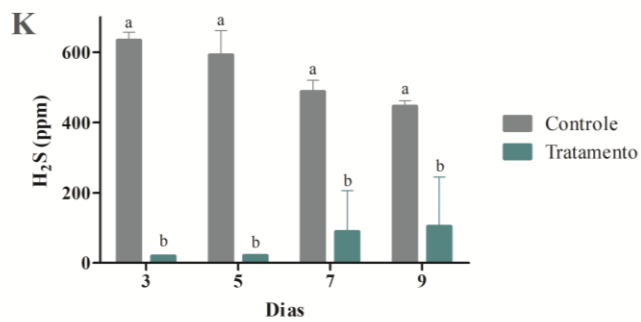
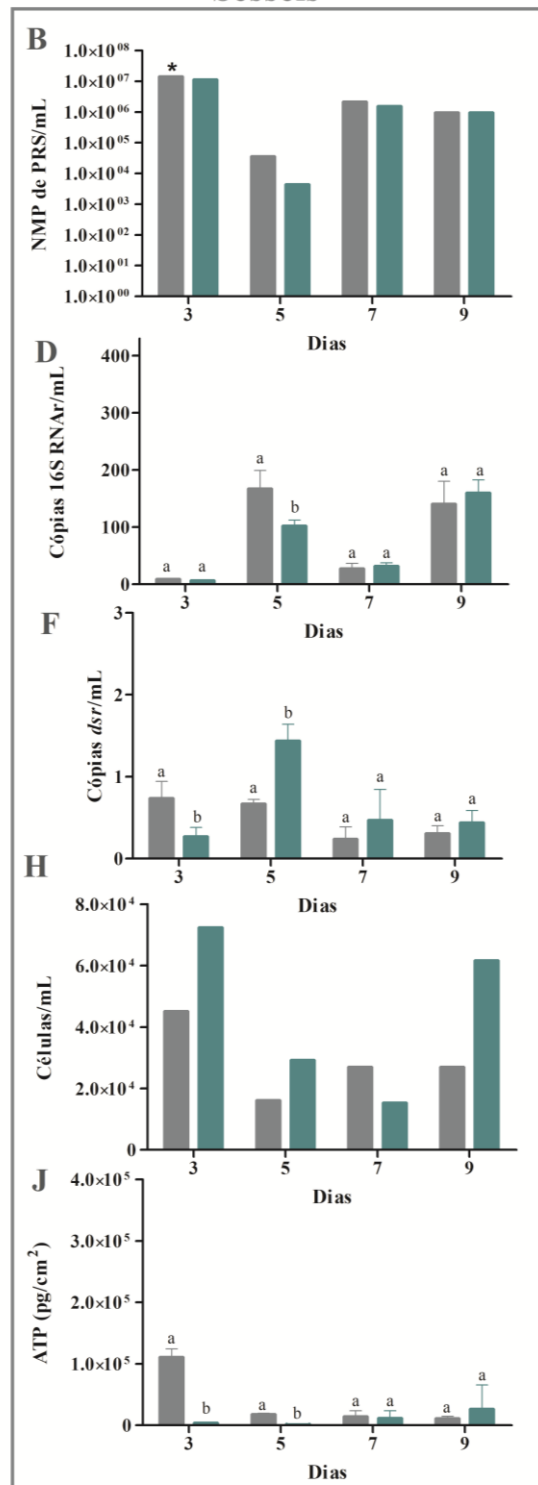
Ambas as quantificações relacionadas ao metabolismo microbiano evidenciaram um efeito interessante de redução populacional por ação do químico durante a maior parte do tempo analisado. A quantificação do ATP mostrou que a aplicação preventiva do THPS provocou, de modo geral, redução na atividade metabólica em ambas as comunidades analisadas

(Figuras 4I e 4J). A partir do 9º dia após o tratamento é observado o aumento da atividade metabólica em ambas as comunidades, sendo que na comunidade sésil, já não é observada diferença significativa entre controle e tratamento a partir do 7º dia após a aplicação do químico. A concentração de sulfeto reduziu, em relação ao controle, em todos os dias de tratamento avaliados (Figura 4K). O pico de produção de sulfeto do controle (aproximadamente 600 ppm) foi observado no 3º dia, semelhante ao observado no tratamento corretivo, e do tratamento (aproximadamente 100 ppm) observado no 9º dia.

**Planctônicas**



**Sésseis**



■ Controle  
■ Tratamento

**Figura 4:** Quantificação, por diferentes métodos, das comunidades planctônica e sésil após 3, 5, 7 e 9 dias da adição de THPS em microcosmo de água de produção. **A)** NMP de células planctônicas. **B)** NMP de células sésseis. **C)** ddPCR do gene 16S de células planctônicas. **D)** ddPCR do gene 16S de células sésseis. **E)** ddPCR do gene *dsr* de células planctônicas. **F)** ddPCR do gene *dsr* de células sésseis. **G)** Contagem de células totais da comunidade planctônica por citometria de fluxo. **H)** Contagem de células totais da comunidade sésil por citometria de fluxo. **I)** Quantificação de ATP de células planctônicas. **J)** Quantificação de ATP de células sésseis. **K)** Quantificação de sulfeto total produzido pela comunidade. O “\*” destaca resultados que extrapolaram o limite de quantificação do NMP e as letras (a, b e ab) indicam os resultados da análise estatística e as diferenças significativas encontradas ( $p < 0,05$ ).

## 5. Discussão

Neste trabalho avaliamos o biocida THPS, que é amplamente utilizado na indústria petrolífera (CAVALCANTI, 2001; HAACK, THOMAS K., DOWNWARD; TALBOT, 1997; KEASLER et al., 2017). Esse químico apresenta amplo espectro de ação e atua pela interferência em ligações do tipo dissulfeto e grupos tiol, resultando em desnaturação proteica e desestabilização celular (CAVALCANTI, 2001; KEASLER et al., 2017; MORRIS; VAN DER KRAAN, 2017). Outro efeito importante desse biocida para o contexto em que PRS estão inseridos é a redução do teor de  $H_2S$  em solução por ação de espécies químicas liberadas no meio durante sua aplicação, resultando na neutralização desse composto nocivo à indústria e ao ambiente (MOISEEV; JAMES, 2020).

A partir dos parâmetros avaliados neste estudo, notamos que, na maioria das vezes, a comunidade sésil se mostrou equivalente ou menor em quantidade que a comunidade planctônica, evidenciando que nesses microcosmos a maior parte dos microrganismos estava na forma planctônica. Tal resultado contrapõe o fato de que a maioria dos microrganismos nos ecossistemas naturais se encontra na forma de biofilmes (STOODLEY et al., 2002). Acreditamos que essa observação seja reflexo do fato de que esse é um sistema artificial, em que as condições foram adaptadas para serem ideais para o crescimento dessas culturas, diminuindo a ação de elementos potencialmente estressores (JENNEMAN; DE LEON, 2022; PANNEKENS et al., 2019).

O tratamento corretivo visa à eliminação de um problema existente, ou seja, o químico é aplicado em uma comunidade em estágios mais avançados de desenvolvimento, objetivando sua desestabilização e remoção (MOTSCHMAN; MOORE, 1999). As comunidades, já estabelecidas, apresentam relações sociais mais complexas, o que impacta diretamente na maneira que respondem ao tratamento (LAWRENCE et al., 2012). Já o tratamento preventivo, é empregado para eliminar fatores que podem vir a causar problemas no futuro,

ou seja, o biocida é usado em estágios mais iniciais da comunidade, visando impedir o seu desenvolvimento e os consequentes danos dela decorrentes (MOTSCHMAN; MOORE, 1999). Essas comunidades ainda não possuem tantos recursos para reverter a interferência causada pelo químico, se tornando mais susceptíveis à sua ação (LAWRENCE et al., 2012).

De maneira geral, para ambas as estratégias de tratamento aplicadas, foi observada uma ação mais efetiva do biocida sobre a comunidade planctônica do que sobre a comunidade sésil. Tal resultado pode ser atribuído ao efeito protetivo conferido pela estrutura da matriz extracelular da comunidade sésil às células nela inseridas ou ainda pelo fato de que nessas estruturas existem diversas células em estado metabólico menos ativo, o que as torna menos susceptíveis aos diferentes estresses impostos pelas condições ambientais ou pela adição de químicos no meio (BAS; KRAMER; STOPAR, 2017; COS et al., 2010; JENNEMAN; DE LEON, 2022; SCOFFIELD; WU, 2019).

Nesse trabalho foi observado que, na maioria dos casos, os parâmetros de quantificação da comunidade se mantiveram inalterados na presença do químico ou estiveram aumentados para o tratamento corretivo. Os resultados de tratamento eficaz e redução significativa de população foram pontuais. Nesse cenário, fatores determinantes para o sucesso do tratamento químico, como a dose utilizada de biocida ou a frequência de sua aplicação, se tornam ainda mais decisivos e precisam ser otimizados para que a eficiência do tratamento seja maximizada (ARAÚJO et al., 2013; JACK, T.R; WESTLAKE, 1995).

Além disso, devido à maior instabilidade da comunidade sésil nos estágios iniciais de desenvolvimento (BROWN; TURNER, 2019; MAUNDERS; WELCH, 2017), era esperado que o efeito mais agudo do tratamento corretivo fosse observado nos primeiros dias de análise. Entretanto, essa observação não foi uma unanimidade em todas as análises realizadas, indicando que é possível que a comunidade já apresente alguns mecanismos de defesa, como a adoção de estados de metabolismo menos ativo (JENNEMAN; DE LEON, 2022; KOO et al., 2017; RÖMLING et al., 2014).

Para a aplicação preventiva foi observado um efeito do tratamento de acordo com o esperado, ou seja, o crescimento da comunidade microbiana foi inibido por um determinado período após a aplicação do químico. Nesse caso, essa ação foi eficiente até o sétimo dia, a partir de quando se observa um desenvolvimento tardio da comunidade avaliada. Esse desenvolvimento tardio da comunidade pode ser explicado pela sua adaptação à presença do químico, permitindo que mecanismos de defesa sejam elaborados e a comunidade seja reestruturada e se recupere (SHI et al., 2021). No caso das comunidades sésseis, os

microrganismos em estado de dormência inseridos nessas estruturas podem estar associados com o reestabelecimento da comunidade no momento em que o efeito do químico reduz a sua influência sobre o meio (BAS; KRAMER; STOPAR, 2017; COS et al., 2010).

Ainda, no caso do tratamento preventivo, é possível pensar que a retomada do desenvolvimento da comunidade se dá por redução do efeito do químico que ocorre naturalmente pela sua degradação no meio. No caso específico do THPS, sua hidrólise ocorre nas condições de pH e temperatura utilizadas para cultivo e a taxa de degradação é dependente de pH. A meia vida do composto está entre 72 e 7 dias, considerando valores de pH na faixa de 7,0 a 9,0. Além disso, em ambientes anaeróbios é relatada metabolização de 60% do composto dentro de um prazo de 30 dias, resultando na formação de óxido de trihidroximetilfosfina (THPO) e ácido bishidroximetilfosfônico (BMPA) (BENSON et al., 2000; EHS SUPPORT, 2021).

Neste trabalho, a aplicação preventiva do biocida apresentou maior eficiência que a corretiva. Isso pode ser comprovado pela maior redução populacional por adição do THPS na modalidade preventiva, além da observação do desenvolvimento tardio da comunidade sob efeito do químico. Ainda é possível destacar que o tempo de maior eficiência do tratamento corretivo com o biocida se dá entre os dias 5 e 7 de maturação da cultura, próximo ao ponto de desenvolvimento tardio da comunidade tratada preventivamente.

Em vista desse comportamento, a padronização desses tempos para avaliação de ação de THPS em sistemas semelhantes é um artifício interessante, que possibilitaria a visualização do maior efeito e melhor eficiência do tratamento. Além disso, a utilização desse tempo como frequência de dosagem no delineamento de um tratamento permitira conciliar o efeito das intervenções preventivas e corretivas, alcançando uma redução populacional mais significativa e, conseqüentemente, mais eficaz para o controle do dano. Adicionalmente, seria interessante a combinação desses tratamentos com a remoção física de biofilmes, por exemplo, visando ampliar a eficiência do tratamento (CAVALCANTI, 2001; LI et al., 2016).

A utilização de diferentes metodologias de quantificação e monitoramento da comunidade microbiana também representa outro ponto de destaque desse trabalho (Tabela 1). Apesar de o NMP ser amplamente aplicado na indústria petrolífera e recomendado pela NACE (2004) para ensaio de eficiência biocida para controle de biocorrosão, são observadas diversas limitações relacionadas à sua aplicação (BENNET, 2016). Assim, discussões acerca de métodos alternativos para quantificação das comunidades já são levantadas há algum tempo (BONADONNA; BRIANCESCO; LA ROSA, 2019; KEASLER et al., 2013; MARTIN-

SANCHEZ; GORBUSHINA; TOEPEL, 2018; MAUERHOFER et al., 2019; SENTHILMURUGAN et al., 2021).

Dentre as limitações da aplicação do NMP no monitoramento de comunidades microbianas, nesse trabalho foi possível observar que muitas amostras extrapolaram o limite superior de quantificação da técnica, que é de  $1,4 \times 10^7$  células para a estrutura de NMP utilizado no trabalho. Esse resultado impede uma quantificação precisa da comunidade microbiana e, conseqüentemente, a verificação do efeito específico do biocida na comunidade, o que pode ocasionar a utilização de tratamentos não apropriados ao contexto e o conseqüente desenvolvimento de resistência aos tratamentos (ARAÚJO et al., 2013; KEASLER et al., 2017). É possível pensar na ampliação da sequência de diluição seriada utilizada no NMP como forma de resolver essa limitação, mas essa adaptação tornaria a metodologia ainda mais laboriosa. Além disso, só é possível perceber que a amostra extrapolou o limite de quantificação após o tempo de cultivo, o que inviabiliza a repetição do experimento utilizando as diluições apropriadas.

Ainda, a principal limitação da técnica está relacionada ao fato de ela ser dependente de cultivo. Isso implica na quantificação apenas dos microrganismos cultiváveis, que representam apenas uma pequena porcentagem da totalidade dos microrganismos conhecidos. Além disso, é necessário que os microrganismos cultiváveis estejam viáveis para que sejam cultivados e é previsto que 80% dos microrganismos componentes das comunidades ambientais estejam dormentes ou inativos, além da possibilidade de redução da viabilidade da comunidade em razão da manipulação da cultura durante os procedimentos de amostragem, principalmente pelo fato de esse grupo ser anaeróbio (BENNET, 2016; KEASLER et al., 2013; MAUERHOFER et al., 2019; SKOVHUS; ECKERT; RODRIGUES, 2017). Assim, como em todas as técnicas dependentes de cultivo, o maior entrave do NMP é a detecção de uma comunidade essencialmente diferente da real.

Uma das alternativas para quantificação microbiana avaliada neste trabalho foi o PCR digital em gota (ddPCR), que possibilitou resultados mais rápidos e apresentou limites de detecção mais amplos que o NMP (BAKER, 2012). No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho foram consideravelmente diferentes do esperado de acordo com o efeito presumido para o químico. Assim, pode ser interessante a análise de um maior número de amostras para o estabelecimento de estratégias mais precisas para emprego desta técnica para amostras ambientais, que se mostra possível pela aplicação dessa metodologia para monitoramento

microbiológico de qualidade da água (CAO et al., 2020; NETZER et al., 2021; TIWARI et al., 2022) de maneira eficiente.

Para que a quantificação dos grupos de interesse ocorra de maneira eficiente em amostras ambientais é necessário trabalhar em otimizações dos parâmetros utilizados nas análises, como as condições da reação de amplificação e a análise dos resultados obtidos. Alguns parâmetros da reação que são capazes de alterar a qualidade dos resultados são: a duração de cada etapa da reação e rampa de temperatura utilizada, que irão influenciar na eficiência da separação das gotas positivas e negativas; bem como a concentração de DNA da amostra, que resulta na diluição de contaminantes e na redução de resultados falsos. Além disso, a utilização de controles positivos e negativos a cada reação permite uma determinação mais precisa do *threshold* (BAKER, 2012; CAO et al., 2020; KOKKORIS et al., 2021).

Neste trabalho ainda destacamos a possibilidade de contagem de células dessas amostras por citometria de fluxo, sendo possível diferenciar os controles e dos tratamentos, reforçando a capacidade de detecção de células bacterianas únicas e com alta acurácia (HAMMES et al., 2008). Essa técnica já é amplamente aplicada no monitoramento microbiológico da qualidade de água potável e de rejeitos industriais (HAMMES et al., 2008; LIU et al., 2013; SAFFORD; BISCHEL, 2019; VAN NEVEL et al., 2017; WANG et al., 2010). Esses trabalhos avaliaram a efetividade de diferentes métodos de tratamento aplicados para melhoria da qualidade dessas águas, estando, de certa forma, relacionados ao objetivo do presente trabalho.

A quantificação de ATP foi a terceira metodologia avaliada neste trabalho para verificar a eficiência do biocida na microbiota. A técnica foi sensível e evidenciou pontos referentes aos tratamentos com biocida, em que houve redução da atividade metabólica, principalmente nos pontos iniciais do experimento preventivo. O fato de o protocolo de análise das comunidades planctônicas ser baseado em etapas sequenciais de filtração (ABUSHABAN et al., 2019; BENNET, 2016; MAUERHOFER et al., 2019; ZHANG et al., 2019) introduz certo viés na técnica, resultando em desvios notáveis observados nesse trabalho.

Os desvios foram bastante variáveis, não sendo possível estabelecer uma relação concreta entre o tipo de amostra, planctônica ou sésil, ou o estágio de desenvolvimento da comunidade e a amplitude dos desvios. Já no protocolo de análise das comunidades sésseis, a etapa de desprendimento do biofilme por agitação do tubo em que ele está contido (SOLEIMANI; ORMECI; ISGOR, 2013) pode acarretar resultados com maiores desvios, já que a manipulação pode induzir desprendimento diferente em cada cupom analisado. Um ponto específico que chamou atenção foi a comunidade sésil do dia 3 do experimento

corretivo, que apresentou, tanto no controle, quanto no tratamento, desvios desproporcionais. Tal resultado pode ser devido à formação desigual do estágio inicial de desenvolvimento da comunidade de cada réplica, além da possibilidade de desprendimento desigual em decorrência do protocolo.

A quantificação de sulfeto já é amplamente aplicada na indústria, por meio de diferentes técnicas, com finalidade de monitoramento dos níveis de H<sub>2</sub>S no ambiente (NARANJO; KORNBECH, 2008). No que diz respeito aos seres humanos, efeitos nocivos à saúde são observados a partir de exposição por algumas horas a níveis entre 10 e 30 ppm. Os efeitos adversos se intensificam e se tornam mais graves com o aumento da dosagem, sendo que em níveis de 500-600 ppm, valores atingidos nesse experimento, a exposição por apenas 15 minutos causa disfunções respiratórias e circulatórias. Acima desse nível esse gás pode levar à morte em minutos (MAINIER; VIOLA, 2005).

Nesse trabalho foi possível confirmar a sensibilidade da técnica (ASTM, 1989) por meio da quantificação de sulfeto presente na amostra do terceiro dia de tratamento preventivo, em que foi observada redução significativa da comunidade de PRS pelas diversas técnicas aplicadas. É importante ainda destacar que o fato de a alíquota a ser quantificada ser adicionada em uma solução sequestrante reduz significativamente as chances de perdas do composto em análise, contribuindo para uma quantificação bastante próxima da real, além de permitir que a amostra seja armazenada para análise posterior, o que pode ser interessante no caso do transporte até o laboratório (WILLIAMS, 2003). Apesar de a titulação potenciométrica ser uma técnica utilizada em escala laboratorial, não são encontrados trabalhos na literatura relatando seu uso.

Para além das vantagens e desvantagens apresentadas para cada método, é preciso se atentar à finalidade do monitoramento realizado para escolher a melhor técnica a ser empregada. Caso o interesse seja avaliar a presença de organismos no sistema ou o efeito de um determinado químico ou tratamento sobre a comunidade bacteriana, as técnicas de quantificação celular são mais indicadas. Todavia, se o objetivo for avaliar a capacidade de geração de danos de determinada população microbiana, a avaliação de atividade metabólica é mais explicativa. Isso acontece porque a maioria dos danos ambientais e industriais é decorrente do metabolismo dos organismos envolvidos e não somente da sua presença, que é apenas indicativo da possibilidade de problema (CHEN; CHEN, 1984).

## 6. Conclusões e Perspectivas

As diferentes técnicas evidenciaram o melhor efeito do biocida entre os dias 5 e 7 para o tratamento corretivo, além do efeito duradouro do tratamento preventivo, com inibição do crescimento por 7 dias. Assim, o uso desses tempos para padronização de análises de efeito biocida, especialmente quando utilizado o THPS, em comunidades semelhantes à avaliada neste estudo, possibilitaria maior assertividade quanto à eficiência do tratamento delineado. Ainda, é viável a proposição da utilização dessa frequência de dosagem de biocidas químicos para mitigação de PRS em indústrias petrolíferas, de modo a combinar a redução populacional inicial observada no tratamento preventivo, com a maior redução populacional observada no tratamento corretivo, permitindo um controle eficiente da comunidade microbiana. Estudos de diversidade e sucessão microbiana na comunidade em questão possibilitariam o entendimento das variações observadas nos parâmetros de quantificação populacional. Nos casos em que não foi observada variação na quantificação, essa análise seria ainda mais importante, pois poderia mostrar se o químico apresentou algum efeito na estrutura da comunidade, apesar de não causar alterações quantitativas.

Quanto às metodologias avaliadas nesse trabalho para monitoramento da comunidade microbiana, as quantificações baseadas em DNA (PCR digital dos genes 16S RNAr e *dsr*) não apresentaram bons resultados, com grandes variações e divergências em relação ao efeito esperado para o tratamento com biocida. É possível pensar na aplicação de metodologias de quantificação que utilizem como alvo moléculas de RNA, que apresentam correlação direta com o estado metabólico concreto da comunidade, como alternativas de maior viabilidade. As metodologias baseadas na quantificação de atividade metabólica (ATP e H<sub>2</sub>S) são promissoras para complementação da análise por NMP preconizada pela *NACE Internacional* (2004). Essas análises permitiram a avaliação da comunidade total, assim como do grupo dos PRS, além de estarem alinhadas à finalidade de monitoramento microbiano para redução de danos causados à indústria. Dessa forma, é interessante analisar um maior número de amostras, além de amostras de diferentes origens, para validação dos resultados aqui observados. Essa é uma demanda especialmente importante no caso das metodologias baseadas em atividade metabólica, devido a sua maior aplicabilidade e aos avanços que poderiam ser alcançados a partir da sua aplicação.

## **Conclusões gerais**

Os estudos realizados nesse trabalho permitiram a construção de conhecimento acerca de uma comunidade microbiana pouco explorada até o momento, a membrana de dessulfatação de água do mar, onde se observa predominância de grupos relacionados ao ambiente marinho. Além de explorar a diversidade desse ambiente, esse foi o primeiro trabalho a realizar isolamento microbiano a partir desse tipo de amostra, totalizando 15 isolados. Uma melhor identificação destes isolados é de extreme importância para ampliação do conhecimento científico e biotecnológico. Nossos resultados também demonstram a possibilidade de utilizar os meios de cultivo BANHT, BFHT ou Postgate E para preservação de amostras de membrana por tempos inferiores a seis meses.

Esse trabalho demonstra que os melhores efeitos dos tratamentos com THPS estão entre os dias 5 e 7, sendo interessante a utilização desses tempos para combinação dos resultados positivos nas modalidades corretiva e preventiva. Os resultados sugerem a possibilidade de utilização de metodologias de monitoramento microbiológico baseadas em quantificação de atividade metabólica, como quantificação de ATP por ensaio de fluorescência e titulação potenciométrica de sulfeto de hidrogênio, em conjunto ou em substituição à metodologia do NMP, amplamente utilizada atualmente. Devido às inconsistências observadas para as técnicas baseadas em DNA na quantificação precisa da abundância de bactérias totais e grupos de PRS na comunidade microbiana, o trabalho propõe a utilização da molécula de RNA em detrimento da molécula de DNA.

Novos estudos com ampliação do conjunto amostral serão importantes para fortalecer os resultados demonstrados. A realização de análises de diversidade e sequenciamento também pode ser elucidativa para o entendimento, de maneira mais profunda, do comportamento da comunidade frente ao tratamento com biocida químico.

## REFERÊNCIAS

- ABUSHABAN, A. *et al.* ATP measurement in seawater reverse osmosis systems: Eliminating seawater matrix effects using a filtration-based method. **Desalination**, v. 453, p. 1–9, 2019.
- AL-GHOUTI, M. A. *et al.* Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, n. September, p. 222–239, 2019.
- ALBUQUERQUE, A. C.; ANDRADE, C.; NEVES, B. Biocorrosão – Da Integridade Do Biofilme À Integridade Do Material. **Corrosão & Protecção de materiais**, v. 33, n. 1–2, p. 18–23, 2014.
- ARAÚJO, L. *et al.* Efeito de biocidas na corrosão induzida microbiologicamente do aço duplex em água de produção de petróleo. **Corrosão e Protecção de Materiais**, v. 32, n. 4, p. 108–114, 2013.
- ASTM. **Hydrogen Sulfide and Mercaptan Sulfur in Liquid Hydrocarbons by Potentiometric Titration**. West Conshohocken, 2010.
- BADER, M. S. H. Sulfate removal technologies for oil fields seawater injection operations. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 55, n. 1–2, p. 93–110, 2007.
- BAILLIE, B. **Apparatus and method for treating injection fluid**. United States, 2009.
- BAKER, M. Digital PCR hits its stride. **Nature Methods**, v. 9, n. 6, p. 541–544, 2012.
- BALDONI-ANDREY, P. *et al.* **Detection and monitoring of biofilm growth in the seawater sulfate removal units**. SPE Produced Water Handling and Management Symposium. 2015.
- BARDOU, P. *et al.* jvenn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 293, p. 1–7, 2014.
- BAS, S.; KRAMER, M.; STOPAR, D. Biofilm surface density determines biocide effectiveness. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–9, 2017.
- BENNET, D. **Oilfield microbiology: Effective evaluation of biocide chemicals**. Asia Pacific Oil & Gas Conference and Exhibition. 2017.

BENNET, D. G. **Oilfield microbiology: Detection techniques used in monitoring problematic microorganisms such as sulphate-reducing bacteria SRB.** Offshore Technology Conference Asia. 2016.

BENNET, D.; HOFFMANN, H. Oilfield microbiology: Molecular microbiology techniques used during a biocide evaluation. **Offshore Technology Conference Asia 2018, OTCA 2018**, p. 1–14, 2018.

BENSON, R. *et al.* **Flame retardants: Tris(2-butoxyethyl) phosphate, tris(2-ethylhexyl) phosphate and tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium salts.** Environmental Health Criteria, 2000.

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

BOCZKOWSKI, M.; ERIKSSON, P.; SIMIONATO, M. Water Injection and Sulfate Removal in the Offshore Oil & Gas Industry. **GE Power & Water Water & Process Technologies.**, p. 1–4, 2015.

BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; LA ROSA, G. Innovative analytical methods for monitoring microbiological and virological water quality. **Microchemical Journal**, v. 150, n. August, p. 1–8, 2019.

BROWN, D. C.; TURNER, R. J. Biofilms and Microbiologically Influenced Corrosion in the Petroleum Industry. **ACS Symposium Series**, v. 1323, p. 187–203, 2019.

CALDART, E. T. *et al.* Phylogenetic analysis: Basic concepts and its use as a tool for virology and molecular epidemiology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1–20, 2016.

CAO, Y. *et al.* Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. **Molecules**, v. 25, n. 706, p. 1–18, 2020.

CAVALCANTI, G. DE H. **Efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas da Petrobras.** Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz, 2001.

CELIKER, H.; GORE, J. Cellular cooperation: Insights from microbes. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 9–15, 2013.

CHANDRA, P. *et al.* The Role of Microorganisms in Removal of Sulfates from Artistic Stonework. In: **Microbial Biotechnology Approaches to Monuments of Cultural Heritage**. p. 1–198, 2020.

CHANG, D. H. *et al.* *Sunxiuqinia dokdonensis* sp. nov., isolated from deep sub-seafloor sediment. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 741–746, 2013.

CHANG, H. *et al.* *Marinobacterium halophilum* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. p. 77–80, 2007.

CHEN, E. Y.; CHEN, R. B. Monitoring Microbial Corrosion in Large Oilfield Water Systems. **JPT, Journal of Petroleum Technology**, v. 36, n. 8, p. 1171–1176, 1984.

CORD-RUWISCH, R.; KLEINITZ, W.; WIDDEL, F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology**, n. January, p. 97–106, 1987.

COS, P. *et al.* Biofilms: An Extra Hurdle for Effective Antimicrobial Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 20, p. 2279–2295, 2010.

DA SILVA, T. G. D. *et al.* Remoção de íons de sulfato da água oceânica e de injeção através da nanofiltração. **Cadernos de graduação - Engenharia de Petróleo**, v. 3, n. 1, p. 131–140, 2015.

DE SOUZA, P. M. *et al.* Growth inhibition of sulfate-reducing bacteria in produced water from the petroleum industry using essential oils. **Molecules**, v. 22, n. 648, p. 1–10, 2017.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DOS SANTOS, J. C. **Diversidade microbiana e formação de biofilme em óleo e água de produção de petróleo com ênfase nas bactérias redutoras de sulfato**. Universidade Federal de Viçosa, 2019.

DRAGOŠ, A. *et al.* Division of labor during biofilm matrix production. **Current Biology**, v. 28, n. 12, p. 1903–1913, 2019.

DUNNETTE, D. A.; CHYNOWETH, D. P.; MANCY, K. H. The source of hydrogen sulfide in anoxic sediment. **Water Research**, v. 19, n. 7, p. 875–884, 1985.

ECKERT, R. B.; SKOVHUS, T. L. Advances in the application of molecular microbiological methods in the oil and gas industry and links to microbiologically influenced corrosion. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 169–176, 2018.

EHS SUPPORT. **Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate**. 2021.

ENNING, D.; GARRELF, J. Corrosion of Iron by Sulfate-Reducing Bacteria: New Views of an Old Problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

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

HAACK, THOMAS K., DOWNWARD, B.; TALBOT, B. **Tetrakis(hydroxymethyl) Phosphonium Sulfate (Thps): a New Biocide With Environmental Benefits for Paper Mills**, 1997.

HAMILTON, W. A. Sulphate-reducing bacteria and the offshore oil industry. **Trends in Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 36–40, 1983.

HAMILTON, W. A. Sulphate-reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 195–217, 1985.

HAMMES, F. *et al.* Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. **Water Research**, v. 42, p. 269–277, 2008.

HAO, O. J. Sulphate-reducing bacteria. In: MARA, D.; HORAN, N. (Eds.). . **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. 1. ed. p. 459–469.

HILAL, N. *et al.* A comprehensive review of nanofiltration membranes: Treatment, pretreatment, modelling, and atomic force microscopy. **Desalination**, v. 170, n. 3, p. 281–308, 2004.

HOSHINO, T. *et al.* Global diversity of microbial communities in marine sediment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 44, p. 27587–27597, 2020.

HUANG, X. F. *et al.* *Mangrovibacterium diazotrophicum* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove sediment, and proposal of Prolixibacteraceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 3, p. 875–881, 2014.

HUANG, Y. X. *et al.* Liquid-like surface modification for effective anti-scaling membrane distillation with uncompromised flux. **Journal of Membrane Science**, v. 637, n. 119673, p. 1–6, 2021.

HUPSEL, A. L. *et al.* Combination of membrane processes for desulfation of seawater used for injection in oilfields. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 403–412, 2020.

HUSSAIN, A. *et al.* Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 119 (1–10), 2016.

JACK, T.R; WESTLAKE, D. W. S. Control in Industrial Settings. In: BARTON, L. L. (Ed.). . **Biotechnology handbook 8 - Sulfate-reducing bacteria**. Albuquerque, New Mexico: Springer Science+Business Media, 1995. p. 265–293.

JENNEMAN, G. E.; DE LEON, K. B. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 169, p. 1–18, 2022.

JOINT, I.; MÜHLING, M.; QUERELLOU, J. Culturing marine bacteria - An essential prerequisite for biodiscovery: Minireview. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 564–575, 2010.

JURELEVICIUS, D. *et al.* Long-term souring treatment using nitrate and biocides in high-temperature oil reservoirs. **Fuel**, n. November, p. 1–11, 2020.

KEASLER, V. *et al.* Expanding the microbial monitoring toolkit: Evaluation of traditional and molecular monitoring methods. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 51–56, 2013.

- KEASLER, V. *et al.* Biocides overview and applications in petroleum microbiology. In: EL-SHERICK, A. M. (Ed.). **Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies: Production and Transmission**. Elsevier Ltd, p. 539–562, 2017.
- KHOUZANI, M. K. *et al.* Microbiologically influenced corrosion of a pipeline in a petrochemical plant. **Metals**, v. 9, n. 459, p. 1–14, 2019.
- KLEIKEMPER, J. *et al.* Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1516–1523, 2002.
- KOCHKODAN, V.; HILAL, N. A comprehensive review on surface modified polymer membranes for biofouling mitigation. **Desalination**, v. 356, p. 187–207, 2015.
- KODAMA, Y. *et al.* *Thalassospira tepidiphila* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 711–715, 2008.
- KOKKORIS, V. *et al.* Challenges Using Droplet Digital PCR for Environmental Samples. **Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 74–88, 2021.
- KOO, H. *et al.* Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740–755, 2017.
- KUSHKEVYCH, I. Isolation and purification of sulfate-reducing bacteria. In: BLUMENBERG, M.; SHAABAN, M.; ELGAML, A. (Eds.). **Microorganisms**. London: IntechOpen, p. 23–42, 2020.
- LANE D.J. 16S/23S rRNA sequencing: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. **Academic Press**, Chichester, Reino Unido, 115-175 pp., 1991.
- LAWRENCE, D. *et al.* Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. **PLoS Biology**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2012.
- LI, Q. *et al.* Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, n. 18, p. 4591–4602, 2008.
- LI, Y. *et al.* Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 896, p. 1–13, 2016.

- LIN, J.; BALLIM, R. Biocorrosion control: Current strategies and promising alternatives. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 91, p. 15736–15747, 2012.
- LITTLE, B. J. *et al.* Microbially influenced corrosion—Any progress? **Corrosion Science**, v. 170, n. November 2019, p. 108641, 2020.
- LIU, G. *et al.* Flow cytometry total cell counts: A field study assessing microbiological water quality and growth in unchlorinated drinking water distribution systems. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.
- MAINIER, F. B.; VIOLA, E. D. M. **O Sulfeto De Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) E O Meio Ambiente**. II Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia. 2005.
- MANDRAGUTTI, T. *et al.* Molecular characterization of marine bacterial isolates of Visakhapatnam coast—efficacy in dye decolorization and bioremediation of cadmium. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 87, p. 1–11, 2021.
- MARTIN-SANCHEZ, P. M.; GORBUSHINA, A. A.; TOEPEL, J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture- and qPCR-based approaches. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 216–223, 2018.
- MAUERHOFER, L. M. *et al.* Methods for quantification of growth and productivity in anaerobic microbiology and biotechnology. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 321–360, 2019.
- MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides: the sticky side of biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 13, p. 1–10, 2017.
- MOHAMMAD, A. W. *et al.* Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. **Desalination**, v. 356, p. 226–254, 2015.
- MOHANTY, K.; PURKAIT, M. K. **Membrane technologies and applications**. 2011.
- MOISEEV, D. V.; JAMES, B. R. Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium salts: Their properties, hazards and toxicities. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, v. 195, n. 4, p. 263–279, 2020.

- MORRIS, B. E. L.; VAN DER KRAAN, G. M. Application of Biocides and Chemical Treatments to Both Combat Microorganisms and Reduce (Bio)Corrosion. In: **Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry**, p. 229–253, 2017.
- MOTLAGH, A. M.; BHATTACHARJEE, A. S.; GOEL, R. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 1–10, 2016.
- MOTSCHMAN, T. L.; MOORE, S. B. Corrective and preventive action. **Transfusion Science**, v. 21, n. 2, p. 163–178, 1999.
- MU, D. S. *et al.* Strategies for culturing active/dormant marine microbes. **Marine Life Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 121–131, 2021.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008.
- NACE. **NACE Standard TM0194-2004**. 2004.
- NADY, N. *et al.* Modification methods for poly(arylsulfone) membranes: A mini-review focusing on surface modification. **Desalination**, v. 275, p. 1–9, 2011.
- NARANJO, E.; KORNBECH, M. **Hydrogen sulfide detection in offshore platforms**. SPE Middle East Health, Safety, Security and Environment Conference and Exhibition. 2008.
- NEFF, J.; LEE, K.; DEBLOIS, E. M. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects. In: LEE, K.; NEFF, J. (Eds.). . **Produced Water**. Duxbury: Springer Science+Business Media, p. 3–54, 2011.
- NETZER, R. *et al.* Absolute quantification of priority bacteria in aquaculture using digital PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 183, n. January, p. 1–10, 2021.

- PANNEKENS, M. *et al.* Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. **New Biotechnology**, v. 49, n. November 2018, p. 1–9, 2019.
- PFENNIG, N.; WIDDEL, F.; TRUPER, H. G. The Dissimilatory Sulfur-Reducing Bacteria. In: **The Prokaryotes**. Springer Verlag Berlin Heidelberg, p. 926–940, 2005.
- PIRES, A. DE S. *et al.* Molecular diversity and abundance of the microbial community associated to an offshore oil field on the southeast of Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 160, 2021.
- PLUGGE, C. M. *et al.* Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–8, 2011.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 6, p. 217–218, 1995.
- POSTGATE, J. R. Recent advances in the study of the Sulphate-reducing Bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 29, n. 4, p. 425–441, 1965.
- PROCÓPIO, L. The era of ‘omics’ technologies in the study of microbiologically influenced corrosion. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 3, p. 341–356, 2020.
- QU, L. *et al.* *Sunxiuqinia elliptica* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum bacteroidetes isolated from sediment in a sea cucumber farm. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2885–2889, 2011.
- QUILLET, L. *et al.* Abundance, Diversity and Activity of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Heavy Metal-Contaminated Sediment from a Salt Marsh in the Medway Estuary (UK). **Marine Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 363–381, 2012.
- RABUS, R. *et al.* A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 66, p. 55–321, 2015.
- RAIYANI, N. M.; SINGH, S. P. Taxonomic and functional profiling of the microbial communities of Arabian Sea: A metagenomics approach. **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4361–4369, 2020.

- RØDER, H. L. *et al.* Unravelling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 5–16, 2020.
- RÖMLING, U. *et al.* Microbial biofilm formation: A need to act. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, n. 2, p. 98–110, 2014.
- SAFFORD, H. R.; BISCHSEL, H. N. Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. **Water Research**, v. 151, p. 110–133, 2019.
- SALGAR-CHAPARRO, S. J. *et al.* Nutrient level determines biofilm characteristics and subsequent impact on microbial corrosion and biocide effectiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 7, p. 1–23, 2020.
- SANDERS, P. F.; STURMAN, P. J. Biofouling in the Oil Industry. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Eds.). **Petroleum Microbiology**. Washington, D. C.: ASM Press, p. 171–198, 2005.
- SANSUPA, C. *et al.* Can we use functional annotation of prokaryotic taxa to assign the ecological functions of soil bacteria. **Applied Sciences**, v. 11, n. 688, p. 1–18, 2021.
- SANTOS, J. C. DOS *et al.* Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 151, n. December 2019, p. 104966, 2020.
- SANTOS, S. R.; OCHMAN, H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 754–759, 2004.
- SCOFFIELD, J.; WU, H. **Microbial biofilms**. Elsevier Inc., 2019.
- SENTHILMURUGAN, B. *et al.* Microbially induced corrosion in oilfield: microbial quantification and optimization of biocide application. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 8, p. 2640–2650, 2019.
- SENTHILMURUGAN, B. *et al.* Assessment of microbiologically influenced corrosion in oilfield water handling systems using molecular microbiology methods. **Upstream Oil and Gas Technology**, v. 7, p. 1–6, 2021.

- SEYMOUR, J. R. A sea of microbes: the diversity and activity of marine microorganisms. **Microbiology Australia**, v. 35, n. 4, p. 183–187, 2014.
- SHEN, Y. *et al.* Control of microbial sulfide production by limiting sulfate dispersal in a water-injected oil field. **Journal of Biotechnology**, v. 266, p. 14–19, 2018.
- SHI, X. *et al.* Long-Term Biocide Efficacy and Its Effect on a Souring Microbial Community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 17, p. 1–21, 2021.
- SILVA, C. C. *et al.* Monitoring the bacterial community dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–25, 2010.
- SKOVHUS, T. L.; ECKERT, R. B.; RODRIGUES, E. Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—Overview and a North Sea case study. **Journal of Biotechnology**, v. 256, p. 31–45, 2017.
- SOKOLOVA, D. S. *et al.* Sulfidogenic microbial communities of the uzen high-temperature oil field in Kazakhstan. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1–20, 2021.
- SOLEIMANI, S.; ORMECI, B.; ISGOR, O. B. Growth and characterization of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  biofilm on concrete surfaces as a protective layer against microbiologically influenced concrete deterioration (MICD). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1093–1102, 2013.
- STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.
- TAKAI, K. *et al.* *Sunxiuqinia faeciviva* sp. nov., a facultatively anaerobic organoheterotroph of the Bacteroidetes isolated from deep seafloor sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 5, p. 1602–1609, 2013.
- TILLEY, F. W. Variations in Hydrogen Sulphide Production By Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 8, n. 2, p. 115–120, 1923.
- TIWARI, A. *et al.* Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. **Science of the Total Environment**, v. 837, p. 1–12, 2022.

UL-HASAN, S. *et al.* Community ecology across bacteria, archaea and microbial eukaryotes in the sediment and seawater of coastal Puerto Nuevo, Baja California. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–19, 2019.

VAN NEVEL, S. *et al.* Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. **Water Research**, v. 113, p. 191–206, 2017.

VIGNERON, A. *et al.* Beyond the tip of the iceberg; A new view of the diversity of sulfite- and sulfate-reducing microorganisms. **ISME Journal**, v. 12, n. 8, p. 2096–2099, 2018.

WANG, Y. *et al.* Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 416–424, 2010.

WEISSBECKER, C.; BUSCOT, F.; WUBET, T. Preservation of nucleic acids by freeze-drying for next generation sequencing analyses of soil microbial communities. **Journal of Plant Ecology**, v. 10, n. 1, p. 81–90, 2017.

WILLIAMS, J. M. **Getting Reliable On-Site H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub> Concentrations for Anti-Corrosion Measures in Gas Wells**. 13th Middle East Oil Show & Conference. 2003.

XUE, Y.; VOORDOUW, G. Control of microbial sulfide production with biocides and nitrate in oil reservoir simulating bioreactors. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–11, 2015.

YOON, J.; KASAI, H. *Sunxiuqinia rutila* sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes isolated from marine sediment. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 28–32, 2014.

ZAIN, W. S. M.; SALLEH, N. I. H.; ABDULLAH, A. Natural Biocides for Mitigation of Sulphate Reducing Bacteria. **International Journal of Corrosion**, v. 2018, 2018.

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

ZHANG, K. *et al.* A novel method: using an adenosine triphosphate (ATP) luminescence-based assay to rapidly assess the biological stability of drinking water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4269–4277, 2019.

ZHOU, J. *et al.* Distribution Patterns of Microbial Community Structure Along a 7000-Mile Latitudinal Transect from the Mediterranean Sea Across the Atlantic Ocean to the Brazilian Coastal Sea. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 3, p. 592–609, 2018.

ZHOU, L. Y. *et al.* *Maribellus luteus* gen. Nov., sp. nov., a marine bacterium in the family prolixibacteraceae isolated from coastal seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 2388–2394, 2019.

## APÊNDICE A

**Tabela 1 – Comparação de resultados de tratamentos com biocida em função das técnicas de monitoramento de microrganismos.** Com exceção do NMP, os resultados são representados pela média das triplicatas. Os resultados da titulação de H<sub>2</sub>S estão repetidos para as comunidades sésseis e planctônicas, já que é dosado o composto presente no meio, sem diferenciação das comunidades celulares.

Tipo de tratamento	Tipo de amostra	Tipo de célula	Tempo	PRS			Bactérias Totais		Células totais
				PRS/mL (NMP)	<i>dsr</i> /mL (ddPCR)	ppm de H <sub>2</sub> S (Titulação)	16S RNAr/mL (ddPCR)	pg ATP/mL ou cm <sup>2</sup> (ATP)	Células/ml (citometria)
Preventivo	Controle	<i>Planctônicas</i>	Dia 3	2,1 x 10 <sup>6</sup>	5,7 x 10 <sup>3</sup>	6,3 x 10 <sup>2</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>	8,7 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 5	3,5 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>3</sup>	5,9 x 10 <sup>2</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>
			Dia 7	3,5 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>3</sup>	4,9 x 10 <sup>2</sup>	4,8 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>5</sup>	5,8 x 10 <sup>5</sup>
			Dia 9	2,8 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	8,0 x 10 <sup>5</sup>
		<i>Sésseis</i>	Dia 3	1,4 x 10 <sup>7</sup>	7,7 x 10 <sup>2</sup>	6,3 x 10 <sup>2</sup>	8,533 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 5	3,5 x 10 <sup>4</sup>	7,1 x 10 <sup>2</sup>	5,9 x 10 <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 7	2,1 x 10 <sup>6</sup>	2,6 x 10 <sup>2</sup>	4,9 x 10 <sup>2</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 9	9,3 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>
	Tratamento	<i>Planctônicas</i>	Dia 3	2,3 x 10 <sup>2</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>	1,9 x 10 <sup>1</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup>	9,1 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 5	9,3	6,1 x 10 <sup>2</sup>	2,1 x 10 <sup>1</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	3,0 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 7	2,8 x 10 <sup>2</sup>	7,7 x 10 <sup>2</sup>	8,9 x 10 <sup>1</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup>	3,3 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>
			Dia 9	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	9,4 x 10 <sup>4</sup>	6,4 x 10 <sup>4</sup>	9,8 x 10 <sup>5</sup>
	<i>Sésseis</i>	Dia 3	1,1 x 10 <sup>7</sup>	2,3 x 10 <sup>2</sup>	1,9 x 10 <sup>1</sup>	6,4 x 10 <sup>3</sup>	3,4 x 10 <sup>3</sup>	7,2 x 10 <sup>4</sup>	

		Dia 5	$4,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^1$	$1,0 \times 10^5$	$8,7 \times 10^2$	$2,9 \times 10^4$
		Dia 7	$1,5 \times 10^6$	$4,8 \times 10^2$	$8,9 \times 10^1$	$3,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
		Dia 9	$9,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$
		Dia 3	$2,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$3,2 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$
	Controle	Dia 5	$3,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$
		Dia 7	$9,3 \times 10^4$	$6,9 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$
		Dia 9	$2,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$8,3 \times 10^4$	$7,0 \times 10^5$
		Dia 3	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$
	Corretivo	Dia 5	$1,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
		Dia 7	$1,4 \times 10^7$	$3,1 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$9,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
		Dia 9	$1,4 \times 10^7$	$5,9 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
		Dia 3	$2,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$8,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
	Tratamento – 4 horas	Dia 5	$2,1 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$	$2,6 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$
		Dia 7	$9,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	$5,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
		Dia 9	$2,1 \times 10^6$	$4,7 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$
		Dia 3	$1,1 \times 10^7$	$3,1 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$9,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$
	Tratamento – 4 horas	Dia 5	$2,0 \times 10^4$	$3,8 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$
		Dia 7	$1,5 \times 10^4$	$4,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
		Dia 9	$2,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$
		Tratamento – 4 horas	Dia 3	$7,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$

24 horas	Dia 5	$4,3 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$6,9 \times 10^3$
	Dia 7	$1,1 \times 10^5$	$7,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$7,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
	Dia 9	$7,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$9,7 \times 10^4$	$7,4 \times 10^5$
<i>Sésseis</i>	Dia 3	$4,3 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$6,6 \times 10^5$	$9,8 \times 10^3$
	Dia 5	$4,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$
	Dia 7	$1,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$9,7 \times 10^2$	$9,2 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$
	Dia 9	$1,4 \times 10^7$	$5,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$

**Tabela 2 – Análise estatística do índice de *Shannon*.** Amostras que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Amostras individuais						Meio de cultivo					
Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento
EF	4,49	A	S1BF	3,24	BCD	Frescas	4,21	A	BANHT	2,99	B
SF	3,93	AB	E6P	3,92	AB	Postgate E	3,74	AB	BFHT	2,99	B
E1P	3,71	AB	S6P	3,14	BCD	<b>Tempo de cultivo</b>					
S1P	4,19	A	E6BAN	4,29	A	Frescas	4,21	A			
E1BAN	2,42	D	S6BAN	3,86	AB	1 mês	3,09	B	6 meses	3,39	AB
S1BAN	1,37	E	E6BF	2,32	D	<b>Porção da membrana</b>					
E1BF	3,60	ABC	S6BF	2,79	CD	Entrada	3,54	A	Saída	3,22	A

**Tabela 3 – Análise estatística do índice de Riqueza (S).** Amostras que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Amostras individuais						Meio de cultivo					
Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento
EF	626	A	S1BF	382	ABC	Frescas	609	A	BANHT	354	B
SF	592	AB	E6P	321	ABC	Postgate E	327	B	BFHT	343	B
E1P	238	C	S6P	336	ABC	<b>Tempo de cultivo</b>					
S1P	413	ABC	E6BAN	486	ABC	Frescas	609	A			
E1BAN	258	BC	S6BAN	460	ABC	1 mês	313	B	6 meses	369	B
S1BAN	214	C	E6BF	320	ABC	<b>Porção da membrana</b>					
E1BF	375	ABC	S6BF	294	ABC	Entrada	384	A	Saída	375	A

**Tabela 4 – Análise estatística do índice de Chao-1.** Amostras que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Amostras individuais						Meio de cultivo					
Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento
EF	720,30	A	S1BF	412,30	ABC	Frescas	693,70	A	BANHT	387,10	B
SF	667,10	AB	E6P	362,20	BC	Postgate E	350,70	B	BFHT	377,3	B
E1P	256,00	C	S6P	358,40	BC	<b>Tempo de cultivo</b>					
S1P	426,00	ABC	E6BAN	533,70	ABC	Frescas	693,70	A			
E1BAN	273,50	C	S6BAN	499,00	ABC	1 mês	337,80	B	6 meses	405,60	B
S1BAN	242,2	C	E6BF	358,20	BC	<b>Porção da membrana</b>					
E1BF	416,27	ABC	S6BF	322,4	BC	Entrada	417,20	A	Saída	418,20	A

**Tabela 5 – Análise estatística do índice de *Simpson*.** Amostras que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Amostras individuais						Meio de cultivo					
Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento	Fator	Média	Agrupamento
EF	0,03	G	S1BF	0,15	CDE	Frescas	0,06	AB	BANHT	0,22	A
SF	0,09	EFG	E6P	0,05	FG	Postgate E	0,07	B	BFHT	0,19	AB
E1P	0,05	FG	S6P	0,13	DEF	<b>Tempo de cultivo</b>					
S1P	0,05	FG	E6BAN	0,04	G	Frescas	0,06	A			
E1BAN	0,24	C	S6BAN	0,07	EFG	1 mês	0,18	A	6 meses	0,14	A
S1BAN	0,52	A	E6BF	0,34	B	<b>Porção da membrana</b>					
E1BF	0,08	EFG	S6BF	0,20	CD	Entrada	0,12	A	Saída	0,17	A