

HELENA SANTIAGO LIMA

**ESTUDO DA COMUNIDADE DE BRS NA PRODUÇÃO DE H₂S EM AMOSTRAS
ASSOCIADAS AO PROCESSO DE BIOCORROSÃO NA INDÚSTRIA DO
PETRÓLEO**

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

Orientadora: Cynthia Canedo da Silva

Coorientadores: José Guilherme P. Martin
Hilário Cuquetto Mantovani

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

L732e
2023

Lima, Helena Santiago, 1994-

Estudo da comunidade de BRS na produção de H₂S em amostras associadas ao processo de biocorrosão na indústria do petróleo / Helena Santiago Lima. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (106 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.240>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Petróleo - Biodegradação. 2. Bactérias redutoras de sulfato. 3. Sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio. I. Silva, Cynthia Canêdo da, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 662.622

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


HELENA SANTIAGO LIMA

ESTUDO DA COMUNIDADE DE BRS NA PRODUÇÃO DE H₂S EM AMOSTRAS ASSOCIADAS AO PROCESSO DE BIOCORROSÃO NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO


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

APROVADA: 13 de março de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 HELENA SANTIAGO LIMA
Data: 15/05/2023 11:28:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Helena Santiago Lima
Autora

Documento assinado digitalmente
 CYNTHIA CANEDO DA SILVA
Data: 16/05/2023 06:05:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Cynthia Canedo da Silva
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida. Agora mudam-se as metas e as expectativas para novas conquistas. Sei o quanto é importante as pessoas na nossa caminhada, não há profissional capaz de levar a vida isoladamente e é com essa certeza que agradeço aos que tiveram presente nessa etapa. À minha família, peça fundamental nessa caminhada, só tenho a agradecer. Mãe, obrigada pelo seu amor incondicional. Vó, você que viveu esse sonho comigo e hoje estamos realizando. Minha irmã Marina que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis. Meus sobrinhos, Laura e Murilo, que me fizeram querer ser uma pessoa melhor. Minha madrinha que sempre me ensinou o caminho. Ao meu padrasto Léo que é um exemplo a ser seguido. Aos meus tios e tias, primos e primas, meu muito obrigada!

Aos meus amigos de São João, em especial a Laura e Albaline, vocês fazem parte da minha família, vivemos, sofremos e vencemos juntos! A galera do LAMAP, onde passei muitos momentos divertidos, obrigada pelos ensinamentos. Tenho me espelhado em muitos de vocês. A Lívia, que é uma irmã que vou levar para o resto da vida, obrigada por ouvir, rir e chorar comigo. A minha orientadora Cynthia, obrigada pela oportunidade, apoio, confiança e amizade, sem você nada disso teria sido possível. A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia que me proporcionaram a oportunidade de crescimento profissional e pessoal. A Petrobrás, CNPq, CAPES e FAPEMIG pela bolsa concedida e financiamento do projeto. Finalizo com a certeza de que o futuro dependerá só daquilo que tenho construído no presente.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

LIMA, Helena Santiago, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Estudo da comunidade de BRS na produção de H₂S em amostras associadas ao processo de biocorrosão na indústria do petróleo.** Orientadora: Cynthia Canedo da Silva. Coorientadores: José Guilherme Prado Martin e Hilário Cuquetto Mantovani.

Os procariotos redutores de sulfato (PRS) são um grupo polifilético e metabolicamente diverso de microrganismos anaeróbicos, amplamente difundidos na natureza e que desempenham um papel essencial no ciclo global de carbono e enxofre. Esse grupo tem sido amplamente estudado, pois sua presença acarreta elevados prejuízos econômicos, operacionais e ambientais em diversos setores industriais. A indústria petroquímica é um setor que enfrenta sérios problemas relacionados com a presença de PRS na cadeia produtiva, sendo esse grupo responsável por problemas com a biocorrosão, biofouling, souring e toxicidade aos operadores. Todas as etapas do processo de extração do petróleo estão susceptíveis ao crescimento microbiano, em especial, dos PRS. Assim, os capítulos dessa tese foram desenvolvidos abordando diversos aspectos envolvendo a presença dos PRS na indústria do petróleo. No capítulo 1, foi avaliado o uso de solução comercial de preservação de DNA e meios de enriquecimento como metodologia de preservação das amostras, para a manutenção da composição da comunidade microbiana o mais próximo as condições de campo. Todas as metodologias de preservação avaliadas tiveram impacto na estrutura da comunidade, no entanto, os tratamentos P-PW e M-PRS foram os que mais se assemelharam às condições naturais do campo, mostrando que ambos têm potencial para serem aplicados no rotina das indústrias de petróleo, entretanto, para análises que envolvam apenas o estudo da comunidade baseado em DNA, o P-PW é a melhor opção por ter maior similaridade com o PW, porém, se as análises a jusante dependerem do cultivo de microrganismos, o M-PRS é a melhor opção, uma vez que não impede o crescimento celular. No capítulo 2, foi avaliado a cinética de produção de H₂S em amostras provenientes de diferentes setores da cadeia produtiva do petróleo, para inferência da relação entre a produção de H₂S e a diferença na estrutura e composição da comunidade bacteriana presentes nesses ambientes. Foi observado que, apesar dos PRS serem o grupo microbiano responsáveis pela produção de H₂S, o fator modulador dessa produção está

relacionado com a biomassa bacteriana total e que interações ecológicas que ocorrem na comunidade bacteriana é determinante para definir a velocidade de produção de H₂S no ambiente. No capítulo 3, foi utilizada a ferramenta de aprendizado de máquinas com o intuito de testar a efetividade da composição da comunidade bacteriana em prever a abundância dos PRS total de um ambiente, foi observado que há 13 gêneros que são possíveis biomarcadores para a população de PRS em ambientes associados a indústria do petróleo. No capítulo 4 foi avaliado o efeito, corretivo e preventivo, da aplicação THPS em impedir ou retardar o desenvolvimento da comunidade planctônica e do biofilme de cultura mista, proveniente de plataformas de extração de petróleo. Foi observado que resistência ao efeito do THPS varia a depender do estado da comunidade e a aplicação de dose subletal do biocida pode induzir o aumento da comunidade de PRS, mostrando a necessidade de entender a dinâmica de formação da comunidade nesses ambientes e os fatores que interferem na resistência, para o planejamento eficiente do controle dos PRS.

Palavras-chave: THPS. Procariotos redutores de sulfato. Souring. Biofouling. Sulfeto de hidrogênio.

ABSTRACT

LIMA, Helena Santiago, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2023. **Study of the BRS community on the production of H₂S in samples associated with the biocorrosion process in the oil industry.** Adviser: Cynthia Canedo da Silva. Co-advisers: José Guilherme Prado Martin and Hilário Cuquetto Mantovani.

Sulfate-reducing prokaryotes (SRP) are a polyphyletic and metabolically diverse group of anaerobic microorganisms, widespread and essential in the global carbon-sulfur cycle. This group has been widely studied, as its presence entails high economic, operational, and environmental losses in several industrial sectors. The petrochemical industry is a sector that faces serious problems related to the presence of SRP in the production chain, and this group is responsible for problems with biocorrosion, biofouling, souring, and toxicity to operators. All stages of the oil extraction process are susceptible to microbial growth, in particular SRP. Thus, the chapters of this thesis were developed, addressing various aspects involving the presence of SRP in the oil industry. In Chapter 1, a commercial solution for DNA preservation and enrichment media was evaluated as a methodology for preserving samples to maintain the composition of the microbial community as close as possible to field conditions. All evaluated preservation methodologies had an impact on the community structure. However, the P-PW and M-PRS treatments were the ones that most resembled the natural conditions of the field, showing that both have the potential to be applied in industries. However, for analyses that involve only the study of the community based on DNA, the P-PW is the best option, because it has a more significant similarity with the PW. However, if the downstream analyzes depend on the cultivation of microorganisms, the M-PRS is the best option as it does not impede cell growth. In chapter 2, the kinetics of H₂S production was evaluated in samples from different sectors of the petroleum production chain to infer the relationship between H₂S production and the difference in the structure and composition of the bacterial community present in these environments. It was observed that, despite the SRP being the microbial group responsible to produce H₂S, the modulating factor of this production is related to the total bacterial biomass and the ecological interactions that occur in the bacterial community are determinant to define the speed of production of H₂S in the environment. In chapter 3, the machine learning tool was used in order to test the effectiveness of the bacterial community composition in

predicting the total abundance of PRS in an environment. It was observed that 13 genera are possible biomarkers for the SRP population in environments associated with the oil industry. In chapter 4, the effect, corrective and preventive, of the THPS application in preventing or delaying the development of the planktonic and biofilm community from the mixed culture from oil extraction platforms were evaluated. It was observed that resistance to the effect of THPS varies depending on the state of the community. Applying a sublethal dose of the biocide can induce an increase in the SRP community, showing the need to understand the dynamics of community formation in these environments and the factors that interfere with resistance to efficient planning of SRP control.

Keywords: THPS. Sulfate-reducing prokaryotes. Biofouling. Souring. Hydrogen sulfide.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
CAPÍTULO 1: Effect of preservation and enrichment on the bacterial community from an oil extraction platform.	16
1. Introduction:.....	16
2. Material and Methods	17
2.1. Sample collection and preservation and different enrichment culture media 17	
2.2. Total DNA extraction and amplicon sequencing	18
2.3. Data processing and statistical analysis	19
3. Results	19
4. Discussion:	27
5. Conclusions	31
6. References:	31
CAPÍTULO 2: Taxa de produção de H ₂ S de diferentes culturas mistas provenientes de ambientes associados a indústria de petróleo.....	36
1. Introdução	36
2. Material e Métodos	38
2.1. Coleta das águas de produção e montagem dos microcosmos	38
2.2. Avaliação da produção de H ₂ S por titulação.....	38
2.3. Extração de DNA e quantificação de bactérias totais e bactérias redutoras de sulfato por meio da técnica de ddPCR.....	39
2.4. Sequenciamento e processamento dos dados	40
2.5. Análises estatísticas	41
3. Resultados	41
4. Discussão	50
5. Conclusões.....	54
6. Referências	54
7. Material suplementar	60
CAPÍTULO 3: Uso de aprendizado de máquinas para a construção de um modelo para predição da abundância de bactérias redutoras de sulfato	61
1. Introdução	61
2. Material e Métodos	62
2.1. Descrição dos conjuntos de dados.....	62
2.2. Construção do modelo preditivo	63
2.3. Análises estatísticas e filogenéticas	64

3. Resultados e discussão	64
4. Conclusões	75
5. Referências	75
CAPÍTULO 4: Efeito corretivo e preventivo do uso do THPS sobre a comunidade planctônica e sésil de cultura mista proveniente da indústria de petróleo.....	81
1. Introdução	81
2. Material e métodos	83
2.1. Montagem dos microcosmos.....	83
2.2. Quantificação do sulfeto de hidrogênio.....	84
2.3. Sequenciamento e processamento dos dados	84
2.4. Análises de bioinformática e estatística.....	84
3. Resultados	85
3.1. Efeito preventivo da aplicação do THPS	85
3.2. Efeito corretivo da aplicação do THPS	90
4. Discussão	96
5. Conclusões.....	100
6. Referências	101
Considerações Finais.....	106

INTRODUÇÃO GERAL

Os procariotos redutores de sulfato (PRS) são um grupo diverso de microrganismos anaeróbicos, amplamente difundidos na natureza e que desempenham um papel essencial no ciclo global de carbono e enxofre. Esse grupo é composto principalmente por representantes do domínio Bacteria, porém, já foram descritos representantes do domínio Archaea. Apesar de apresentar elevada diversidade metabólica, esse grupo tem em comum a capacidade única de realizar a redução dissimilatória do sulfato. Esse processo consiste na utilização do íon sulfato (SO_4^{2-}), como aceptor final na cadeia transportadora de elétrons, com a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S).

Os PRS foram descritos como tendo a capacidade de oxidar uma variedade de compostos orgânicos, incluindo açúcares, aminoácidos e compostos de 1 carbono, sendo que, mais de 100 diferentes compostos já foram relatados como substratos utilizáveis por esses microrganismos, demonstrando a grande diversidade metabólica dos diferentes representantes do grupo PRS. Nos ambientes anóxicos, os PRS desempenham papel principal na mineralização da matéria orgânica, sendo que a decomposição dos compostos orgânicos pode ocorrer de forma incompleta a acetato ou completamente a dióxido de carbono. Além dos compostos orgânicos, os PRS podem crescer utilizando compostos inorgânicos, o H_2 já foi descrito como fonte de elétrons para esse grupo.

Além da forma planctônica, os PRS, como a maioria dos procariotos, possuem a habilidade de se agruparem na forma de biofilme. Os biofilmes são estruturas complexas compostas principalmente por exopolissacarídeos (EPS). Ecologicamente, a formação de biofilme está relacionada com importantes vantagens como a proteção contra compostos antimicrobianos, elevação de resistência a estresses de origem abióticas; interações com outros microrganismos, captura e transporte de nutrientes.

Devido a essa versatilidade metabólica, os PRS possuem a habilidade de colonizar uma ampla gama de habitats que apresentam variações nas condições ambientais, sendo detectados em ecossistemas com elevado gradiente físico-químico, com pH, temperatura e salinidade, tanto extremamente baixo, quanto alto. Já foram descritos em sedimentos marinhos e de água doce, reservatórios de

petróleo e fontes hidrotermais, bem como em organismos vivos, como nos ruminantes, no trato intestinal humano e cavidades orais.

Nos ambientes anóxicos, a mineralização da matéria orgânica é mais complexa e requer a interação entre diferentes grupos fisiológicos de microrganismos. Cada grupo microbiano realiza a oxidação parcial da matéria orgânica, e seus produtos metabólicos são assimilados por outros grupos, até a completa oxidação do composto orgânico. As interações ecológicas que os PRS desempenham com os outros microrganismos integrantes do ecossistema depende das condições físico-químicas presentes. Geralmente, os PRS tendem a viver em sintrofismo com bactérias fermentadoras. Essas bactérias têm a capacidade de utilizar macromoléculas e transformar em ácidos orgânicos voláteis (como os ácidos acético, propiônico e butírico), que servem como fonte de carbono para os PRS.

Na presença de excesso de sulfato, os PRS competem com metanogênicos e acetogênicos por substratos comuns, entretanto, como o acetato é fonte de carbono preferencial para muitos PRS, quando o acetato não é fornecido, os redutores de sulfato tendem a coexistem com os acetogênicos. Na ausência de sulfato, no entanto, os PRS crescem acetogenicamente em sintrofia com os metanogênicos. Embora a fisiologia da relação simbiótica/sintrófica envolvendo os PRS e os microrganismos que compõe o mesmo habitat tenha sido amplamente estudada, relativamente pouco se sabe sobre as complexas redes regulatórias envolvidas nessas interações.

O grupo dos PRS tem sido amplamente estudado, seja pelo potencial uso biotecnológico ou pelos prejuízos econômicos que causam em diversos setores e danos à saúde humana e animal. Eles podem ser usados de forma benéfica em processos biotecnológicos para remover metais pesados e compostos de enxofre oxidados de água residuárias. Porém, também são responsáveis por efeitos danosos e indesejáveis em diversos setores industriais, como no tratamento anaeróbico de águas residuais agroindustriais, em que, a redução de sulfato resulta em menores rendimentos da produção de metano. Além disso, o sulfeto de hidrogênio gerado pelo metabolismo desse grupo microbiano é tóxico, inflamável e corrosivo, sendo que a produção desse gás está relacionada com diversos problemas econômicos, operacionais e ambientais enfrentados por diversos setores industriais.

A indústria petroquímica é um setor que enfrenta sérios problemas relacionados com a presença de PRS na cadeia produtiva. Sendo que, o principal problema está relacionado com a corrosão microbiologicamente influenciada (MIC), ou biocorrosão, esse processo é um dos principais responsáveis pela redução da vida útil das estruturas físicas da indústria do petróleo, por isso, sem a devida manutenção, incorre em rompimento e vazamento de óleo para o ambiente. Além disso, a colonização microbiana está relacionada com outras problemáticas, os PRS são capazes de aderir à superfície interna de tubulações e tanques e formar biofilmes, que, devido ao metabolismo microbiano, vai proporcionar a precipitação de sulfetos de ferro na parede das tubulações. Como consequência, ocorre o fenômeno de bioincrustação (*biofouling*), que culmina na diminuição do fluxo de passagem do petróleo nos dutos e no aumento da biocorrosão. A elevação da produção do H₂S nos reservatórios acarreta no processo conhecido como acidulação biogênica (*Biological Souring*), resultando em perda de qualidade do óleo e do gás extraídos. Outro grande desafio enfrentado é a exposição dos operadores a esse gás extremamente tóxico, uma vez que, a exposição repetida e prolongada causa dores de cabeça, náuseas, irritação dos olhos, problemas respiratórios e, em situações mais graves e prolongadas, podem incorrer em perda de consciência e morte.

Os ambientes relacionados a indústria do petróleo apresentam características físico-químicas extremamente favoráveis a colonização dos PRS, pois são majoritariamente anóxicos e apresentam elevadas concentrações de sulfato. A cadeia produtiva do petróleo pode ser dividida em 6 etapas principais, sendo elas, (i) perfuração dos reservatórios de petróleo; (ii) completação, esta etapa é composta por um conjunto de operações com o intuito de equipar o poço para o início da produção do petróleo de forma segura; (iii) produção, que consiste na extração do petróleo dos reservatórios; (iv) escoamento e armazenamento, que consiste nas atividades de transferência, transporte e estocagem do petróleo; (v) refino do petróleo bruto e; (vi) distribuição dos derivados do petróleo. Todas essas etapas, em maior ou menor grau, encontram-se susceptíveis ao crescimento microbiano, em especial, dos PRS.

Nas etapas I e II, as formas mais comuns de contaminação microbiana podem ocorrer por meio do fluídos que são injetados para a contemplação das etapas. Na etapa III, a proliferação microbiana pode ocorrer devido ao processo de

injeção de água nos reservatórios, geralmente é utilizada a água do mar, que possui elevada concentração de sulfato utilizado para o crescimento dos PRS. A etapa IV é uma das etapas críticas para os problemas relacionados a presença dos PRS na indústria do petróleo, quanto maiores forem os teores de água de produção transportados e armazenados, maior a produção de H₂S, assim, há o agravamento da biocorrosão, podendo acarretar em sérios riscos de rompimento das estruturas e, por consequência, vazamentos, bem como, riscos de exposição ocupacional dos operadores ao H₂S. Na etapa V, os problemas relacionados com a presença de microrganismos são, geralmente, irrisórios, uma vez que há a remoção quase completa da água de produção antes do óleo ser enviados as refinarias. Na etapa IV, podem ocorrer contaminações microbianas que estão relacionadas com a degradação dos produtos e a biocorrosão dos compartimentos metálicos em que estes são transportados e armazenados.

Assim, nos capítulos dessa tese foram abordados diversos aspectos para o melhor entendimento da diversidade, ecologia bem como do comportamento dos PRS na comunidade microbiana de diferentes ambientes da indústria do petróleo. O avanço nas tecnologias de sequenciamento massivo permitiu o acesso e estudo aprofundado de microbiomas relacionado a diversos ambientes. Entretanto, para a que a avaliação da comunidade microbiana seja representativa das condições naturais, a coleta e o rápido processamento das amostras são de fundamental importância, tornando-se uma etapa crítica para o bom desempenho dessa técnica. A coleta de amostras relacionadas a indústria do petróleo requer, muitas vezes, grande esforço logístico, uma vez que muitas plataformas marítimas ficam distantes dos laboratórios de pesquisa, inviabilizando o processamento das amostras de forma imediata. Assim, o objetivo do capítulo 1 foi avaliar o uso de solução comercial de preservação de DNA e meios de enriquecimento como metodologia de preservação eficiente das amostras para a manutenção da composição da comunidade microbiana o mais próximo às condições de campo.

A composição da comunidade bacteriana é variável nos diferentes ambientes relacionados com a indústria do petróleo, pois a colonização dos PRS está envolvida com a disponibilidade de sulfato e fontes de carbono. Como consequência, diferentes ambientes fornecem distintas condições para o crescimento microbiano e estabelecimento de interações ecológicas de diversas naturezas, e, como consequência, influência na produção de H₂S. Assim, acredita-

se que existem comunidades bacterianas, a depender da sua composição, que são mais eficientes em produzir o H_2S . Por isso, o capítulo 2 teve como objetivo avaliar a cinética de produção de H_2S em amostras provenientes de diferentes setores da cadeia produtiva do petróleo, para inferência da relação entre a produção de H_2S e a diferença na estrutura e composição da comunidade bacteriana presentes nesses ambientes.

Uma vez comprovada que a comunidade microbiana desses ambientes apresenta elevada complexidade biológica, e que essa complexidade da comunidade bacteriana está relacionada, de alguma forma, com fatores que modulam a produção de H_2S , no capítulo 3, como prova de conceito, foi utilizada a ferramenta de aprendizado de máquinas para testar a efetividade da composição da comunidade bacteriana em prever a abundância dos PRS em amostras de diferentes localidades geográficas disponíveis em banco de dados públicos.

Como forma de mitigar os problemas provenientes da presença dos PRS na indústria do petróleo, o uso de uma metodologia eficaz de controle desse grupo torna-se de fundamental importância. Dentre diversas formas de controle, a aplicação de biocidas ainda tem se mostrado a estratégia principal no enfrentamento dessa questão, sendo o THPS uma das substâncias mais utilizadas atualmente pelo setor petrolífero. Assim, a compreensão do comportamento da comunidade microbiana frente a aplicação desse biocida é de fundamental importância na otimização das estratégias de controle da biocorrosão. Nesse contexto, o capítulo 4 teve como objetivo avaliar o efeito, corretivo e preventivo, da aplicação de THPS em impedir ou retardar o desenvolvimento da comunidade planctônica e do biofilme de cultura mista proveniente de plataformas de extração de petróleo.

CAPÍTULO 1: Effect of preservation and enrichment on the bacterial community from an oil extraction platform.

1. Introduction:

Brazil is among the largest oil producers in the world, in October 2022, had the production of approximately 3.2 million barrels per day (ANP, 2022), evidencing their fundamental role in geopolitics and world economy. Associated with this high production, problems caused by microbiologically influenced corrosion (MIC) of metallic components have been highlighted, resulting in environmental, operational and economic loss to this sector. It is estimated that MIC causes 20–40% of the total costs attributed to corrosion in the industry sector, the latest surveys estimated that around US \$2.5 trillion was related to economic losses due to corrosion of metals (Koch et al., 2002; Little et al. 2020; Gu et al. 2021; Liduino et al. 2021; Liduino et al. 2022).

The MIC occurs mainly by the group of sulfate-reducing prokaryotes microorganisms (SRP). Most microorganisms comprising this group belong to the domain Bacteria and class Deltaproteobacteria, however, it is possible to find species of this group belonging to the domain Archaeae (Gieg et al., 2011, Johnson, et al., 2017; Santos et al., 2020). They have in common the ability to carry out the dissimilatory sulfate reduction, in this pathway inorganic sulfur compounds are used, mainly sulfate, as an electron acceptor, and organic compounds or hydrogen as electron donors, forming hydrogen sulfide (H₂S) as a final product, which is one of the main problems encountered by the oil industry (Muyzer e Stams, 2008; Tang et al., 2009). Beyond the SRP, microorganisms originating from oilfield, includes fermentative and methanogenic bacteria, facilitate the MIC (Johnson, et al., 2017; Santos et al., 2020). The interaction between these microorganisms, together with the propitious environmental conditions, favor the production of H₂S in these environments, suggesting that MIC is a multifactorial and multispecies process (Procópio et al., 2022).

In addition to the economic losses caused by the MIC of metallic components, the high production of H₂S leads to (i) reduction in the quality of oil extracted, due to the souring process (Enning e Garrelfs, 2014), and (ii) the generation of health problems for workers in contact with this extremely toxic gas during the oil production (Johnson et al., 2017). In view of all these problems,

monitoring the microbial community in environments related to the oil industry becomes of fundamental importance to prevent and mitigate economic, environmental and operational damage in this sector.

The development of next generation sequencing (NGS) technologies in the last decade has enabled the communities of microorganisms to be explored in rapid and low-cost manner. Thus, it has become an excellent option for carrying out environmental monitoring and has currently been applied to the most different types of samples (Tan et al., 2015; Greay et al., 2018; Santos et al., 2020). Despite the efficiency of this methodology, the collection and rapid processing of samples becomes a critical step for the evaluation of the microbial community to be representative of the natural conditions of the samples (Sales et al., 2019; Silva et al., 2021).

The logistics of collecting production water on oil extraction platforms is complicated, mainly on offshore platforms. So, there is a large time interval between the collection and analysis of samples. Therefore, it becomes necessary to find a way to preserve the samples that will maintain as much as possible the natural characteristics of the bacterial community to be used in further analysis. However, the study of which is the best methodology for preserving the structure of the microbial community is still scarce, mainly in samples from the oil industry (Sales et al., 2019; Silva et al., 2021). Thus, the objective of this work was to evaluate commercial DNA preservation solution and enrichment media to maintain bacterial community structure similar to the natural environment, providing the selection of a methodology that can be applied by the oil industry in order to increase the time window between collection and processing of samples for microbial monitoring.

2. Material and Methods

2.1. Sample collection and preservation and different enrichment culture media

The production water (PW) was collected in 2 different tanks of the oil extraction platform located in the Campos Basin (Macaé-RJ), tanks 3 and 4, in triplicate. For sample preservation (P-PW), the production water was immediately treated with the DNA preservation solution 1:1 (v/v) according to the manufacturer's protocol (LifeGuard®-Qia-gen, Benelux BV).

For the enrichment of mixed cultures, 3 cultivation conditions were tested: i) M-PRS: Postgate E media (Potassium phosphate (KH_2PO_4) $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; Ammonium Chloride (NH_4Cl) $1,0 \text{ g.L}^{-1}$; Sodium sulfate (Na_2SO_4) $1,0 \text{ g.L}^{-1}$; Calcium chloride (CaCl_2) $1,0 \text{ g.L}^{-1}$; Magnesium chloride (MgCl_2) $1,83 \text{ g.L}^{-1}$; Ascorbic acid $0,1 \text{ g.L}^{-1}$; yeast extract $1,0 \text{ g.L}^{-1}$; iron sulfate (FeSO_4) $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; sodium lactate $7,0 \text{ mL.L}^{-1}$ (50 % w/v); rezasurin 4 mL.L^{-1} (0,025% w/v); thioglycollic acid 1% (v/v)) (Postgate, 1984), incubated at 30°C ; ii) T-PRS: Postgate E media (Postgate, 1984), incubated at 45°C ; and iii) BPA: Triple Sugar Iron Medium (Pancreatic Digest of Casein 15 g.L^{-1} ; Lactose 10 g.L^{-1} ; Sucrose 10 g.L^{-1} ; Sodium Chloride 5 g.L^{-1} ; Peptic Digest of Animal Tissue 5 g.L^{-1} ; Yeast Extract 3 g.L^{-1} ; Beef Extract 3 g.L^{-1} ; Dextrose 1 g.L^{-1} ; Ferric Ammonium Citrate $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; Sodium Thiosulfate $0,3 \text{ g.L}^{-1}$; Phenol Red $0,024 \text{ g.L}^{-1}$) (Harrigan et al., 1998), incubated at 30°C . These culture media are used by the oil industry to monitor microbial communities in the oil production chain. The PW were used as an inoculum source (10% v/v), in a hungate tubes containing the respective media, in triplicate. The samples were incubated for 28 days, under anaerobic conditions and at the respective temperatures.

2.2. Total DNA extraction and amplicon sequencing

After collection, the production water was taken to the laboratory and DNA extraction was performed immediately. For samples preserved and enriched in culture media, extraction was performed after an incubation period of 28 days. A volume of 10 mL of each sample was centrifuged for 5 min. at $12,000 \times g$, the precipitate was washed successively, for 5 times, with SET buffer (20 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.5). The precipitate was resuspended in 1.0 mL of SET buffer for genomic DNA extraction, according to the protocol described by Silva et al. (2010). The purity and quantity of the extracted DNA was checked using a Qubit 4 spectrophotometer (Invitrogen, Carlsbad, USA) and visualized on a 1.0% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide. The extracted DNA was sent for amplicon sequencing for the V3 and V4 variable regions of the 16S rRNA gene, using primers 338F (Whiteley et. al., 2000) and 806R (Caporaso et. al., 2011), at Molecular Research DNA (<http://www.mrdnalab.com/>, Shallowater, United States) by the Illumina MiSeq platform, paired-end 150x150pb.

2.3. Data processing and statistical analysis

Raw sequences were processed using DADA2. For the quality control, the first 10 pb of all reads were trimmed and a truncation length of 240 and 200 pb was needed in the forward and reverse bacterial reads, respectively, and the Phred quality score ($Q > 25$) was used as threshold. High-quality reads were then analyzed for the identification of the amplicon sequence variants (ASVs) present in the samples (Callahan et al., 2016) and taxonomically classified using the Silva SSU database v.138 (<http://www.arb-silva.de>).

Singletons were discarded for taxonomy assignment and for statistical analysis ASVs with a prevalence of less than 5% were discarded. First, the data were transformed into relative abundance. Differences in bacterial communities were calculated using alpha-diversity indexes (Richness, Simpson and Shannon) at ASV level. Beta diversity was analyzed using principal coordinate analysis (PCoA) and a dendrogram of Bray-Curtis distance matrix to evaluate similarities among the bacterial communities according to natural (PW) and processed samples (P-PW, M-BRS, T-PRS and BPA). Additionally, the adonis function within the vegan package in R (999 permutations) was performed to test the effects ($p < 0.05$) of enrichment through culture media and sample preservation. To visualize the exclusive and shared genres between treatments, a Venn diagram was constructed using JVenn tools (Bardou et al., 2014). Volcano plot was applied to demonstrate which ASVs were significantly enriched/depleted by treatments, using the tool MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2022); a p-value of 0.05 (with FDR correction) and a FC of 2 and -2 was used as threshold. Using normalized data on ASV abundance, a supervised principal least square-discriminant analysis (PLS-DA) was used to reduce the number of variables (ASVs) and select the most predictive or discriminative to differentiate the production water in field condition (PW) and treated (P-PW, M-PRS, T-PRS and BPA), by VIP score. Both, hierarchical clustering and PLS-DA analyses were performed using MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2022).

3. Results

Principal coordinate analysis (PCoA) of Bray-Curtis demonstrated that samples from tanks 3 and 4 were grouped and the bacterial community was different for each treatment applied, natural or processed sample (Figure 01A). Effect that can also be demonstrated by the dendrogram, it is possible to observe 2

principal clades (Figure 01B). In the first clade, there is a grouping between the natural production water (PW), preserved production water (P-PW) and the samples enriched by the M-PRS, with PW and P-PW showing greater similarity to each other in detriment to the M-PRS. In the second clade, we see the grouping between the samples enriched by BPA and T-PRS, thus, they were the most dissimilar treatments to PW.

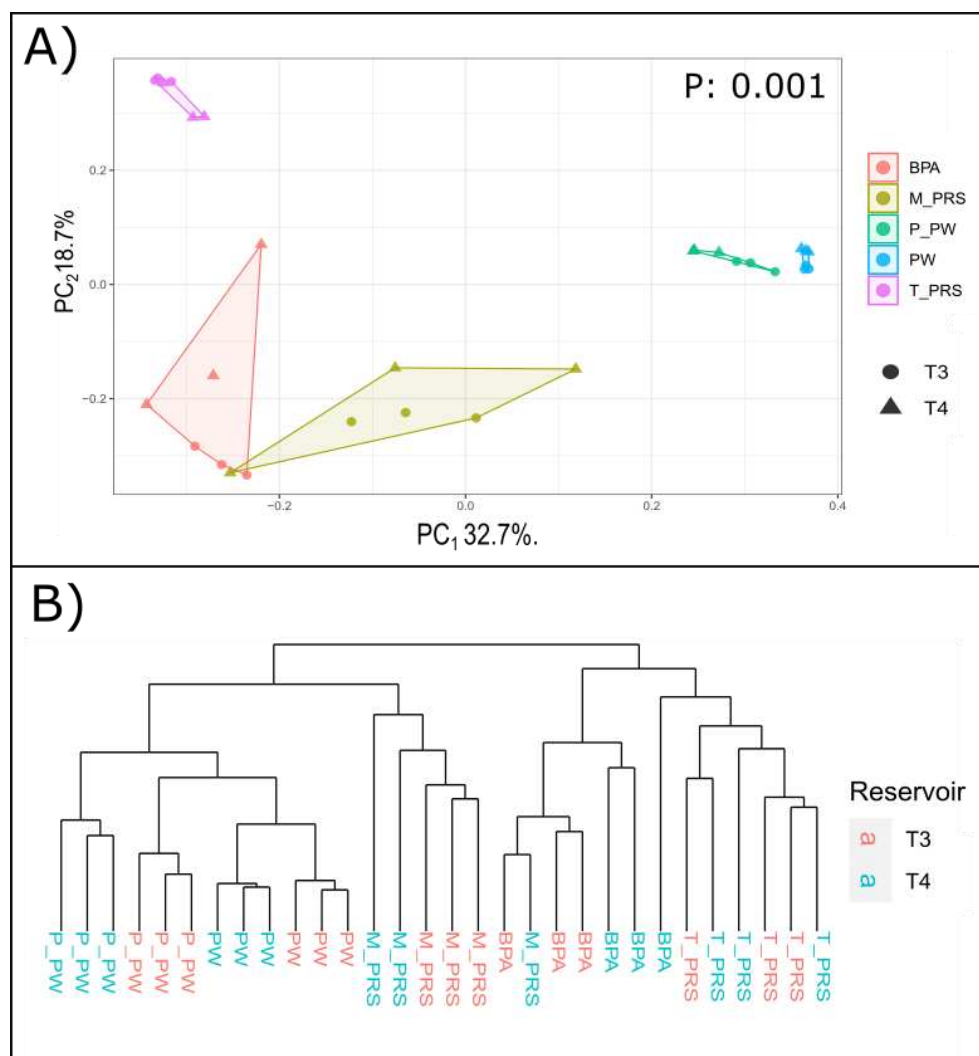


Figure 01: Evaluation of similarity between samples **A)** Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity of bacterial communities at ASV level. The PERMANOVA test results are shown at the top of the figure; **B)** Dendrogram showing similarity of samples based on Bray-Curtis dissimilarity at ASV level. PW: production water; P-PW: Preserved samples; M-PRS: Postgate E media (30°C); T-PRS: Postgate E media (45°C) and BPA: Triple Sugar Iron Medium (30°C).

To assess the effect of treatments on bacterial community diversity, 3 diversity indexes were calculated, Shannon, Richness and Simpson index (Figure 02). In general, samples from tanks 3 and 4 had the same pattern throughout the treatments, for the 3 evaluated indexes (Figure 02), PW showing highest diversity, followed by P-PW and M-PRS, and finally BPA and T-PRS. For the Shannon index, PW presented a mean of 3.5 ± 0.3 , while P-PW and M-PRS presented 2.5 ± 0.3 and 3.2 ± 0.6 , respectively, whereas T-PRS and BPA presented 2.0 ± 0.5 and 1.7 ± 0.3 , respectively (Figure 02A). For the Richness index, PW presented a mean of 943 ± 38 , while P-PW and M-PRS presented 671 ± 164 and 567 ± 209 , respectively, whereas T-PRS and BPA presented 254 ± 24 and 361 ± 88 , respectively (Figure 02B). For the Simpson index, PW presented a mean of 0.86 ± 0.06 , while P-PW and M-PRS presented 0.74 ± 0.04 and 0.87 ± 0.08 , respectively, whereas T-PRS and BPA presented 0.66 ± 0.18 and 0.65 ± 0.09 , respectively (Figure 02C).

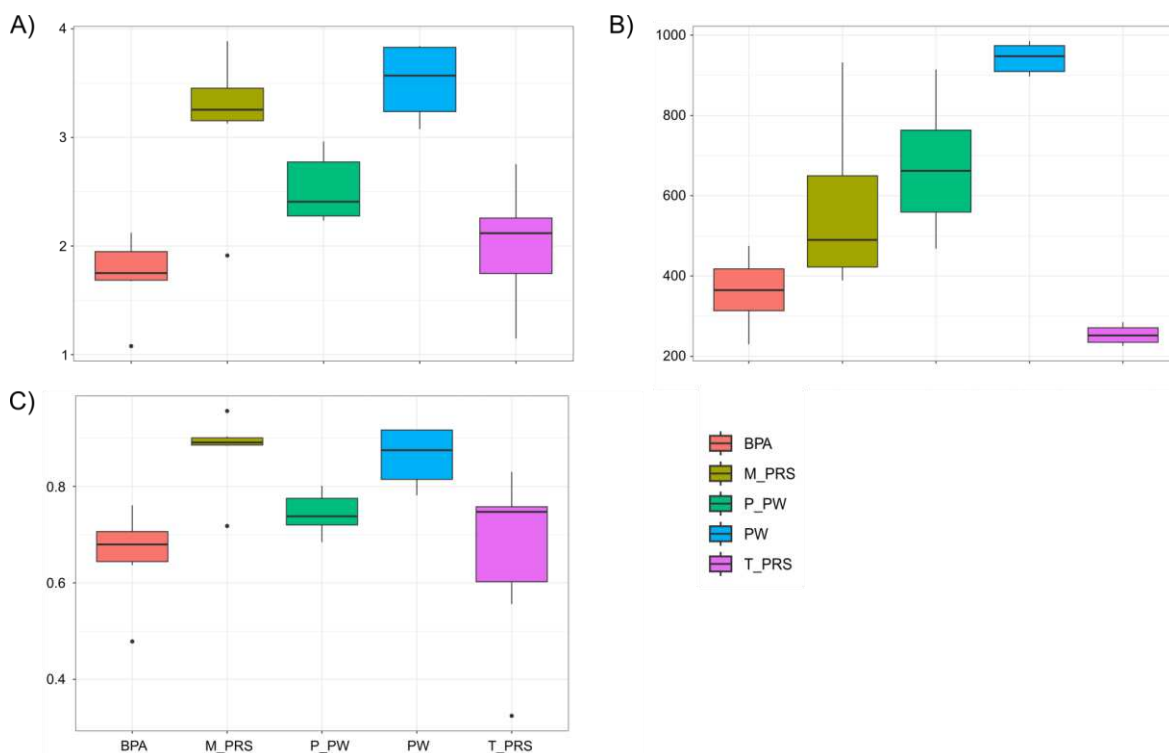


Figure 02: Diversity indices between samples ($n = 3$) **A)** Shannon index; **B)** Richness index; **C)** Simpson index. PW: production water; P-PW: Preserved

samples; M-PRS: Postgate E media (30°C); T-PRS: Postgate E media (45°C) and BPA: Triple Sugar Iron Medium

Corroborating the results of the Richness index, it is possible to observe that PW had the highest number of genera found (222), followed by P-PW (208) and M-PRS (194), and finally T-PRS (143) and BPA (138) (Figure 03). However, it is possible to observe that all genera found in PW were also found in at least one of the treatments, while the treatments presented exclusive genera. T-PRS was the treatment that presented the highest number of exclusive genera, with a total of 6 genera (*Gemella*, *Massilia*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Fonticella* and *Aggregatibacter*), for P-PW 1 exclusive genus was found (*Roseburia*), for M-PRS was also found 1 exclusive genus (*Sporacetigenium*) and finally, for BPA, 3 exclusive genera were found (*Flavonifractor*, *Caldanaerobacter* and *Barnesiella*).

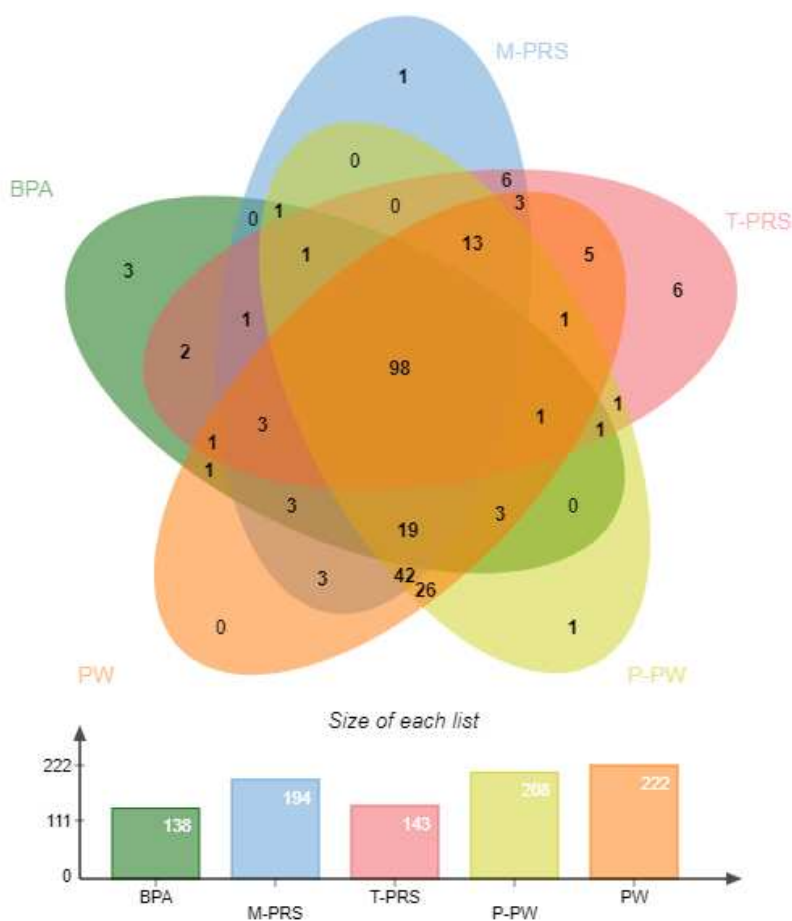


Figure 03: Venn diagram demonstrating the unique and shared bacterial genera among each of the samples.

The vast majority of ASVs found did not have their abundance significantly altered due to the application of treatments (Figure 04). The P-PW samples showed greater stability, 97.7% of the ASVs remained without change in abundance, followed by M-PRS and BPA, which presented 94.5% and 90.3%, respectively, and finally T-PRS with 88.1%. A small number of ASVs had their abundances enriched due to the treatments, for all treatment, the enrichment percentage was not greater than 0.03%. As for the depletion of ASVs, the impact was more expressive when compared to enrichment, the samples of T-PRS and BPA were the ones that showed the highest depletion of ASVs, with 11.7% and 9.4%, respectively, while M-PRS and P- PW showed 5.4% and 2.2%, respectively.

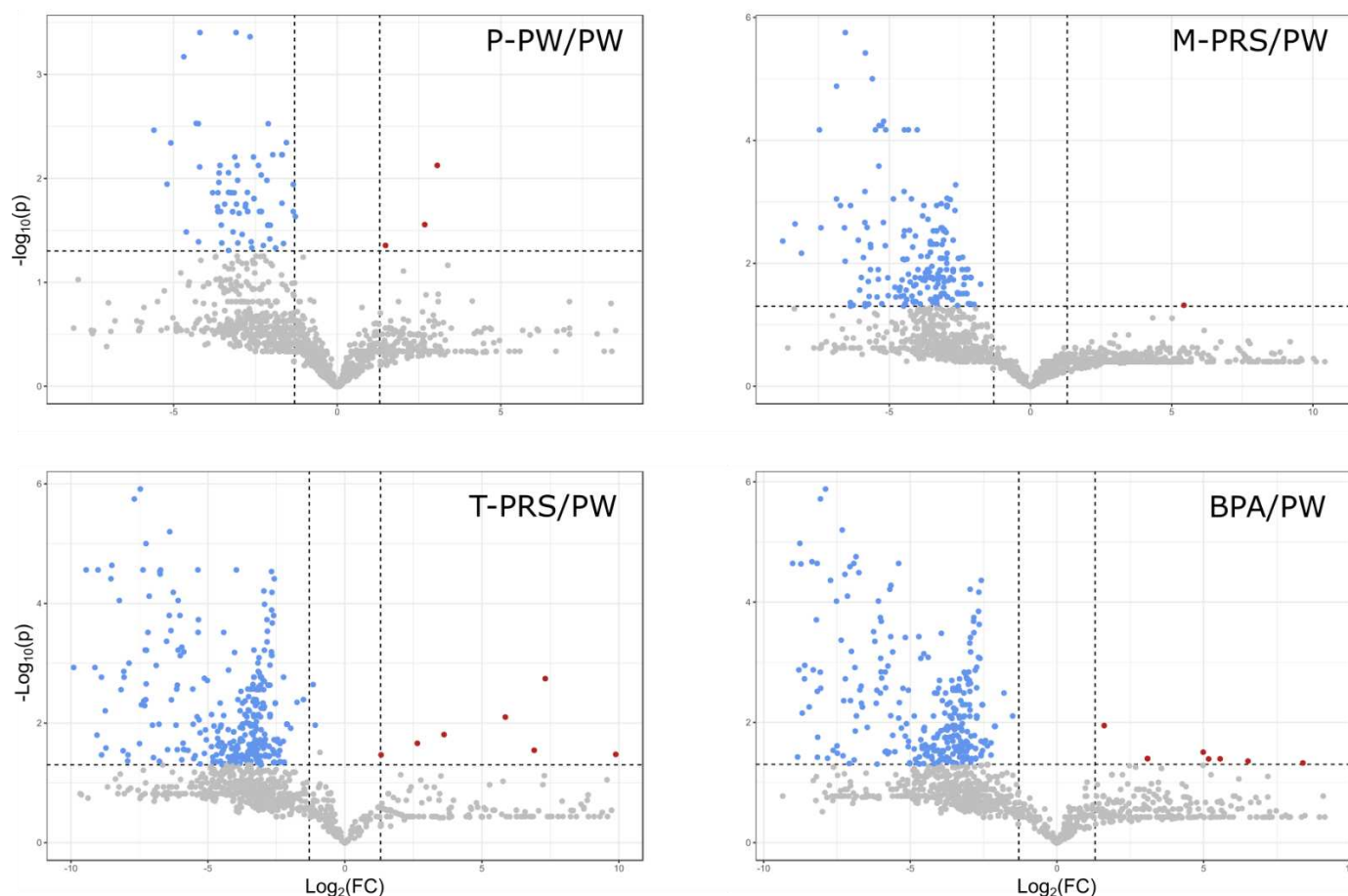
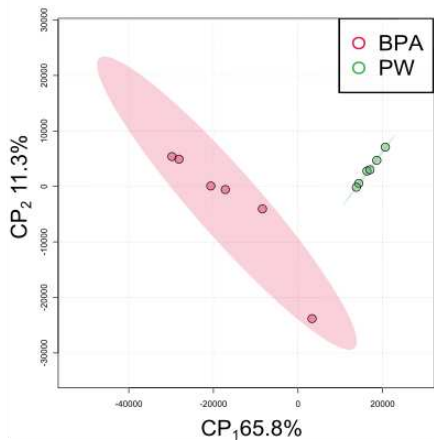
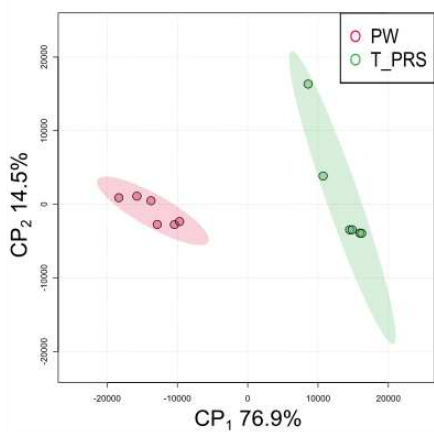
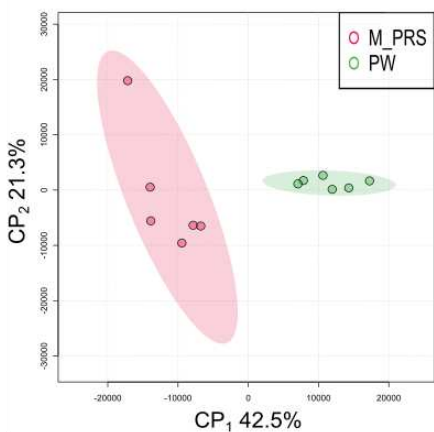
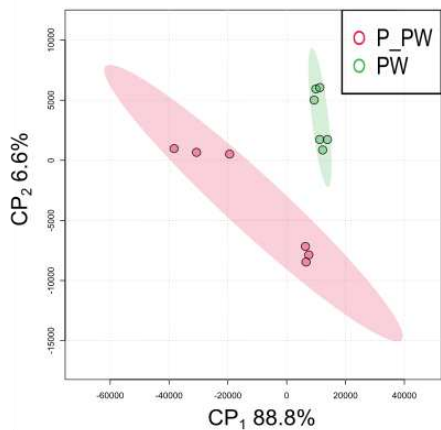


Figure 04: Volcano plot demonstrating ASV enrichment/depletion for each of the treatments. Red dots represent ASV enrichment and blue dots represent ASV depletion. A p-value of 0.05 (with FDR correction) and a FC of 2 and -2 was used as threshold.

When we evaluated the pairwise grouping between the PW and the treatments, although it was possible to observe a separation of the samples by the collection tank (Figure 01), the applied treatment still remains the main factor for the separation of the samples (Figure 05A). Through the VIP score it is possible to observe the ASVs that had greater importance in the dissimilarity between the samples that received the treatment and the PW. Among the 15 most important ASVs for each of the treatments, 12 ASVs appeared simultaneously in at least 2 treatments (Figure 05B).

A)



B)

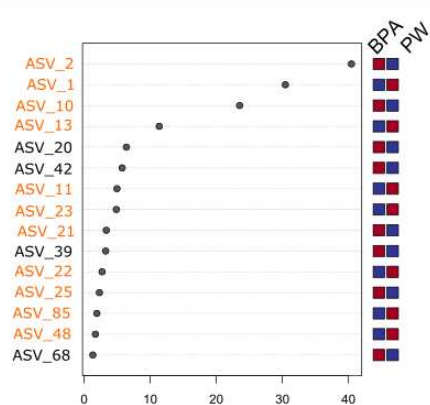
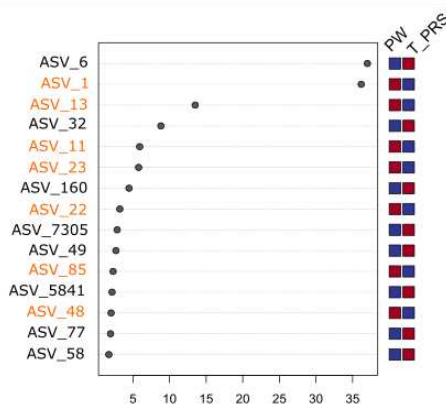
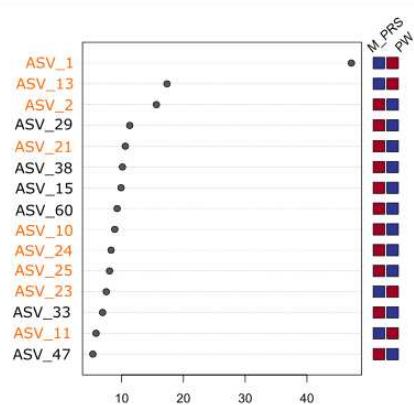
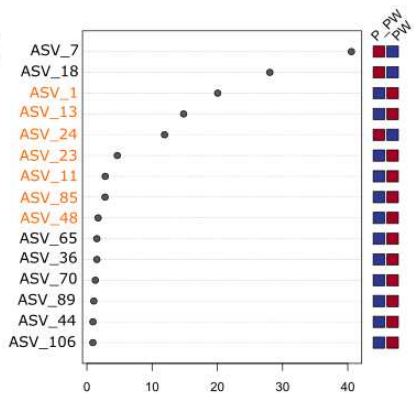


Figure 06: Abundance of genera affiliated to the group of sulfate-reducing prokaryotes (SRP), in different treatments. Shades of red indicate higher abundance, while shades of blue indicate lower abundance. The columns indicate the production water samples and the different enrichment and preservation treatments, the lines represent the PRS genera.

To assess the impact of treatments specifically on the PRS group, genera capable of performing this function were selected. Of the total of 246 genera sequenced, 33 have already been described in the literature as having the ability to perform dissimilatory sulfate reduction. When we evaluated the impact only on this population, the heatmap and hierarchical clustering demonstrate that the abundance profile is different between treatments (Figure 6). In general, as observed for the total community, the P-PW and M-PRS samples were the most similar to the PW sample. However, in this case, it is possible to observe that some M-PRS samples showed dissimilarities with the PW samples, as they promoted enrichment for some of the SRP genera.

4. Discussion

The microbial community has a fundamental ecological role for the ecosystems in which they are inserted, thus, environmental monitoring based on the local microbiome has shown enormous scientific value for the formulation of hypotheses and experimental validation that will facilitate decision-making. In this context, molecular tools prove to be an excellent option for fast, sensitive and economical monitoring, currently being applied to monitor different types of aquatic and terrestrial ecosystems (Santos et al., 2020; Lima et al., 2022; Almeida et al., 2023). Despite widespread use, one of the critical steps in this analysis would be to perform representative sampling of natural ecosystem conditions.

Several studies have demonstrated the importance of using methods to preserve the microbial community to assess the complexity of biological systems, however, studies with production water from oil extraction platforms are still scarce. Preservation solutions are rich in salts (which favor the precipitation of nucleic acids) and chelators of enzymatic cofactors (e.g., EDTA), being an excellent option for the preservation of samples that do not subsequently depend on culture-dependent analysis (Michael et al., 2013; Tatangelo et al., 2014; Silva et al., 2021).

However, there is a growing interest in accessing cultivable diversity, as isolation and cultivation of pure strains is of fundamental importance for future research, teaching and industrial applications, in this context, the use of enrichment media for the preservation of the microbial community can become an interesting option (Prakash et al., 2013; Sharma et al., 2018). In this work, the two methodological fronts were approached to see which one is better suited for samples related to the oil industry.

When we evaluated the similarity between the samples through PCoA, we can observe that the treatment samples were significantly dissimilar to the control samples (Figure 01 A). However, the P-PW and M-PRS treatments were more similar to the natural condition when compared to the other treatments (Figure 01 B). The effect of preservation on the microbial community may vary depending on the method used, Silva et al. (2021) observed that, for samples of activated sludge, preservation in NAP solution or storage on ice enabled greater coverage of the total and metabolically active microbial community. While Cui et al. (2014), observed that fresh soils are the best choice if microbial metabolic activity is under investigation while freezing at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for less than two months is acceptable if microbial community is studied on the basis of genetic fingerprinting. The results are not consistent among all the studies, demonstrating that there is no optimal methodology for all environmental conditions and that preservation efficiency is closely related to the physicochemical conditions of each environment.

The biological variation between the replicates of each treatment was distinct. In general, the PW and P-PW replicates were more homogeneous, while the treatments that used enrichment medium showed greater biological variation between their replicates (Figure 01 A). The chemical components present in the preservative solutions aim to paralyze the microbial metabolism and keep the community structure as close to the original as possible (Tatangelo et al., 2014; Silva et al., 2021), this may be one of the factors that explains the lower biological variation between the P-PW replicas, which resembles the pattern found in the PW samples. Environmental conditions can partially explain all the taxonomic variation found in a microbial community (Delgado-Baquerizo et al., 2017). In addition, there are other mechanisms that can potentially explain taxonomic variation between communities with similar environmental conditions, which include biotic interactions (e.g. competition), random population drift, order random colonization and others

(Lima-Mendez et al., 2015; Louca et al., 2016). This fact may be related to the greater biological variation found in treatments involving microbial cultivation.

Environments related to the oil industry are considered extreme for the survival of some microorganisms, oil reservoirs have high temperatures, pressure and salinity, which means that these samples do not present high diversity (Varjani & Gnansounou, 2017; Santos et al., 2020). The results of the diversity indices found in this work are consistent with other works found in the literature (Santos et al., 2022). In general, the diversity of the preserved samples was equal to or less than the natural samples, and the P-PW and M-PRS treatments were more similar to the natural sample, while BPA and T-PRS showed a loss of microbial diversity. Silva et al. (2021) also noted that maintaining the diversity of the microbial community varies according to the preservation methodology used.

When evaluating the exclusive and shared microbial genera between treatments and the control, it is possible to observe that most genera were found in all treatments, and the PW sample did not present any exclusive genus (Figure 03), which demonstrates that the preservation methodologies were efficient in maintaining the richness of the microbial community. Silva et al. (2021) also observed a high percentage of shared genera for the different preservation methods, with a low number of exclusive genera, both in the preserved and in the control samples. This demonstrates that the biggest alteration promoted by this type of processing is related to the enrichment/depletion of the species. The percentage of ASV that was significantly enriched/depleted was low throughout the evaluated treatments (Figure 04), with P-PW and M-PRS samples showing the greatest stability in ASV abundance, while BPA and T-PRS had greater change in stability in the abundance of ASV when compared to natural samples.

Within the composition of the bacterial community as a whole, 12 ASV proved to be the most relevant for explaining the variation between preserved samples and natural samples in all evaluated treatments, and some had their abundance depleted by preservation methods, while others had their abundance enriched (Figure 05). It is known that the microbial diversity is impressively rich, however, it is estimated that only 1% of this diversity had been cultivated in the laboratory, this demonstrates that current methodologies are not sufficient to create optimal conditions for the cultivation of most microbial species (Locey & Lennon, 2016; Bodor et al., 2020), this is one of the factors that may be related to the

depletion of microbial species in samples preserved by enrichment through culture media. However, it was also possible to observe that 5 ASVs had their abundance enriched by preservation methodologies, several works demonstrate that these species are easily cultivated in the laboratory (Jayasinghearachchi & Lal, 2011; Hwang et al., 2016; Li et al., 2022). Among these species, 2 are affiliated to the genus *Clostridium*, species of this genus are important producers of organic acids and have already been found in several environments related to the oil industry (Santos et al., 2020; Li et al., 2022). The species *Marinobacterium stanieri* has also been related to several environments associated with the oil industry and marine sediments (Van Der Kraan et al., 2010; Hwang et al., 2016). *Oceanotoga teriensis* is a thermophilic species that has also been isolated and characterized in different environments related to the oil industry (Jayasinghearachchi & Lal, 2011; Santos et al., 2020). And finally, we have a species affiliated to the genus *Spirochaeta*, which has also been found in samples from oil fields (Nazina et al., 2013).

The different carbon sources available for bacterial growth may be one of the main factors that direct the composition and structure of the community that will be established (Louis et al., 2016; Schlechter et al., 2019). However, it was not possible to observe the influence of the use of different carbon sources on the modulation of the 12 main species that have the greatest impact on the separation of enriched and natural samples, and the response pattern for enrichment/depletion of these species was identical for the different preservation methodologies employed (Figure 05). A fact that can also be observed by Santos et al. (2022), they concluded that the use of different carbon sources did not cause changes in the structure of the SRP biofilm formed on carbon steel coupons.

To determine the best methodology for the preservation of production water samples to be used in monitoring biocorrosion, it is necessary to evaluate the impact of these methodologies directly on the group of sulfate-reducing prokaryotes (SRP). By evaluating only this group, it is possible to observe the same response pattern obtained for the microbial community as a whole, with the P-PW and M-PRS samples being the treatments most similar to the natural samples (Figure 06), with the exception of some biological replicas of the M-PRS treatment, a fact that can be explained by the different factors that can influence the taxonomic variability between samples from similar environmental conditions, as discussed earlier. The SRP group is characterized by being polyphyletic, in this group can be found

representatives of the 2 domains of life (Bacteria and Archaea), and more than 16 different families (Rabus et al., 2015), with such phylogenetic diversity that comprises this group, it is expected that the pattern of response to different preservation methodologies is similar to that found for the microbial community as a whole, rather than a species-specific response.

5. Conclusions

All preservation methodologies evaluated in this study had an impact on the structure of the community, however, the P-PW and M-PRS treatments were the ones that most resembled the natural field conditions, showing that both have the potential to be applied in the routine of the petroleum industries. For analyzes that involve only the study of the community based on DNA, P-PW is the best option because it has greater similarity with PW, however, if the downstream analysis depends on microorganism cultivation, M-PRS is the best option, as it does not impede cell growth.

6. References:

Almeida, P. I. N., de Jesus, H. E., Pereira, P. H. F., Vieira, C. E. D., Bianchini, A., Martins, C. D. M. G., & Dos Santos, H. F. (2023). The microbial profile of rivers and lagoons three years after the impact of the world's largest mining disaster (Fundão dam, Brazil). *Environmental research*, 216, 114710.

ANP (2022). Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural. Outubro 2022/ Número 146. boletim-outubro.pdf (www.gov.br)

Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., & Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC bioinformatics*, 15(1), 1-7.

Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., ... & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 1-22.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.

Cui, H., Wang, C., Gu, Z., Zhu, H., Fu, S., & Yao, Q. (2014). Evaluation of soil storage methods for soil microbial community using genetic and metabolic fingerprintings. *European journal of soil biology*, 63, 55-63.

Delgado-Baquerizo, M., Reich, P. B., Khachane, A. N., Campbell, C. D., Thomas, N., Freitag, T. E., ... & Singh, B. K. (2017). It is elemental: soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity. *Environmental microbiology*, 19(3), 1176-1188.

Enning, D., & Garrelfs, J. (2014). Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied and environmental microbiology*, 80(4), 1226-1236.

Gieg, L. M., Jack, T. R., & Foght, J. M. (2011). Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(2), 263-282.

Greay, T. L., Gofton, A. W., Papparini, A., Ryan, U. M., Oskam, C. L., & Irwin, P. J. (2018). Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-14.

Gu, T., Wang, D., Lekbach, Y., & Xu, D. (2021). Extracellular electron transfer in microbial biocorrosion. *Current Opinion in Electrochemistry*, 29, 100763.

Hwang, C. Y., Yoon, S. J., Lee, I., Baek, K., Lee, Y. M., Yoo, K. C., ... & Lee, H. K. (2016). *Marinobacterium profundum* sp. nov., a marine bacterium from deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1561-1566.

Jayasinghearachchi, H. S., & Lal, B. (2011). *Oceanotoga teriensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from offshore oil-producing wells. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(3), 554-560.

Johnson, R. J., Folwell, B. D., Wirekoh, A., Frenzel, M., & Skovhus, T. L. (2017). Reservoir Souring—Latest developments for application and mitigation. *Journal of biotechnology*, 256, 57-67.

Koch GH, Brongers MPH, Thompson NG, Virmani YP, Payer JH (2002) Corrosion cost and preventive strategies in the United States. National Technical Information Service, Alexandria, VA, USA

Li, Q., Shen, T., Dong, Y., Liu, Y., Nong, J., Pan, J., ... & Xie, Q. (2022). *Clostridium weizhouense* sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from activated sludge of petroleum wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(4), 005330.

Liduino, V. S., Leoni, G. B., Sérvulo, E. F. C., & Cammarota, M. C. (2022). Investigation of carbon steel corrosion by oilfield nitrate-and sulfate-reducing prokaryotes consortia in a hypersaline environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

Liduino, V., Galvão, M., Brasil, S., & Sérvulo, E. (2021). SRB-mediated corrosion of marine submerged AISI 1020 steel under impressed current cathodic protection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 202, 111701.

Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., ... & Raes, J. (2015). Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348(6237), 1262073.

Little, B. J., Blackwood, D. J., Hinks, J., Lauro, F. M., Marsili, E., Okamoto, A., ... & Flemming, H. C. (2020). Microbially influenced corrosion—Any progress?. *Corrosion Science*, 170, 108641.

Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975.

Louca, S., Parfrey, L. W., & Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305), 1272-1277.

Louis, B. P., Maron, P. A., Menasseri-Aubry, S., Sarr, A., Lévêque, J., Mathieu, O., ... & Viaud, V. (2016). Microbial diversity indexes can explain soil carbon dynamics as a function of carbon source. *PLoS One*, 11(8), e0161251.

Michael A, G., Zoe A, P., & Christina A, K. (2013). Comparison of DNA preservation methods for environmental bacterial community samples. *FEMS microbiology ecology*, 83(2), 468-477.

Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 441-454.

Nazina, T. N., Pavlova, N. K., Tatarkin, Y. V., Shestakova, N. M., Babich, T. L., Sokolova, D. S., ... & Ivanov, M. V. (2013). Microorganisms of the carbonate petroleum reservoir 302 of the Romashkinskoe oilfield and their biotechnological potential. *Microbiology*, 82(2), 190-200.

Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J. et al. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat Protoc* 17, 1735–1761 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>

Postgate, J. R (1984). *The Sulphate-Reducing Bacteria*, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 224 pp.

Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS microbiology letters*, 339(1), 1-9.

Procópio, L. (2022). Microbially induced corrosion impacts on the oil industry. *Archives of Microbiology*, 204(2), 1-6.

Rabus, R., Venceslau, S. S., Woehlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D., & Pereira, I. A. (2015). A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Advances in microbial physiology*, 66, 55-321.

Sales, N. G., Wangenstein, O. S., Carvalho, D. C., & Mariani, S. (2019). Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environmental DNA*, 1(2).

Santos, J. C., Lopes, D. R. G., Da Silva, J. D., De Oliveira, M. D., Dias, R. S., Lima, H. S., ... & da Silva, C. C. (2020). Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 151, 104966.

Santos, J. C., Lopes, D. R. G., Da Silva, J. D., De Oliveira, M. D., Dias, R. S., Lima, H. S., ... & da Silva, C. C. (2020). Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 151, 104966.

Santos, J. C., Lopes, D. R. G., Silva, L. C. F., Ramos, J. L. L., Dias, R. S., Lima, H. S., ... & da Silva, C. C. (2022). Characterization of the biofilm structure and microbial diversity of sulfate-reducing bacteria from petroleum produced water supplemented by different carbon sources. *Journal of Environmental Management*, 304, 114189.

Schlechter, R. O., Miebach, M., & Remus-Emsermann, M. N. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: a review. *Journal of advanced research*, 19, 57-65.

Sharma, R., Nimonkar, Y., Sharma, A., Rathore, R. S., & Prakash, O. (2018). Concept of microbial preservation: past, present and future. In *Microbial Resource Conservation* (pp. 35-54). Springer, Cham.

Silva, C. C., Viero, A. F., Dias, A. C. F., Andreote, F. D., Jesus, E. C., De Paula, S. O., ... & Oliveira, V. M. (2010). Monitoring the bacterial community

dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1), 21-29.

Silva, L. C. F., Lopes, D. R. G., Lima, H. S., Quartaroli, L., de Sousa, M. P., de Abreu Waldow, V., ... & da Silva, C. C. (2021). Comparison of methods for preservation of activated sludge samples for high-throughput nucleic acid sequencing and bacterial diversity analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 157, 105139.

Tan, B., Ng, C., Nshimiyimana, J. P., Loh, L. L., Gin, K. Y. H., & Thompson, J. R. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in microbiology*, 6, 1027.

Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 73-94.

Tatangelo, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., & Ambrosini, R. (2014). Effect of preservation method on the assessment of bacterial community structure in soil and water samples. *FEMS microbiology letters*, 356(1), 32-38.

Van Der Kraan, G. M., Bruining, J., Lomans, B. P., Van Loosdrecht, M. C., & Muyzer, G. (2010). Microbial diversity of an oil–water processing site and its associated oil field: the possible role of microorganisms as information carriers from oil-associated environments. *FEMS microbiology ecology*, 71(3), 428-443.

Varjani, S. J., & Gnansounou, E. (2017). Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource technology*, 245, 1258-1265.

Whiteley, A. S., & Bailey, M. J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2400-2407.

CAPÍTULO 2: Taxa de produção de H₂S de diferentes culturas mistas provenientes de ambientes associados a indústria de petróleo.

1. Introdução

O setor petrolífero é chave na economia nacional, sendo um dos principais responsáveis pela geração de superávits e contribuindo para a manutenção do saldo da balança comercial do país. Atrelado a essa elevada produtividade, o setor tem enfrentado problemas operacionais relacionados com a presença de microrganismos em sua cadeia produtiva. O processo de exploração do petróleo pode ser dividido em 6 etapas principais, sendo estas, (i) perfuração dos reservatórios de petróleo; (ii) completação, esta etapa é composta por um conjunto de operações com o intuito de equipar o poço para o início da produção do petróleo de forma segura; (iii) produção, que consiste na extração do petróleo dos reservatórios; (iv) escoamento e armazenamento, que consiste nas atividades de transferência, transporte e estocagem do petróleo; (v) refino do petróleo bruto e; (vi) distribuição dos derivados do petróleo. Todas essas etapas, em maior ou menor grau, encontram-se susceptíveis ao crescimento microbiano, em especial, dos PRS, sendo a etapa IV crítica quanto a colonização microbiana (Thomas, 2001; Sousa 2023). A atividade metabólica proveniente desses microrganismos culmina em diversos problemas econômicos e operacionais, pois estão relacionados com os processos de acidulação biogênica, bioincrustação, biocorrosão, e biodegradação de hidrocarbonetos e entre outros (Gieg et al., 2011; Enning e Garrelfs, 2014; Elmawgoud et al., 2015; Johnson, et al., 2017). Em razão disso, a compreensão dos fatores de modulação da estrutura da comunidade microbiana presentes nesses ambientes se faz necessária para a elevação da eficiência de gerenciamento desses riscos.

O grupo de redutores de sulfato é caracterizado por ser composto por microrganismos anaeróbicos e filogenética- e fisiologicamente diversos. Até o presente momento, esse grupo é composto majoritariamente por microrganismos filiados ao domínio Bacteria. Entretanto, é possível encontrar alguns representantes do domínio Archaea, sendo assim, denominado procariotos redutores de sulfato (PRS) (Muyzer e Stams, 2008; Rabus et al., 2015; Johnson, et al., 2017). Trabalhos baseados em técnicas moleculares vem demonstrando que os PRS podem ser filiados a três diferentes filos bacterianos e dois diferentes filos

de arqueias - Proteobacteria (*Desulfobacter*, *Desulfospira*, *Desulfotignum*, *Desulfobacula*, *Desulfobacterium*, *Desulfatibacillum*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfococcus*, *Desulfocella*, *Desulfofrigus*, *Desulfocotulus*, *Desulforegula*, *Desulfobacca*, *Desulfomonille*, *Desulfoarculus*, *Desulforhabdus*, *Syntrophobacter*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfobulbus*, *Desulfocapsa*, *Desulfohopalus*, *Desulfotalea*, *Desulfofustis*, *Desulfovibrio*, *Desulfonatronum*, *Desulfonatronovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfohalobium*, *Desulfonauticus* e *Desulfothermus*); Firmicutes (*Desulfotomaculum* e *Desulfosporosinus*); Nitrospirae (*Thermodesulfovibrio*); Euryarchaeota (*Archaeoglobus*) e Crenarchaeota (*Thermocodium* e *Calditerrivirga*), totalizando 37 gêneros microbianos (Muyzer e Stams, 2008; Guan et al., 2013; Rabus et al., 2015).

Esses microrganismos têm como característica em comum a capacidade metabólica de realizar o processo de redução dissimilatória do sulfato. Assim, possuem a habilidade de utilizar compostos sulfurados inorgânicos, em especial o sulfato (SO_4^{2-}), como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da respiração anaeróbica, gerando como produto final o sulfeto de hidrogênio (H_2S). Como fonte de elétrons, esse grupo apresenta grande plasticidade metabólica, tendo a capacidade de oxidar uma enorme variedade de compostos orgânicos, sendo que o acetato, lactato e etanol foram relatados entre os substratos mais utilizados. Além dos compostos orgânicos, também já foi descrito a capacidade de obtenção de elétrons por meio de compostos inorgânicos, sendo que o H_2 também pode ser utilizado pelos PRS como fonte de elétrons (Birkeland et al., 2005; Muyzer e Stam, 2008).

Os PRS participam ativamente para a manutenção da funcionalidade dos ciclos biogeoquímicos do carbono e enxofre nos ecossistemas em que estão inseridos e a diversidade microbiana desse grupo está intimamente atrelada ao tipo de ambiente em que estão colonizando, o que reflete na complexidade biológica desse grupo (Postgate et al., 1984). Estima-se que cerca de 50% da matéria orgânica presentes nos ambientes marinhos é oxidada pelos PRS (Gibson, 1990). A mineralização da matéria orgânica em ambientes anóxicos é um processo de elevada complexidade quando comparada com ambientes óxicos, isso porque, para que esse processo ocorra, é necessário a interação entre diferentes grupos de microrganismos que compõe esse ambiente. Assim, cada grupo funcional microbiano realiza a oxidação parcial da matéria orgânica, e seus produtos

metabólicos são assimilados por outros grupos, até a completa oxidação do composto orgânico (Postgate et al., 1984; Gibson, 1990; Muyzer e Stams, 2008), mostrando que esse ambiente é altamente dependente da simbiose entre os microrganismos para a manutenção da multifuncionalidade do ecossistema.

Nesse contexto, por esses ambientes apresentarem elevada complexidade biológica, acredita-se que existem comunidades bacterianas, a depender da sua composição, que são mais eficientes em produzir sulfeto de hidrogênio. Por isso, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a cinética de produção de H₂S e a diferença na estrutura e composição da comunidade bacteriana presentes em amostras provenientes de diferentes setores da indústria do petróleo para inferência da relação entre a produção de H₂S e a diversidade microbiana.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das águas de produção e montagem dos microcosmos

Amostras foram coletadas em diferentes setores da indústria do petróleo: i) AP1, proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; ii) AP2, membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santo e iii) AP3, proveniente de Terminal Marítimo.

Para cada amostra foi montado o microcosmo, em triplicata, em frascos de penicilina, contendo 90 mL do meio Meio Postgate E (Postgate, 1984), como fonte de inóculo foi utilizado 10mL das diferentes amostras. Os frascos foram incubados em anaerobiose a 30°C, em condições estáticas, por 7 dias. A cada 24 horas, uma alíquota de 1mL foi retirada para quantificação de H₂S e outra de 5 mL para extração de DNA.

2.2. Avaliação da produção de H₂S por titulação

Para quantificação do sulfeto dissolvido em solução, 1,0 ml de cada tratamento foi adicionado a uma mistura de 50 ml de NaOH 1,0 M e 5,0 ml de NH₄OH concentrado. A titulação potenciométrica foi realizada no equipamento Titulador Compacto G10S (Mettler Toledo, Columbus, Estados Unidos) usando o AgNO₃ 0,01 M como titulante.

2.3. Extração de DNA e quantificação de bactérias totais e bactérias redutoras de sulfato por meio da técnica de ddPCR

Após o período de incubação, foi realizada a extração de DNA total para cada uma das amostras. Para isso, o volume de cada alíquota de 5 ml de amostra foi utilizado e, o DNA total das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Silva et al., (2010). Para checar a qualidade do DNA obtido, foi realizado a quantificação por meio do Qubit 4 (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) a visualização em gel de agarose 1% (m/v).

Para a técnica de *droplet digital PCR* (ddPCR), a concentração do DNA foi ajustada para 5 ng/μL. A metodologia seguiu quatro etapas: (1) montagem da reação, (2) formação das gotas, (3) amplificação do DNA por PCR, e (4) leitura das gotas. Para a PCR, foi utilizado: 10 μl de QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos); 1,0 μl de cada *primer* (*reverse* e *forward*) na concentração final de 100 nM (Tabela 1); 1,0 μl de DNA-molde e 7,0 μl de água ultrapura. Os 20 μl finais foram transferidos para suportes juntamente com 40 μl de óleo para a geração de gotas. As gotas formadas foram transferidas para uma placa de 96 poços, vedada com um filme plástico apropriado e colocada no termociclador PCR C1000 Touch (BIO-RAD, USA). A programação utilizada foi: 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s e 60 °C por 1 min; 4 °C por 5 min; e por último 90 °C por 5 min. Em todos os passos, foi adicionado uma rampa de ±2 °C/segundo. Após a finalização da PCR, a placa foi transferida para o leitor de gotas.

A quantificação de bactérias totais foi realizada utilizando-se *primers* para o gene 16S rRNA, e a de PRS utilizou *primers* para os genes *dsrA*, conforme a tabela abaixo:

Tabela 1 - *Primers* utilizados na técnica ddPCR.

Código	Sequência	Região-alvo
DSR-1-F-deg	5'-ACSCAYTGGAARCACG-3'	Trecho do gene <i>dsrA</i>
PJdsr853-R-deg	5'-CGGTGMAGYTCRTCTG-3'	(≅450 pb)

27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Região V1-V3 do 16S
518R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	rRNA (\cong 500 pb)

2.4. Sequenciamento e processamento dos dados

Os dias 1, 3 e 5 foram selecionados para a avaliação da composição da comunidade bacteriana das diferentes águas de produção. O DNA extraído foi enviado para sequenciamento de amplicon para as regiões variáveis V3 e V4 do gene 16S RNAr, usando os primers 338F (Whiteley et al., 2000) e 806R (Caporaso et al., 2011), na empresa Novogene (<http://www.novogene.com/>) pela plataforma Illumina MiSeq *paired-end*.

Para analisar os dados gerados pelo sequenciamento, as *reads* brutas foram filtradas usando *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* QIIME (versão 1.8.0). O parâmetro erro esperado ($E_{max} = 0.5$) foi usado para remover *contigs* de baixa qualidade no software USEARCH, usando UCHIME (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html), as quimeras foram removidas usando o banco de dados GOLD como referência (Haas et al., 2011). Por meio do software R, usando o pacote DADA2 (*version* 1.18.), as sequências foram agrupadas em *Amplicon sequence variant* (ASV) (Callahan et al., 2017). O banco de dados Silva versão 138 (<http://www.arb-silva.de>) foi utilizado para afiliar taxonomia. As análises de estatística e diversidade foram realizadas utilizando os programas R (*version* 4.0) e PAST (Hammer et al., 2001), respectivamente. A predição do perfil funcional da comunidade bacteriana foi realizada utilizando-se o *software* FAPROTAX (Louca et al., 2016). Para identificar as ASVs indicadoras de cada amostras, a análise de especialização de nicho foi realizada utilizando a função *multipatt* do pacote Indispecies no *software* R (De Caceres et al., 2009), para a visualização da relação entre as ASV indicadoras, específicas e compartilhadas, de cada uma das amostras, uma rede foi construída utilizando o *software* Cytoscape (Shannon et al., 2003). Todas as diferenças estatísticas entre os tratamentos foi avaliada usando o teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

2.5. Análises estatísticas

O cálculo da taxa de produção de H₂S para cada amostra foi realizado por meio da razão (H₂S (ppm) /nº de cópias de genes), foi calculada a taxa de produção de H₂S por bactérias totais e por PRS totais. A avaliação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk, considerando que os dados seguem a distribuição normal, a comparação das médias será realizada no MiniTab® 17.1.0 (Minitab Inc., State College, Estados Unidos) por ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. P-valores < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para predição da produção de H₂S por unidade de células foi realizada a regressão quadrática, utilizando o *software* Genes (Cruz; 2006). O ajuste do modelo foi realizado utilizando a quantidade de células bacterianas totais (H₂S ~ nº de cópias de genes 16S RNAr) e células de bactérias redutoras de sulfato (H₂S ~ nº de cópias de genes dsr).

Para visualizar a dissimilaridade entre as amostras foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA), usando a matriz de dissimilaridade *Bray-Curtis* como base para a ordenação dos dados em 2 dimensões. Para verificar a separação dos grupos no PCoA, a *Permutational Multivariate Analysis of Variance* (PERMANOVA) foi realizado. Todas as análises estatísticas foram realizadas no R (version 4.0) (R core team, 2021) com o suporte dos pacotes Vegan (Oksanen et al., 2013), McToolsR e Phyloseq (McMurdie et al., 2013).

3. Resultados

A cinética de produção de H₂S variou de acordo com o local da indústria do petróleo em que a amostra foi coletada (Figura 01). A amostra AP1 apresentou a maior produção de H₂S nas primeiras 48 horas de análise (p < 0.05), após esse período, não houve diferença significativa quando comparada com as amostras de TEBAR, entretanto as amostras de membrana permaneciam com a menor produção de H₂S, que só atingiu o mesmo patamar de produção das outras amostras no sétimo dia de análise (Tabela S1).

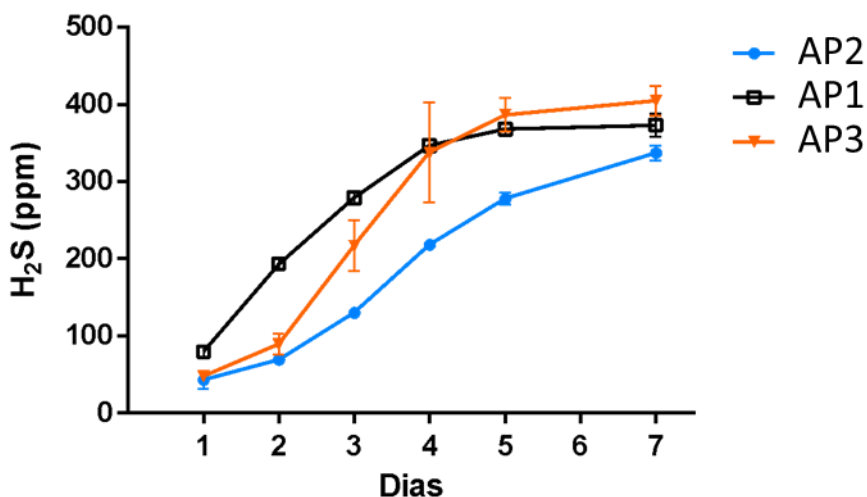


Figura 01. Cinética de produção de H₂S de amostras coletadas em diferentes setores da indústria do petróleo (n=3). **AP1** proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; **AP2** membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **AP3** do proveniente de um Terminal Marítimo.

Apesar de haver uma variação significativa na produção de H₂S entre as diferentes amostras coletadas nos diferentes sistemas operacionais da indústria de petróleo, quando esse valor é normalizado pela produção de H₂S por unidade de células bacterianas, não foi possível observar diferença significativa da taxa de produção de H₂S/bactérias totais e também da taxa de produção de H₂S/procariotos redutores de sulfato entre as amostras, ao longo dos dias avaliados (Figura 02). É possível observar, em ambos os casos, que houve um aumento nessa taxa de produção de H₂S/unidade de células nos primeiros dias de análise. Considerando bactérias totais, no quinto dia foi alcançado o máximo de produção de H₂S, logo após, estabeleceu-se um platô de produção que se manteve até o fim do monitoramento do experimento (Figura 2A). Entretanto, tratando-se de PRS, o máximo de produção de H₂S foi atingido no quarto dia e, posteriormente, também foi alcançado um platô de produção que se manteve até o fim do experimento (Figura 2B).

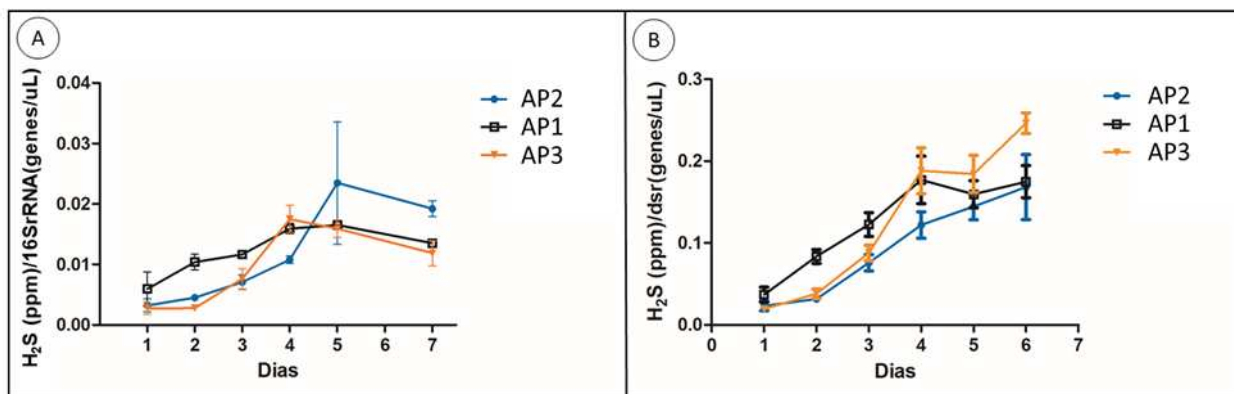


Figura 02. A) Taxa de produção de H₂S por unidade de células de bactérias totais (gene 16S RNAr). **B)** Taxa de produção de H₂S por unidade de células de procariotos redutores de sulfato (gene *dsr*). **AP1** proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; **AP2** membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **AP3** do proveniente de um Terminal Marítimo.

Para cada amostra, foi ajustada uma regressão quadrática a fim de estabelecer uma relação entre a produção de H₂S e quantidade de bactérias totais (H₂S ~ nº de cópias de genes 16S RNAr) e procariotos redutores de sulfato (H₂S ~ nº de cópias de gene *dsr*). Dentre todos os tipos de regressões testadas, a quadrática foi a que apresentou melhor desempenho matemático e maior plausibilidade biológica. Todos os ajustes de modelo de produção de H₂S/bactérias totais (H₂S ~ nº de cópias de genes 16S RNAr) apresentaram significância (p-valor < 0.05) (Figura 03). Entretanto, não foi possível ajustar um modelo que apresentasse significância estatística para a produção de H₂S/PRS (H₂S ~ nº de cópias do gene *dsr*).

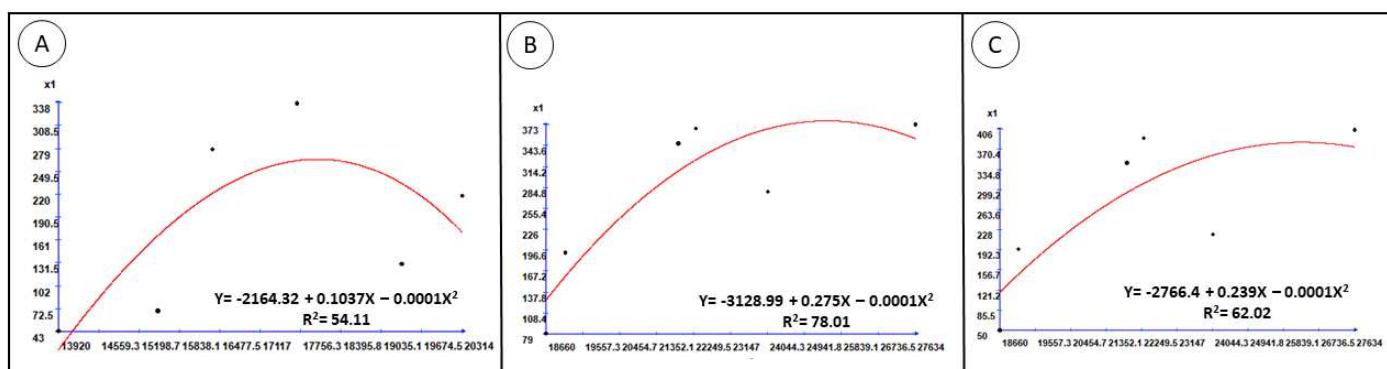


Figura 03. Regressão quadrática, $Y =$ Produção de H_2S (ppm) e $X =$ Quantificação de bactérias totais (cópias de genes/ μ l), ao longo do período de 7 dias. **A)** Amostras provenientes de membrana de dessulfatação. **B)** Amostras de água de produção provenientes de plataforma de petróleo. **C)** Amostras de água de produção provenientes de terminal de petróleo.

Analisando a composição da comunidade bacteriana das diferentes amostras, por meio da análise de coordenada principal (PCoA) foi possível observar que a estrutura da comunidade bacteriana foi dissimilar entre as 3 diferentes águas de produção avaliada, principalmente no primeiro dia de coleta, no quinto dia foi possível observar que a comunidade bacteriana apresentou maior similaridade entre as amostras (Figura 04 A). Efeito que também pode ser observado pelo dendograma, nos dias 1 e 3 houve uma maior similaridade entre as amostras AP1 e AP3, enquanto a amostra de membrana (AP2) agrupou-se separadamente, já no quinto dia, de forma geral, foi possível observar o agrupamento entre as 3 amostras (Figura 04 B).

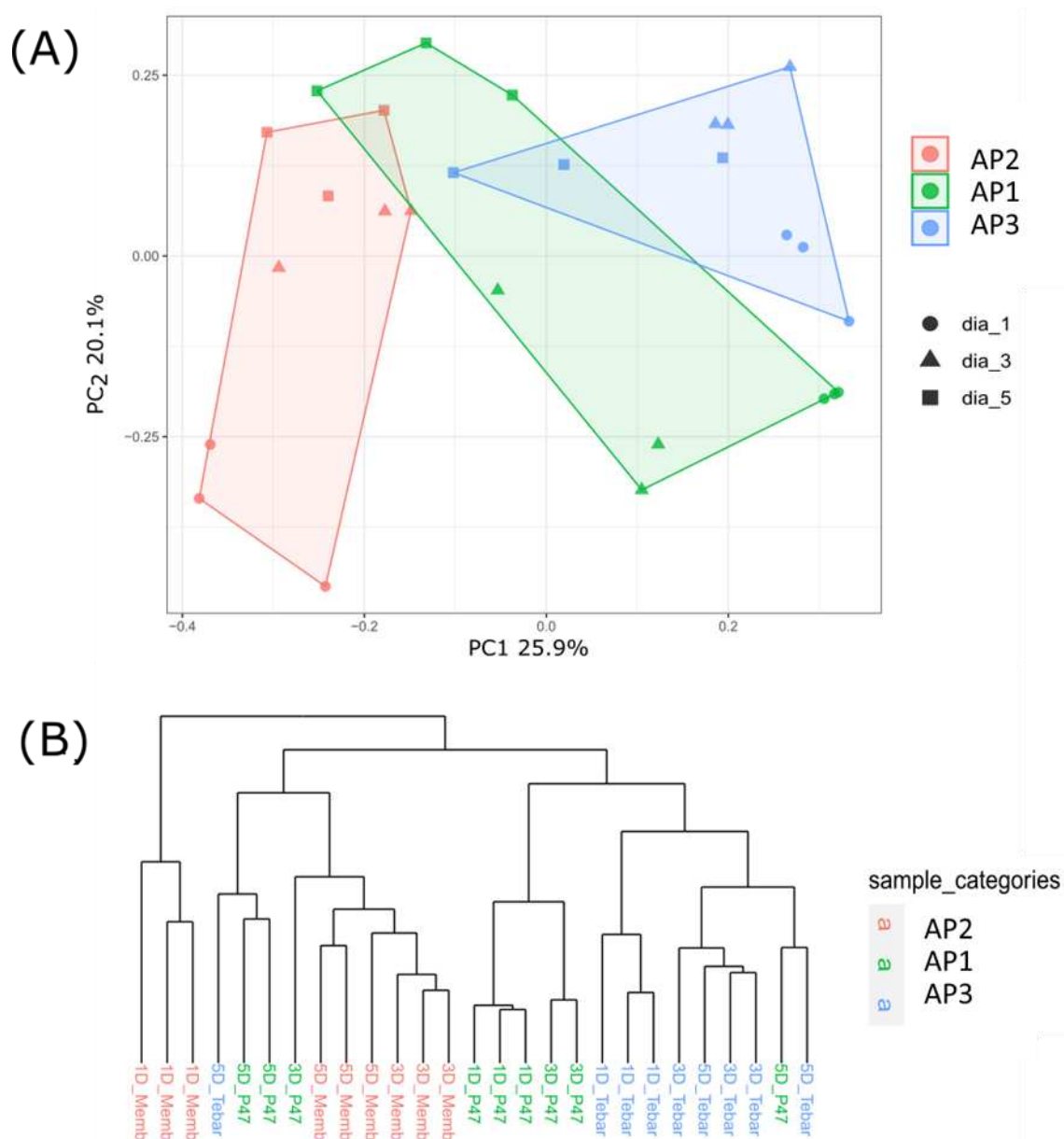


Figura 04. Avaliação da similaridade entre as amostras A) Análise de coordenadas principal (PCoA) baseada na matriz de dissimilaridade Bray-Curtis usando os dados da comunidade bacteriana a nível de ASV. B) Dendrograma demonstrando a similaridade das amostras baseada na matriz de dissimilaridade Bray-Curtis a nível de ASV. **AP1** proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; **AP2** membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **AP3** do proveniente de um Terminal Marítimo.

Pela rede do co-ocorrência, foi possível observar que a amostra de membrana (AP2) apresentou uma menor riqueza que as outras amostras,

apresentando o total de 514 ASVs, enquanto as amostras de AP1 e AP3 apresentam 726 e 730, respectivamente. Em termos da inferência das interações ecológicas, as amostras apresentaram um perfil de interação distinta (Figura 05). A amostra de membrana (AP2) foi a que apresentou maior porcentagem de interações de caráter negativo, representando 28% de todas as interações (Figura 05A), sendo possível observar cluster de interações positivas que foram interligados por interações negativas. Já para a rede das amostras do AP3, esse número de interações negativas diminuiu para 20% de todas as interações que compuseram a comunidade (Figura 05B). Nessa comunidade, ainda foi possível observar cluster de interações, porém, foi possível observar que esses clusters foram interligados por interações positivas formadas por determinadas ASVs. Já a rede de interações das amostras AP1 foi a que apresentou menor porcentagem de interações de caráter negativos, sendo este 11% do total de interações (Figura 05C), sendo que nessa rede, não se observou cluster de interações individualizados, esta comunidade foi majoritariamente interligada por interações positivas.

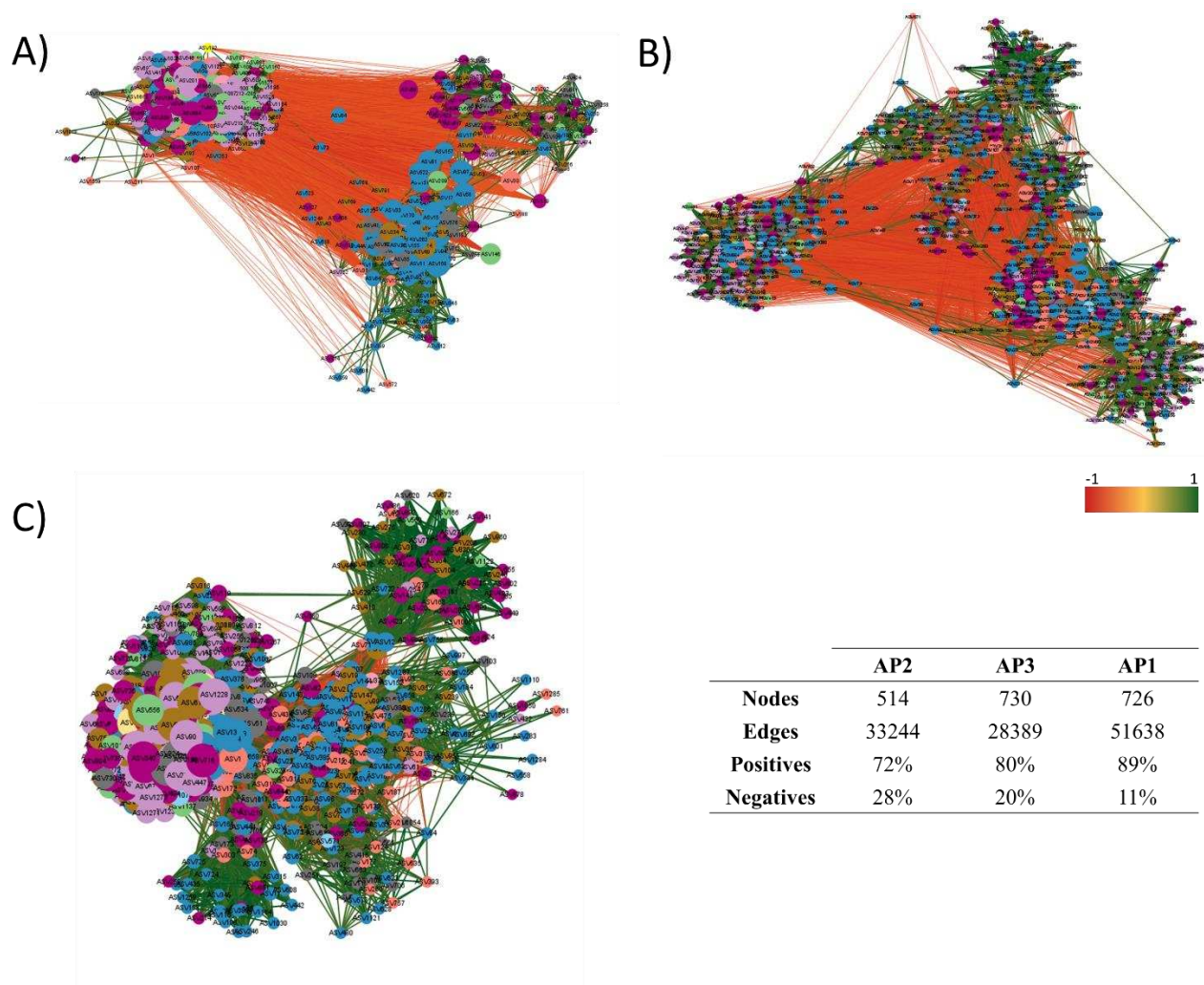


Figura 05. Rede de co-ocorrência das diferentes amostras para inferência das interações ecológicas. Arestas em vermelho representam interações de caráter negativo e arestas em verde representam interações de caráter positivo. Quanto maior o tamanho dos nós mais interações a espécie realiza as diferentes cores representam os diferentes filos. **A) AP1**, proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; **B) AP2**, membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **C) AP3**, proveniente de um Terminal Marítimo.

Para avaliar a similaridade das amostras em termos de funções que estão ocorrendo no ambiente, o perfil funcional foi predito (Figura 06). De forma geral, as funções foram similares entre as amostras (Figura 06A), dentre as funções relacionadas com a população de procariontos redutores de sulfato, 4 foram diferencialmente representadas ($p < 0.05$) entre as amostras (Figura 06B), sendo

elas a respiração do sulfato, respiração do sulfeto, acetogenese redutiva e desnitrificação, sendo que as 3 primeiras foram mais representadas nas amostras AP1 e AP3, e a desnitrificação maior nas amostras de membrana (AP2).

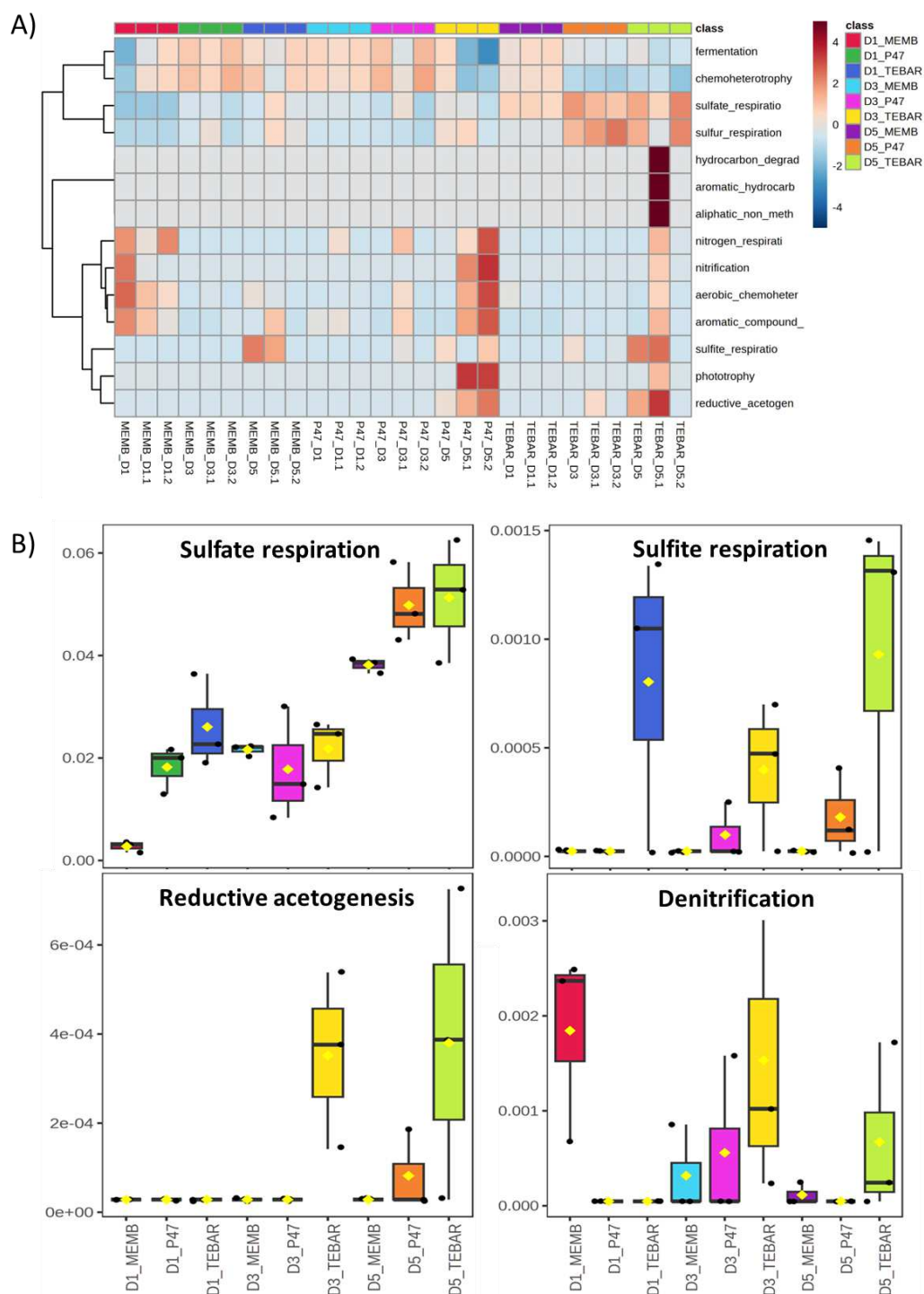


Figura 06. Perfil funcional putativo das diferentes amostras, D1: Dia 1; D3: Dia 3 e D5: Dia 5. **A)** Heatmap da abundância relativa das funções previstas; **B)** Funções

preditas que apresentaram diferença estatística entre as amostras ($p < 0.05$). **AP1**, proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos, **AP2**, membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **AP3**, proveniente de um Terminal Marítimo.

Em relação ao número de espécies indicadoras, a amostra AP3 foi a que apresentou o maior número, 34 ASVs exclusivas, seguido AP2, com 14 ASVs exclusivas e AP1, com 8 ASVs exclusivas. Já para as ASVs indicadoras compartilhadas entre as amostras, pode ser observado que a maior interação foi entre AP1 e AP3, que compartilham 51 AVSs indicadoras. Já a membrana (AP2) apresentou 2 e 5 ASVs compartilhadas com as amostras de AP3 e AP1, respectivamente (Figura 07).

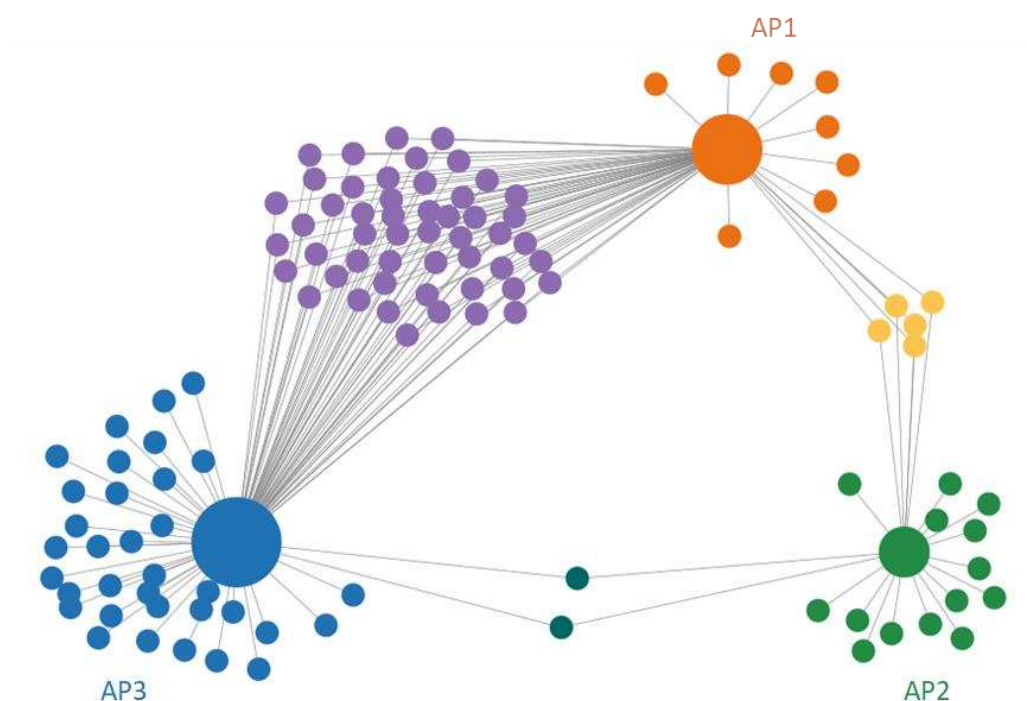


Figura 07. Rede demonstrando as ASV indicadoras de cada uma das áreas. Laranja representa as ASV exclusivas da AP1, verde representa ASV exclusivas da AP2, azul representa as ASV exclusivas do AP3, amarelo representa as ASV compartilhadas entre membrana e AP1, verde escuro as ASV compartilhadas entre AP3 e AP2 e roxo as ASV compartilhadas entre AP3 e AP1. **AP1**, proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; **AP2**, membrana de

dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **AP3**, proveniente de um Terminal Marítimo.

4. Discussão

A composição da comunidade bacteriana foi variável nos diferentes ambientes relacionados com a indústria do petróleo, pois a colonização dos procariotos redutores de sulfato está relacionada com a disponibilidade de sulfato e fontes de carbono (Varjani & Gnansounou, 2017; Santos et al., 2020). Diferentes ambientes fornecem distintas condições para produção do sulfeto de hidrogênio (H_2S), fato observado nesse trabalho. Apesar das diferentes amostras atingirem o mesmo patamar de produção de H_2S , a cinética de produção se diferiu entre elas, sendo que, a amostra AP1 apresentou maior velocidade de produção, enquanto a amostra de AP2 foi a menor. Entretanto, quando normalizado a produção de H_2S por unidade de células, foi observado que não houve diferença de produção entre as amostras, isso demonstrou que a produção H_2S foi relacionada diretamente com a quantidade de biomassa celular e indiretamente com a estrutura da comunidade microbiana, que pode conter em sua composição espécies que possuam a taxa de crescimento elevada. Hosseininoosheri e colaboradores (2017) desenvolveram um modelo para a predição do processo de *Souring* em reservatórios de petróleo, e um dos parâmetros para o ajuste do modelo foi a taxa de crescimento microbiano, demonstrando que a biomassa celular está intimamente relacionada com o perfil de concentração de H_2S nos reservatórios.

É possível correlacionar as condições físico-químicas do ambiente com o crescimento de isolados de PRS. Al-Zuhair e colaboradores (2008) testaram como a concentração inicial de sulfato, temperatura e pH influenciavam o crescimento de um isolado proveniente de uma refinaria de petróleo e concluíram que o sulfato, em elevadas concentrações, teve efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano, com crescimento máximo ocorrendo a 2500 gm^{-3} . A temperatura e o pH ótimos encontrados foram $35\text{ }^\circ\text{C}$ e 7, respectivamente. Também há esforços tentando compreender como a produção de H_2S pode ser tóxica para as próprias bactérias que os produzem (Kushkevych et al., 2019). Kushkevych e colaboradores (2019) avaliaram a toxicidade relativa da concentração de sulfeto de hidrogênio sobre a espécie *Desulfovibrio piger*, originalmente isolada de intestino humano e puderam observar que concentrações superiores a 6 mM mostraram-se tóxicas para o

crescimento dessa espécie, que teve seu crescimento interrompido, embora as atividades metabólicas não fossem 100% inibidas. Além disso, há estudos que realizam o uso de modelagem dinâmica para prever a produção de H₂S em efluente de esgotos e o uso de redes neurais para criar modelos de inferência da biocorrosão em matérias de concreto em redes de esgoto (Sun et al., 2019; Jiang et al., 2016; Sharma et al., 2008). Entretanto, pouco se sabe sobre a dinâmica de produção de H₂S por culturas mistas na indústria do petróleo e quais os fatores que influenciam diretamente na cinética de produção.

Mediante a relação encontrada entre a concentração celular (bactérias totais e de PRS) e a produção de H₂S, foi realizada a construção de uma regressão com a finalidade de estabelecer uma relação entre a produção de H₂S e quantidade de bactérias totais. O fato de o modelo de regressão quadrática ser o que melhor se ajustou ao conjunto de dados indicou que avaliamos o fenômeno na fase exponencial, onde havia a maior taxa de produção de H₂S por unidade de células, até atingir um platô, indicando a estabilização de produção nessa condição avaliada, com a subsequente queda da produção.

Entretanto, só foi possível determinar a relação entre produção de H₂S e quantidade de bactérias quando utilizamos os dados de bactérias totais no ambiente (H₂S [ppm] ~ nº de cópias de genes 16S RNAr). Tal resultado demonstrou que, apesar do grupo de PRS serem os microrganismos responsáveis pela geração de H₂S, eles fazem parte de um ambiente que favorece relações sintróficas entre as diversas espécies que compõe a comunidade microbiana. Assim, é fundamental que ocorra relações que permitem a troca de intermediários metabólicos entre os microrganismos, como um meio de viabilizar processos metabólicos energeticamente desfavoráveis (Plugge et al., 2011; Callaghan et al., 2012; Rabus et al., 2015). A necessidade do suporte dessas espécies não redutoras de sulfato para manter o ecossistema anaeróbio como um todo funcionando, pode ser um dos motivos de só ser possível estabelecer a relação entre produção de H₂S e quantidade de bactérias quando utilizamos os dados de bactérias totais.

Para explorar a complexidade das interações das amostras provenientes de diferentes ambientes da indústria do petróleo, foi utilizado a rede de co-ocorrência, que mostrou um resultado consistente com a cinética de produção de H₂S. Assim, foi possível observar que o padrão de interações microbianas foi distinto entre as

amostras, sendo que a amostra AP1 mostrou maior nível de complexidade de interações e que a amostra AP2 foi a de menor, enquanto a amostra AP3 apresentou um nível intermediário. A versatilidade metabólica do grupo de PRS pode explicar a ocorrência das complexas interações ecológicas que são capazes de desempenhar com os demais grupos microbianos, sendo que essas redes de interações são benéficas e de fundamental importância para sua sobrevivência em ambientes extremos, como, por exemplo, reservatórios de petróleo (Barton e Hamilton, 2007, Sierra-Garcia et al., 2017). Portanto, esse resultado sugere que o mecanismo regulador da produção de H_2S de um ambiente pode ser parcialmente explicado pela inferência da arquitetura de rede de interação ecológicas do ecossistema.

Em termos de perfil funcional putativo da comunidade, observou-se que não houve elevada dissimilaridade entre as amostras, há diversos trabalhos demonstrando que ambientes com condições físico-químicas semelhantes apresentam estabilidade no perfil funcional, apesar de poderem ser constituídos de composição taxonômica altamente variável (Ofiteru et al., 2010; Raes et al., 2011; Vanwonterghem et al., 2015, Louca et al., 2016; Nelson et al., 2016). Entretanto, neste trabalho verificou-se que algumas funções-chave, relacionadas com o processo de biocorrosão, apresentaram diferenças significativas entre as amostras, sendo elas a respiração do sulfato, respiração do sulfeto, acetogênese redutiva e desnitrificação (Figura 06).

As amostras apresentaram diferença de abundância da respiração do sulfato, no primeiro dia, sendo que as amostras AP1 e AP3 apresentaram maior abundância dessa função em detrimento da amostra AP2, sendo essa uma das possíveis razões da diferença entre a velocidade de produção de H_2S entre as amostras. Nos outros dias avaliados, não foi possível observar a diferença da abundância na respiração do sulfato entre as amostras. Como discutido anteriormente, a elevada concentração de H_2S no ambiente é tóxica inclusive para os microrganismos que o produz, assim, a comunidade que apresentar em sua composição populações capazes de assimilar esse composto, podem agir como mecanismo de detoxificação do meio, tornando o ambiente menos hostil ao crescimento microbiano (Kushkevych et al., 2019). Nas amostras AP3 e AP1, foi possível observar um discreto crescimento na respiração do sulfato no ambiente

nos últimos dias avaliados, sendo outro possível indicativo de que a composição da comunidade dessas amostras, favoreça a estabilidade do ecossistema.

Outra função que também foi encontrada somente nas amostras do AP1 e AP3 foi a acetogênese redutiva. Essa função foi desempenhada exclusivamente pelo gênero *Acetobacterium* nessas amostras. Esses microrganismos são capazes de fixarem dióxido de carbono usando hidrogênio molecular e gerando como produto acetato ($2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$), sendo um gênero amplamente encontrado em amostras relacionadas aos campos de petróleo (Bernalier et al., 1999; Kryachko et al., 2012; Sharma et al., 2018). Os PRS apresentam elevada plasticidade metabólica, sendo descritos como capazes de utilizar mais de 100 compostos como fonte de energia, entretanto, o acetato foi descrito como sendo um dos compostos preferenciais desse grupo (Birkeland et al., 2005; Muyzer e Stam, 2008, Santos et al., 2022). Assim, é possível que a presença desse composto no ambiente favoreça o crescimento dos PRS.

A abundância da desnitrificação foi significativamente maior na amostra de membrana (AP2), no primeiro dia analisado. Os microrganismos desnitrificantes são descritos por competirem com os PRS por doadores de elétrons em comum, a competição entre esses dois grupos fisiológicos pode resultar na exclusão competitiva das PRS (Davidova et al., 2001; Dolfig e Hubert, 2017). A competição com as nitrificantes por recursos de crescimento também pode ter sido um dos fatores que retardou a produção de H_2S na amostra de membrana.

Através da análise de especialização de nicho, observou-se a presença de ASVs indicadoras exclusivas para cada uma das áreas. Porém, quando avaliado as ASVs indicadoras compartilhada entre as amostras, foi possível observar que AP1 e AP3 apresentaram um número muito maior de ASV do que com a amostra de membrana, ressaltando novamente a maior similaridade entre estas duas amostras, sendo um indicativo de que a composição da comunidade bacteriana presente foi baseada em uma estrutura de comunidade que apresentou interações ecológicas que favoreceram a produção de H_2S de forma rápida. Porém, do ponto de vista econômico e operacional, essas relações podem ser prejudiciais para a indústria do petróleo, uma vez que podem causar o processo de biocorrosão de estruturas metálicas em plataformas de extração.

5. Conclusões

Apesar dos procariotos redutores de sulfato formarem o grupo microbiano responsável pela produção de sulfeto de hidrogênio, o fator modulador para produção de H₂S está relacionado com a quantidade de biomassa bacteriana total da comunidade.

A topologia de interações ecológicas que ocorrem na comunidade bacteriana é determinante para definir a velocidade de produção de H₂S em um ambiente, sendo que redes mais interligadas e com maior número de interações positivas são mais eficientes em gerar H₂S. E que as funções preditas respiração do sulfato, respiração do sulfeto, acetogênese redutiva e desnitrificação foram as mais significativas entre as amostras.

Esses resultados reforçam a necessidade de compreensão dos mecanismos genéticos e ecológicos da comunidade bacteriana que compõe os ambientes relacionados com a indústria do petróleo, para o planejamento eficiente do controle da biocorrosão.

6. Referências

Al Zuhair, S., El-Naas, M. H., & Al Hassani, H. (2008). Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria. *Journal of Biochemical Technology*, 1(2), 39-44.

ANP (2021). Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural. Fevereiro 2021/ Número 126. <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/202102boletim.pdf>

Berlendis, S., Ranchou-Peyruse, M., Fardeau, M. L., Lascourrèges, J. F., Joseph, M., Ollivier, B., ... & Ranchou-Peyruse, A. (2016). *Desulfotomaculum aquiferis* sp. nov. and *Desulfotomaculum profundum* sp. nov., isolated from a deep natural gas storage aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4329-4338.

Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2011). Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14288-14293.

Callaghan, A. V., Morris, B. E. L., Pereira, I. A. C., McInerney, M. J., Austin, R. N., Groves, J. T., ... & Wawrik, B. (2012). The genome sequence of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01: a blueprint for anaerobic alkane oxidation. *Environmental microbiology*, 14(1), 101-113.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643.

Campbell, C. (2017). Advances in testing and monitoring of biocides in oil and gas. *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies*, 489-511.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.

Dolfing, J., & Hubert, C. R. (2017). Using thermodynamics to predict the outcomes of nitrate-based oil reservoir souring control interventions. *Frontiers in microbiology*, 8, 2575.

Enning, D., & Garrelfs, J. (2014). Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied and environmental microbiology*, 80(4), 1226-1236.

Gieg, L. M., Jack, T. R., & Foght, J. M. (2011). Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(2), 263-282.

Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., ... & Human Microbiome Consortium. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research*, 21(3), 494-504.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Hayes, J. M., & Waldbauer, J. R. (2006). The carbon cycle and associated redox processes through time. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), 931-950.

Higashioka, Y., Kojima, H., Watanabe, M., & Fukui, M. (2013). *Desulfatitalea tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from tidal flat sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_2), 761-765.

Jiang, G., Keller, J., Bond, P. L., & Yuan, Z. (2016). Predicting concrete corrosion of sewers using artificial neural network. *Water research*, 92, 52-60.

Johnson, R. J., Folwell, B. D., Wirekoh, A., Frenzel, M., & Skovhus, T. L. (2017). Reservoir Souring—Latest developments for application and mitigation. *Journal of biotechnology*, 256, 57-67.

Kushkevych, I. V. (2014). Growth of the *Desulfomicrobium* sp. strains, their sulfate-and lactate usage, production of sulfide and acetate by the strains isolated from the human large intestine. *Microbiol. Discovery*, 2, 1-8.

Kushkevych, I., Dordević, D., & Vítězová, M. (2019). Toxicity of hydrogen sulfide toward sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7. *Archives of microbiology*, 201(3), 389-397.

Li, X. X., Liu, J. F., Yao, F., Wu, W. L., Yang, S. Z., Mbadinga, S. M., ... & Mu, B. Z. (2016). Dominance of *Desulfotignum* in sulfate-reducing community in high sulfate production-water of high temperature and corrosive petroleum reservoirs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 45-56.

Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., ... & Raes, J. (2015). Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348(6237), 1262073.

Liu, H., Gu, T., Zhang, G., Cheng, Y., Wang, H., & Liu, H. (2016). The effect of magnetic field on biomineralization and corrosion behavior of carbon steel induced by iron-oxidizing bacteria. *Corrosion Science*, 102, 93-102.

Louca, S., Parfrey, L. W., & Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305), 1272-1277.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*, 8(4), e61217.

Meyer, B., & Kuever, J. (2007). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes—origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology*, 153, 2026-2044.

Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 441-454.

Narenkumar, J., AlSalhi, M. S., Arul Prakash, A., Abilaji, S., Devanesan, S., Rajasekar, A., & Alfuraydi, A. A. (2019). Impact and role of bacterial communities on biocorrosion of metals used in the processing industry. *ACS omega*, 4(25), 21353-21360.

Nelson, M. B., Martiny, A. C., & Martiny, J. B. (2016). Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), 8033-8040.

Ofițeru, I. D., Lunn, M., Curtis, T. P., Wells, G. F., Criddle, C. S., Francis, C. A., & Sloan, W. T. (2010). Combined niche and neutral effects in a microbial

wastewater treatment community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), 15345-15350.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... & Oksanen, M. J. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package*, version, 2(9), 1-295.

Olden, J. D., & Poff, N. L. (2003). Toward a mechanistic understanding and prediction of biotic homogenization. *The American Naturalist*, 162(4), 442-460.

Plugge, C. M., Zhang, W., Scholten, J., & Stams, A. J. (2011). Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in microbiology*, 2, 81.

POSTGATE, J.R (1084). *The Sulphate-Reducing Bacteria*, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 224 pp.,

Rabus, R., Venceslau, S. S., Woehlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D., & Pereira, I. A. (2015). A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Advances in microbial physiology*, 66, 55-321.

Raes, J., Letunic, I., Yamada, T., Jensen, L. J., & Bork, P. (2011). Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. *Molecular systems biology*, 7(1), 473.

Rees, G. N., & Patel, B. K. (2015). *Desulfacinum*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-4.

Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., & Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 32(1), 109-134.

Rellegadla, S., Jain, S., & Agrawal, A. (2020). Oil reservoir simulating bioreactors: tools for understanding petroleum microbiology. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(3), 1035-1053.

Santos, J. C., Lopes, D. R. G., Da Silva, J. D., De Oliveira, M. D., Dias, R. S., Lima, H. S., ... & da Silva, C. C. (2020). Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 151, 104966.

Sharma, K. R., Yuan, Z., de Haas, D., Hamilton, G., Corrie, S., & Keller, J. (2008). Dynamics and dynamic modelling of H₂S production in sewer systems. *Water Research*, 42(10-11), 2527-2538.

Sun, J., Ni, B. J., Sharma, K. R., Wang, Q., Hu, S., & Yuan, Z. (2018). Modelling the long-term effect of wastewater compositions on maximum sulfide and methane production rates of sewer biofilm. *Water research*, 129, 58-65.

Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 73-94.

Tiburcio, S. R. G., Macrae, A., Peixoto, R. S., da Costa Rachid, C. T. C., Mansoldo, F. R. P., Alviano, D. S., ... & Vermelho, A. B. (2021). Sulphate-reducing bacterial community structure from produced water of the Periquito and Galo de Campina onshore oilfields in Brazil. *Scientific reports*, 11(1), 1-11.

Tkachuk, N., Zelena, L., Mazur, P., & Lukash, O. (2020). Genotypic, physiological and biochemical features of *Desulfovibrio* strains in a sulfidogenic microbial community isolated from the soil of ferrosphere. *Ecological questions*, 31(2), 79-88.

Varjani, S. J., & Gnansounou, E. (2017). Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource technology*, 245, 1258-1265.

Whiteley, A. S., & Bailey, M. J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2400-2407.

7. Material suplementar

Tabela S1. Média dos valores de cinética de produção de H₂S (n=3) de amostras coletadas em diferentes setores da indústria do petróleo, \pm desvio-padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0.05$). **AP1**, proveniente de tanque de carga de uma plataforma da Bacia de Campos; **AP2**, membrana de dessulfatação proveniente de uma plataforma da Bacia do Espírito Santos e **AP3**, proveniente de um Terminal Marítimo.

	Dia 1		Dia 2		Dia3		Dia4		Dia5		Dia7	
AP1	79.22 ^a	± 13.94	193.19 ^a	± 5.43	278.76 ^a	± 2.91	346.53 ^a	± 7.59	367.61 ^a	± 6.37	372.97 ^a	± 25.26
AP2	43.23 ^b	± 20.27	69.41 ^b	± 7.68	129.93 ^b	± 0.92	217.99 ^b	± 4.65	277.67 ^b	± 13.57	357.16 ^a	± 16.91
AP3	48.08 ^b	± 6.88	89.50 ^b	± 23.13	217.08 ^a	± 16.96	337.63 ^a	± 12.06	386.59 ^a	± 37.46	404.79 ^a	± 33.32

CAPÍTULO 3: Uso de aprendizado de máquinas para a construção de um modelo para predição da abundância de bactérias redutoras de sulfato

1. Introdução

Procariotos redutores de sulfato (PRS) são micro-organismos anaeróbios capazes de realizar a redução dissimilativa do sulfato, onde este composto atua como acceptor final de elétrons durante a oxidação de compostos orgânicos ou H_2 para a obtenção de energia, resultando na produção de sulfeto (Muyzer and Stams, 2008; Enning & Garrelfs, 2014). Estes procariotos estão presentes em quase todos os ambientes anóxicos, naturais ou não, como no solo, sedimentos marinhos, água doce e campos de petróleo, e desempenham importantes papéis nos ciclos do carbono e do enxofre (Rabus et al., 2015).

A atividade metabólica dos PRS tem grande relevância econômica e ambiental, seja pelo lado positivo ou negativo. Visto pela ótica positiva, os PRS possuem diversas aplicações biotecnológicas, que incluem o tratamento de drenagem ácida de minas, imobilização de metais pesados, remoção de compostos sulfatados de rejeitos industriais, biorremediação de compostos orgânicos e outros (Ayangbenro et al., 2018; Li et al, 2017; Lee et al., 2014; Jong et al. 2003).

Porém, o metabolismo dos PRS é responsável por gerar grandes prejuízos em vários setores da indústria, isso porque o sulfeto de hidrogênio (H_2S) produzido durante a respiração anaeróbica é um gás extremamente tóxico, explosivo e corrosivo. Tendo a capacidade de causar corrosão em estruturas de concreto e metálica (Kaushal et al., 2018; Lv et al., 2019).

Na indústria do petróleo, esse problema se agrava devido a utilização de água de injeção durante a recuperação do óleo, onde um fluxo de água do mar é utilizado para manter a pressão do reservatório (Planckaert et al., 2005; Williamson et al., 2011). Essa água contém elevadas concentrações de sulfato, o que contribui para a proliferação destes microrganismos, tanto os nativos dos reservatórios quanto aqueles introduzidos através da injeção de água (Sunde and Torsvik, 2005; Gieg et al., 2011).

A presença de microrganismos redutores de sulfato em plataformas petrolíferas, além de acarretar gastos econômicos relacionados à biocorrosão, também provoca a diminuição da qualidade do petróleo por um processo denominado *souring*, que é responsável pela acidificação do óleo, decorrente do aumento da concentra-

ção de compostos de enxofre, principalmente o H₂S, ocasionando a redução da qualidade da matéria-prima extraída (Elmawgoud et al., 2015).

Por isso, o monitoramento das populações de PRS torna-se de fundamental importância para o controle efetivo desse grupo de microrganismos na indústria do petróleo. Compreender a dinâmica das relações ecológicas que ocorrem entre as espécies que compõe essa comunidade é o primeiro passo para entender o sistema como um todo e, com isso, planejar medidas de controle mais eficazes.

O aperfeiçoamento das ferramentas de predição, como o aprendizado de máquinas, tem auxiliado no avanço de diversos campos da ciência. No campo da medicina, tem sido utilizado para auxiliar na compreensão e reconhecimento de diversas doenças (Liu et al., 2020), na agricultura para prever a produtividade de safras (Pandith et al., 2020), na automação de tráfegos de trânsito (Zhang et al., 2021) e muitas outras aplicações. No campo da microbiologia, não tem sido diferente, o uso de aprendizado de máquinas tem se mostrado uma ferramenta extremamente robusta, e com isso, tem sido amplamente utilizado para classificar e prever interações microbianas (Chang et al., 2017; Biassoni et al., 2020; Zhang 2021).

Assim, o objetivo desse trabalho foi criar um modelo preditivo, através da aprendizagem de máquinas, para a abundância da população de bactérias redutoras de sulfato com base na abundância do restante da comunidade bacteriana ali presente, com o intuito de expandir a compreensão das interações microbianas em ambientes relacionados com a indústria do petróleo, bem como selecionar gêneros biomarcadores para a população de PRS.

2. Material e Métodos

2.1. Descrição dos conjuntos de dados.

Os dados de metataxonomia de amostras provenientes de ambientes relacionados com o petróleo foram obtidos através do *Metagenomics analysis server* (MG-RAST) (Keegan et al., 2016), que é um servidor *open source* onde é possível realizar análises e anotação de dados provenientes de sequenciamento NGS e também serve como repositório para deposição desses dados. Para seleção dos dados foram utilizados como palavras-chaves 'Oil', 'Oil field production water', 'Petroleum' e 'Production water'. Com base nessas palavras foi possível encontrar 50 estudos em 7 países distintos, totalizando 253 amostras de sequenciamento de

amostras relacionadas a ambientes de petróleo (Figura 01). Essas amostras passaram por um processo de curadoria manual para garantir que eram provenientes de ambientes naturais e os dados estavam com boa qualidade de sequenciamento.

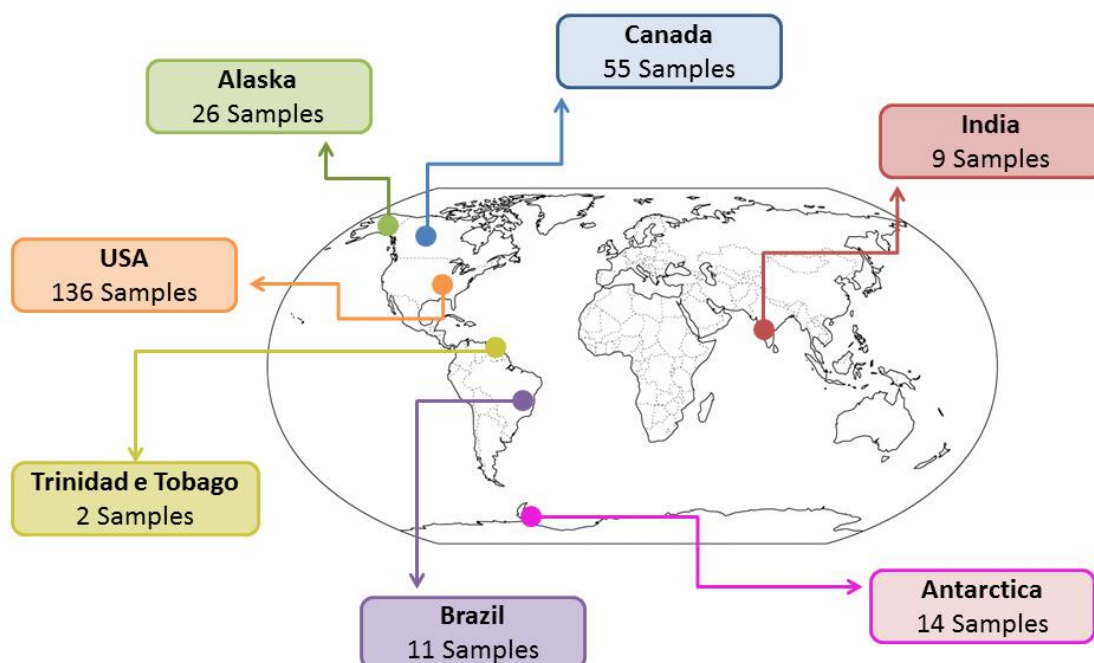


Figura 01 - Mapa demonstrando os locais onde os dados foram coletados.

2.2. Construção do modelo preditivo

2.2.1. Seleção de variáveis

Todos os gêneros descritos na literatura como pertencentes ao grupo dos procariotos redutores de sulfato foram agrupados em uma única classe denominada PRS (Rabus et. al. 2015), essa classe foi utilizada como a variável dependente (Y), ou seja, o fenômeno que seria predito pelo modelo. O restante da comunidade, os gêneros não redutores de sulfato, foram utilizados como variáveis independentes (X) para a modelagem. Primeiramente, foi realizada a seleção das variáveis independentes não colineares, através da correlação linear de Pearson, utilizando um cutoff de 0.95 para variáveis altamente correlacionadas. Depois o algoritmo *recursive feature elimination* (RFE) foi utilizado para selecionar as variáveis que possuem maior poder de explicar a variação na abundância dos PRS, o r^2 foi utilizado como métrica para avaliar o impacto da remoção de cada variável do modelo.

2.2.2. Ajuste do modelo

Para prever a abundância das bactérias redutoras de sulfato foram utilizados quatro diferentes algoritmos implementados dentro do pacote caret do software R (Kuhn M., 2008), sendo esses a árvore de regressão utilizando o pacote rpart (Therneau et al., 2010), bagging cart utilizando o pacote ipred (Peters & Hothorn, 2013), o random forest utilizando o pacote randomForest e o cubist utilizando o pacote cubist. Os dados foram separados em 80% e 20% para treinamento e validação, respectivamente. Foi avaliado o r^2 e o erro médio quadrático para avaliar a eficiência de cada modelo obtido.

2.3. Análises estatísticas e filogenéticas

A correlação linear de Pearson entre os gêneros bacterianos presentes nas amostras relacionadas ao petróleo foi calculada utilizando o software PAST (Hammer et al., 2001). Para as análises filogenéticas, as sequências tipo para a região parcial do 16S rDNA dos isolados bacterianos selecionados na etapa de mineração de dados foram coletadas no LPNS (Parte et al., 2020). O alinhamento entre as sequências foi realizado utilizando o ClustalW (Thompson et al., 1997), e a árvore filogenética foi construída usando o agrupamento *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) com *Bootstrap* de 1000 no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) (Tamura et al., 2007).

3. Resultados e discussão

Estima-se que os microrganismos surgiram há cerca de 3,5 bilhões de anos, tornando-os um dos primeiros seres vivos a habitar a Terra (Nannipieri et al., 2010). E desempenham funções extremamente importantes na natureza e nos diferentes setores, desde a indústria de alimentos, na medicina, agricultura, biotecnologia, proteção ambiental e muito outros (Petrof et al., 2012; Yu et al., 2018; Souza, 2010; Reiff e Kelly, 2010).

Com o avanço do sequenciamento NGS, comunidades microbianas inteiras puderam ser sequenciadas, revelando uma extensa diversidade genética e taxonômica (Turnbaugh et al., 2007; Robinson and Pfeiffer, 2014). E com isso, houve avanços na compreensão da interação entre diferentes microrganismos

(DiMucci et al., 2018), a interação entre microrganismos e outros organismos (Xie et al., 2018) e a interação entre microrganismos e o ambiente (Moitinho-Silva et al., 2017). Entretanto, devido à natureza dos tipos de dados obtido pelo sequenciamento NGS, há muitas informações que ainda necessita ser elucidada, a predição precisa de alteração de padrões nas características do microbioma ainda é um problema (Rothschild et al., 2018). Nesse sentido, o uso de *Machine Learning* pode fornecer novos *insights* sobre análises dos microbiomas, por meio do desenvolvimento de modelos que podem ser usados para prever interações de diversas naturezas (Knights et al., 2011; Moitinho-Silva et al., 2017). Métodos sofisticados de aprendizado de máquina em análise de microbioma foram propostos consideravelmente nos últimos anos (Ananthakrishnan et al., 2017; Rahman et al., 2018). Por isso, a elaboração de um modelo preditivo para a abundância de PRS pode ser um passo importante para o entendimento das relações ecológicas que ocorrem nos ambientes relacionados ao petróleo.

O conjunto de dados inicial, obtido através do MG-RAST, apresentava um total de 1510 gêneros bacterianos. Após a remoção das variáveis colineares ($R > 0.95$), esse número foi reduzido para 838 gêneros bacterianos. A remoção de variáveis altamente correlacionadas é importante para não inflacionar o modelo preditivo, evitando a colinearidade de variáveis (Dormann et al., 2013).

Apesar das amostras coletadas serem proveniente de 7 países distintos, com condições edafoclimáticas completamente diferentes, as amostras mostraram-se relativamente similares em termos de composição da comunidade bacteriana a nível de gênero (Figura 02).

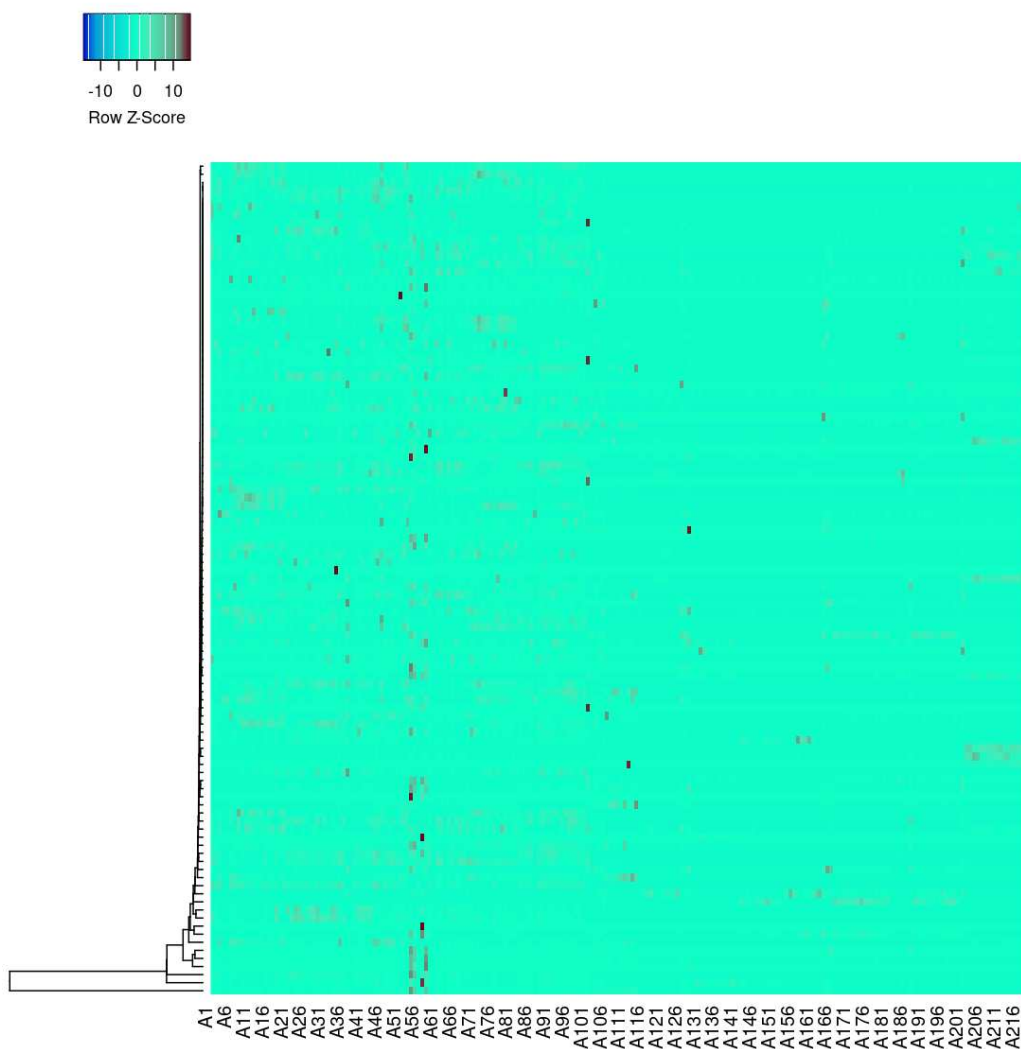


Figura 02 – Abundância relativa de gêneros (95% de identidade) nas amostras coletadas. O eixo x representa as diferentes amostras, o eixo y a abundâncias dos gêneros.

Os 15 gêneros mais abundantes foram os mesmos em todas as amostras, sendo que a soma desses gêneros representa aproximadamente 82% de todo o conjunto de dados (Figura 03).

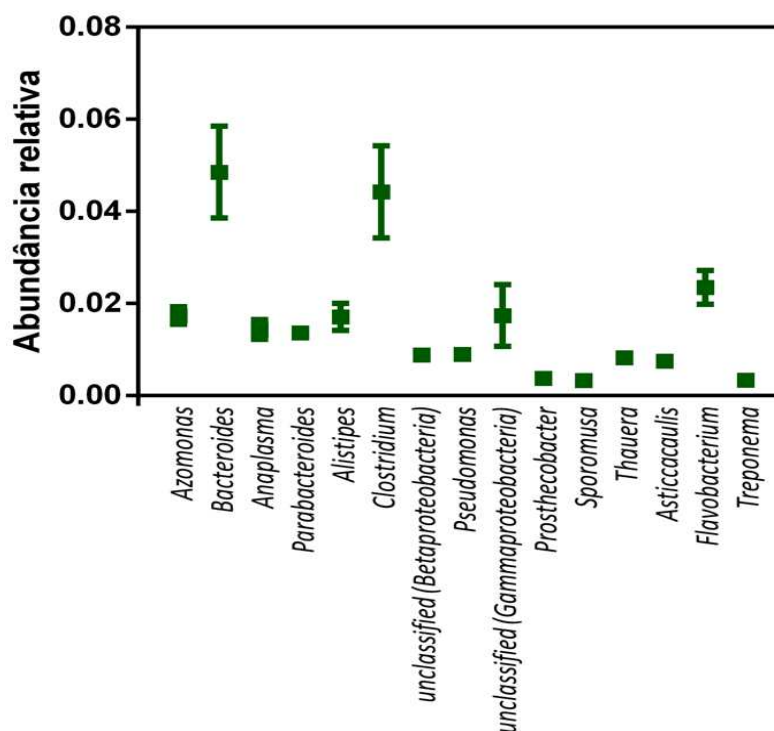


Figura 03 – Abundância relativa dos 15 gêneros (97% de identidade) mais abundantes nas amostras coletadas.

Dentre esses gêneros mais abundantes, dois são amplamente encontrados em ambientes relacionados ao petróleo, sendo eles, *Pseudomonas* e *Clostridium*. Estudos de metataxonomia em amostras de água de produção e óleo têm demonstrado que, dentre os filos mais abundantes, encontra-se o Proteobacteria (Joshi et al., 2014; Song et al., 2018; Tiburcio et al., 2021). O filo Proteobacteria engloba a maioria dos PRS (Rabus et al., 2015), porém outro importante representante desse filo é o gênero *Pseudomonas*. Belgini et al. (2018), ao avaliar as amostras provenientes da refinaria Gabriel Passos (REGAP) na cidade de Betim (Brasil) identificaram *Pseudomonas* como um dos gêneros dominantes.

O filo Firmicutes, além de conter algumas espécies de PRS, contém também outros representantes relevantes para a manutenção do ecossistema dos reservatórios de petróleo, como *Clostridium* sp. (Li et al., 2017). Santos et al. (2020) avaliaram a diversidade de PRS em amostras de óleo cru e água de produção proveniente de dois reservatórios distintos, foi observado que o gênero *Clostridium* representava 12 a 25% da abundância total das amostras.

A primeira etapa para a construção do modelo consiste na realização da mineração de dados, selecionando as variáveis que melhor explicam a variância da abundância de PRS no ambiente, utilizando o algoritmo *Recursive Feature Elimination* (RFE). Sendo esse um método que baseia-se na construção de vários modelos simultaneamente, a cada modelo construído é deixando de lado uma variável por vez, o processo é repetido recursivamente até que todas as variáveis do conjunto de dados sejam esgotadas, assim, é possível avaliar quais variáveis que apresentam um melhor ou pior desempenho para o ajuste do modelo, baseado em métricas para avaliar a acurácia do modelo, nesse caso foi utilizado o r^2 (Chen et al., 2007; Zhou et al., 2014; Darst et al., 2018). Com base no resultado foi possível a eliminação de 825 variáveis sem que houvesse a queda no valor de r^2 , sobrando assim 13 variáveis para serem utilizadas para a construção dos modelos e o rank de importância de cada variável pode ser observada na figura 04.

Dentre todos os gêneros bacterianos encontrados nas amostras relacionadas com o ambiente de petróleo, 13 possuem uma maior importância para explicar a variação na abundância PRS, são estes os *Hydrogenaphaga*, *Geobacillus*, *Beutenbergia*, *Megasphaera*, *Listeria*, *Geobacter*, *Burkholderia*, *Cythophaga*, *Frankia*, *Virgibacillus*, *Marinocillum*, *Caloramator* e *Caldicellulosiruptor*. Curiosamente, nenhum dos gêneros selecionados para a construção do modelo encontrava-se entre os quinze gêneros mais abundantes nas amostras, indicando, possivelmente, que gêneros que encontram em baixa abundância possuem grande influência para a modulação da abundância de PRS nos ambientes em que estão presentes.

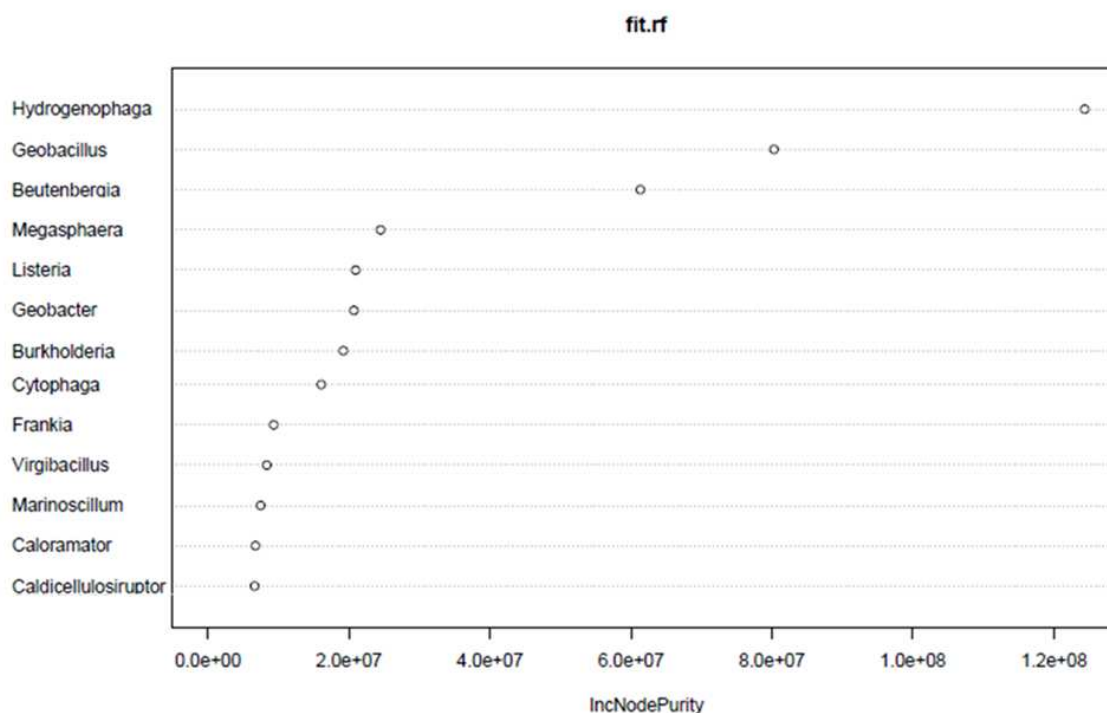


Figura 04 – Gêneros bacterianos que possuem maior importância para explicar a variação na abundância de bactérias redutoras de sulfato, selecionados para realizar a construção do modelo preditivo. Quanto maior o valor de fit, maior a importância da variável para o modelo.

Os PRS necessitam viver em sintrofia com diversas outras populações bacterianas para permitir o seu crescimento, que é lento, em ambientes distróficos e contaminados, como, por exemplo, bactérias produtoras de ácidos que através do seu metabolismo irá fornecer substrato para o crescimento dos PRS. A espécie *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* somente consegue oxidar o proprionato a acetato, CO₂ e CH₄ quando cresce sintroficamente com a espécie *Methanobacterium autotrophicum* Z245 (Plugge, Balk, & Stams, 2002). Outra relação sintrófica pode ser estabelecida quando é realizado a degradação do tolueno, estudos sugerem que *Desulfosporosinus* sp. são responsáveis por ativar e degradar o tolueno a pimelyl-CoA, que posteriormente é transformado a Acetyl-CoA por espécies filiadas a *Desulfovibrionales* e *Syntrophaceae* sendo, posteriormente, oxidado a CH₄ (Fowler et al., 2014). Porém

essa cadeia complexa de interações ecológicas que ocorrem dentro desses ambientes não foi completamente elucidada, ainda não sabe-se com exatidão como os PRS interagem com todas as espécies que ali estão presentes, seja essa interação de caráter positivo ou negativo.

Todos os gêneros selecionados para a construção do modelo apresentaram correlação positiva significativa (p -valor < 0.05) com a abundância de PRS nas amostras, com exceção do gênero *Marinoscillum* (Figura 05). Sendo que os gêneros que apresentaram maior correlação foram *Burkholderia* ($r = 0.9284$), *Caldicellulosiruptor* ($r = 0.8437$) e *Geobacter* ($r = 0.8069$).

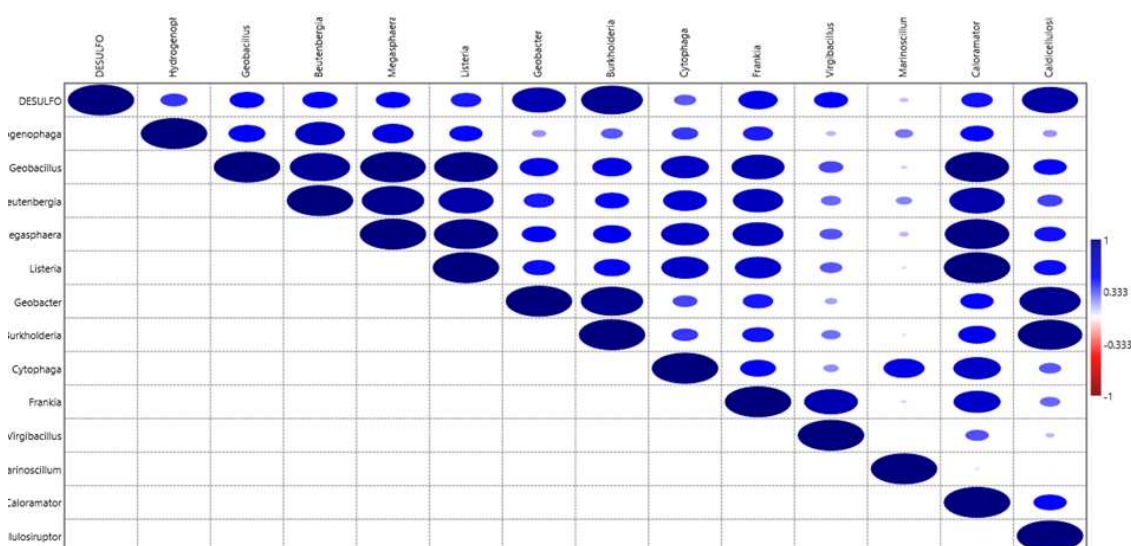


Figura 05 – Correlação linear de Pearson entre os gêneros bacterianos utilizados para construir o modelo preditivo de abundância de BRS. O tamanho do círculo representa o peso da correlação.

Os PRS são considerados um grupo polifilético e ubíquo aos ambientes anóxicos. Sendo a maioria das espécies pertencentes ao Domínio Bacteria, onde grande parte é filiada ao filo Proteobacteria, mais especificamente a classe Deltaproteobacteria, porém também há representantes dos filos Firmicutes, Thermodesulfobacteria, Nitrospirae e também representantes do domínio Archaea (Rabus et al., 2015).

Não foi possível observar uma correlação clara entre a filogenia dos PRS e dos gêneros selecionados para a construção do modelo preditivo de abundância de PRS (Figura 06).

Os representantes dos PRS pertencentes ao filo Proteobacteria agruparam entre si, juntamente com o gênero *Geobacter*, que também é pertencente a esse filo (Figura 06). Esse gênero é descrito por possui um alto conteúdo de citocromos c, que é característico de algumas Proteobacterias que são submetidas a condições redox variáveis. Sendo assim, elas são responsáveis por auxiliar na manutenção do gradiente redox do ambiente que favorece o crescimento dos PRS (Thomas et al., 2008). Outro fato importante relacionado com esse gênero é que elas possuem a capacidade metabólica de utilizar uma vasta variabilidade de aceptores finais de elétrons, incluindo metais pesados como urânio e chumbo, isso permite a remoção a e transformação desses metais em uma forma que não afetará tanto o crescimento das PRS (Watson et al., 2013).

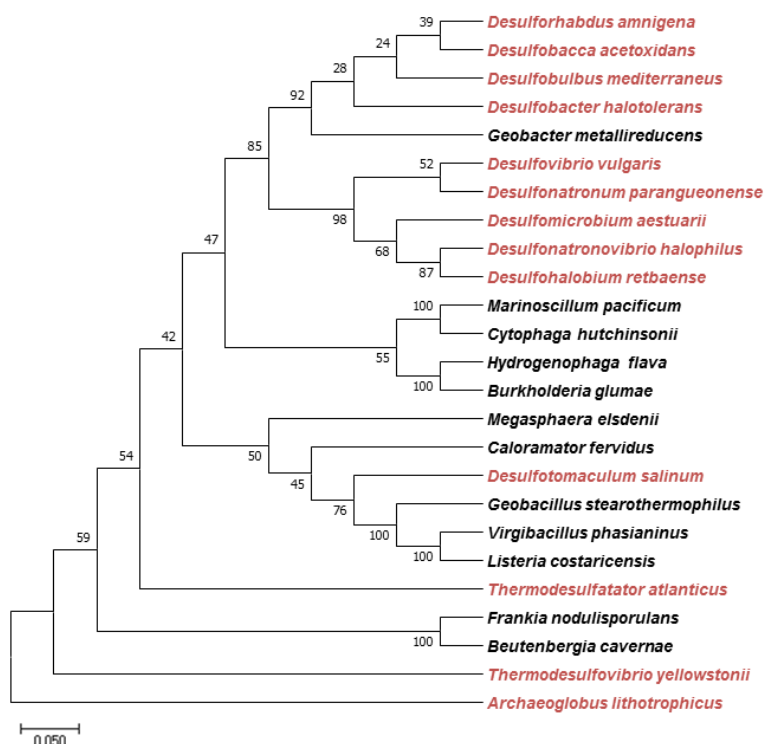


Figura 06 – Árvore filogenética baseada na sequência parcial 16S rDNA dos dois isolados bacteriano. Os isolados que tiveram significância para construção do modelo preditivo então em preto, e os procariontos redutores de sulfato, em vermelho.

Dos 13 gêneros selecionados, 8 são pertencentes ao superfilo Terrabacteria, sendo eles, *Geobacillus*, *Beutenbergia*, *Megasphaera*, *Listeria*, *Frankia*, *Virgibacillus*, *Caloramator* e *Caldicellulosiruptor* (Figura 06). Battistuzzi et al. (2004) nomearam esse grupo como Terrabacteria, estima-se que o surgimento foi há aproximadamente 3 bilhões de anos atrás, e provavelmente evoluíram em resposta ao advento das condições terrestres. Esse grupo é conhecido por possuir adaptações importantes, tais como a resistência a ambientes adversos, como a proteção contra dessecação, exposição a radiação ultravioleta e presença de alta salinidade (Battistuzzi et al., 2009; Parks et al., 2017; Saitou et al., 2018). Ambientes relacionados ao petróleo, principalmente os reservatórios, são conhecidos por conterem condições ambientais extremas, como elevadas temperaturas e presença de hidrocarbonetos de difícil decomposição. Porém, há diversos microrganismos adaptados para sobreviverem a essas condições (Pannekens et al., 2019). É possível que esses representantes do superfilo Terrabacteria, por possuírem adaptações para sobreviverem em ambientes extremos, auxiliem de alguma forma o desenvolvimento dos PRS nesse ambiente, porém, experimentos laboratoriais precisam ser desenvolvidos para comprovar essa hipótese.

Para a construção do modelo preditivo da abundância de PRS, foram utilizados 4 algoritmos distintos, sendo eles, Árvore de Regressão, Bagging Cart, Random Forest e Cubist. Para avaliar o desempenho de cada algoritmo foi usado o coeficiente de determinação (r^2) e a raiz do erro médio quadrático (RMSE) (Tabela 01).

Tabela 01 – Métricas para avaliar a qualidade do modelo preditivo. Valor da raiz do erro médio quadrático (RMSE) e Valor do coeficiente de determinação (r^2) para cada algoritmo utilizado para ajustar a regressão.

Modelos Preditivos				
	Árvore de regressão	Bagging Cart	Random Forest	Cubist
rmse	905.29	741.4	766.1	832.14
r^2	0.4869	0.8108	0.694	0.5696

O RMSE é a medida que calcula a raiz quadrática média dos erros entre valores observados (reais) e previsões (hipóteses), sendo uma forma de avaliar a diferença entre um estimador e o verdadeiro valor da quantidade estimada, por isso, é utilizado como um critério para selecionar um estimador adequado. O RMSE é uma das métricas mais utilizadas para medir a acurácia de modelos preditivos. Nesse contexto, quanto menor for o valor de RMSE mais preciso é o modelo (Wang et al., 2018). O valor de RMSE para os diferentes algoritmos utilizados variou de 741.4 a 905.29, sendo o *Bagging Cart* que melhor se ajustou nessa situação, apresentando o RMSE de 741.4 (Tabela 01).

O r^2 é uma medida de ajuste de um modelo estatístico linear generalizado, em relação aos valores observados. Seu valor varia entre 0 e 1, indicando, em percentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Quanto maior o r^2 , mais explicativo é o modelo, ou seja, melhor ele se ajusta às condições da amostra. O valor de r^2 para os diferentes algoritmos testados variou de 0.4869 a 0.8108, sendo que *Bagging Cart* também foi o que apresentou valores de maior acurácia para o ajuste do modelo ($r^2 = 0.8108$) (Tabela 01).

Quando trabalhamos com dados de microbiomas ambientais, com as metodologias atuais, dificilmente será atingido um r^2 próximo a 1. Chang et al. (2017) utilizou *machine learning* para construir um modelo preditivo para áreas de alta/baixa produtividade de culturas com base no microbioma do solo e, utilizando o algoritmo *Random Forest* conseguiu prever a produtividade da área com uma acurácia de 0.79 com base na composição do microbioma a nível filogenético de ordem.

Não existe um algoritmo ótimo para todas as situações, o desempenho pode variar de acordo com conjunto de dados que estão sendo utilizados para realizar as análises. Sendo assim, é importante testar um número maior de algoritmos para ver qual apresenta o melhor ajuste para o conjunto de dados. Como pode ser observado, quando avaliamos a relação entre a abundância real de PRS nas amostras versus a abundância predita de PRS por cada algoritmo testado, o que melhor se ajustou foi o *Bagging Cart* (Figura 07).

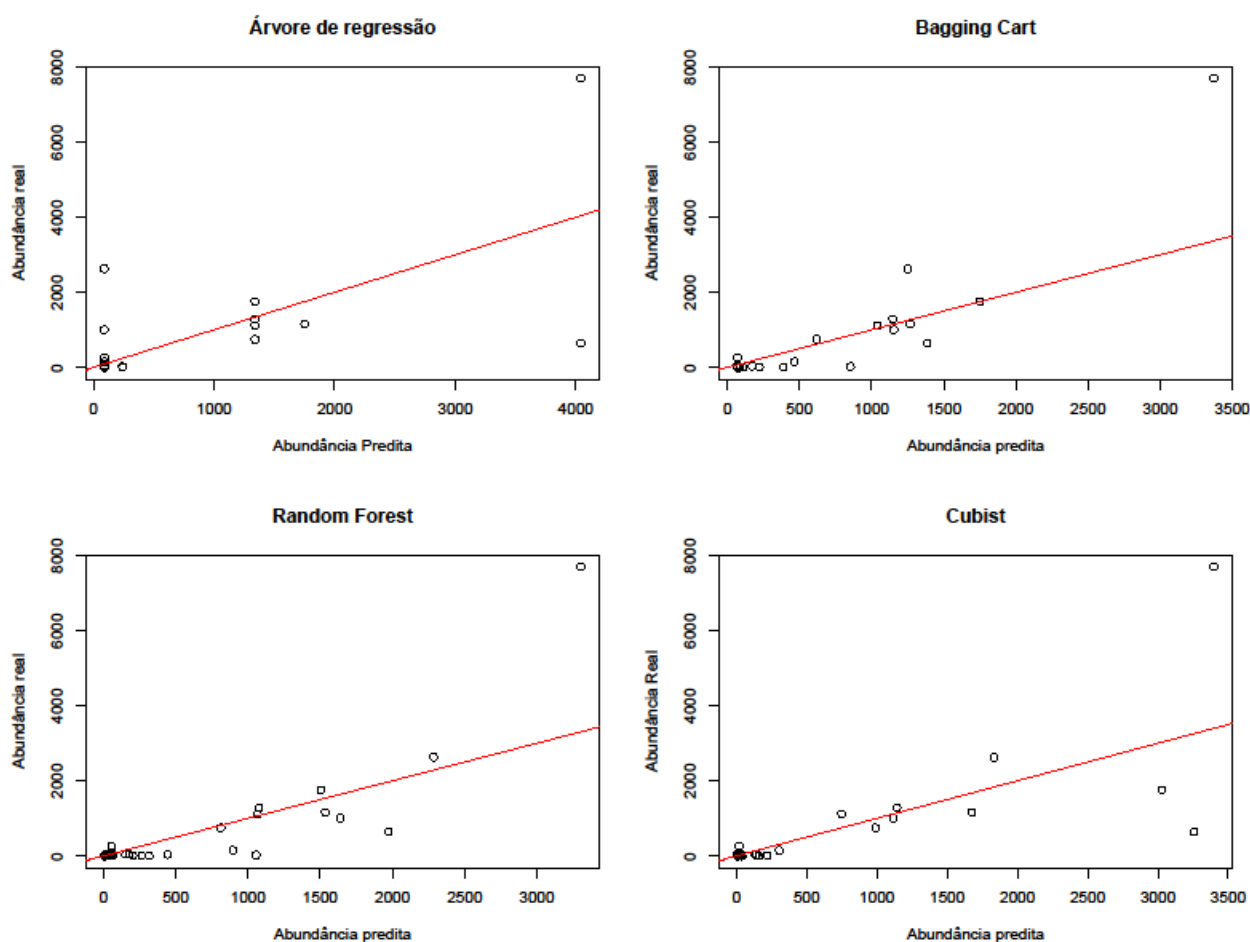


Figura 07 – Relação entre a abundância real de BRS nas amostras relacionadas à ambientes de petróleo versus a abundância predita de BRS por cada algoritmo testado.

Geralmente, o grande problema em se utilizar aprendizado de máquinas é que os modelos preditivos obtidos são difíceis de generalizar para outras amostras (Pasolli et al., 2016). Para tentar mitigar esse problema, é necessário integrar dados de diferentes origens na composição do *dataset* para a construção do modelo. Por isso, nesse trabalho, a utilização de amostras provenientes de regiões distintas coletados em banco de dados públicos mostrou-se uma boa alternativa para a construção de um modelo preditivo robusto e generalista para a predição de abundância de PRS em amostras relacionadas ao ambiente de petróleo. O uso de dados provenientes de múltiplos estudos possibilitou Pasolli et al. (2016) explorar o uso de validação externa de modelos em conjuntos de dados verdadeiramente separados. Demonstrando que a utilização de validação externa pode, em princípio, resultar em

modelos preditivos mais robustos e generalizáveis do que modelos que são validados apenas internamente.

4. Conclusões

A implementação da técnica de aprendizado de máquinas mostrou-se extremamente eficiente para a construção do modelo preditivo para a abundância de PRS em amostras relacionadas a indústria do petróleo. Dentre os algoritmos testados, o que apresentou melhor desempenho foi o *Bagging Cart*, para as condições de nossas amostras.

Os gêneros mais importantes na construção do modelo preditivo foram: *Hydrogenaphaga*, *Geobacillus*, *Beutenbergia*, *Megasphaera*, *Listeria*, *Geobacter*, *Burkholderia*, *Cytophaga*, *Frankia*, *Virgibacillus*, *Marinoscillum*, *Caloramator* e *Caldicellulosiruptor*, tornando-se possíveis biomarcadores para populações de PRS. Porém, experimentos laboratoriais são necessários para comprovar, com maior riqueza de detalhes, a natureza biológica dessas relações.

5. Referências

Ananthakrishnan, A. N., Luo, C., Yajnik, V., Khalili, H., Garber, J. J., Stevens, B. W., ... & Xavier, R. J. (2017). Gut microbiome function predicts response to anti-integrin biologic therapy in inflammatory bowel diseases. *Cell host & microbe*, 21(5), 603-610.

Ayangbenro, A. S., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2018). Sulfate-reducing bacteria as an effective tool for sustainable acid mine bioremediation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1986.

Battistuzzi, F. U., Feijao, A., & Hedges, S. B. (2004). A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC evolutionary biology*, 4(1), 1-14.

Battistuzzi, F. U., & Hedges, S. B. (2009). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular biology and evolution*, 26(2), 335-343.

Belgini, D. R., Siqueira, V. M., Oliveira, D. M., Fonseca, S. G., Piccin-Santos, V., Dias, R. S., ... & Oliveira, V. M. (2018). Integrated diversity analysis of the microbial community in a reverse osmosis system from a Brazilian oil refinery. *Systematic and applied microbiology*, 41(5), 473-486.

Biassoni, R., Di Marco, E., Squillario, M., Barla, A., Piccolo, G., Ugolotti, E., ... & d'Annunzio, G. (2020). Gut microbiota in T1DM-onset pediatric patients: machine-learning algorithms to classify microorganisms as disease linked. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(9), e3114-e3126.

Chang, H. X., Haudenshield, J. S., Bowen, C. R., & Hartman, G. L. (2017). Metagenome-wide association study and machine learning prediction of bulk soil microbiome and crop productivity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 519.

Chen, X. W., & Jeong, J. C. (2007, December). Enhanced recursive feature elimination. In *Sixth International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA 2007)* (pp. 429-435). IEEE.

Darst, B. F., Malecki, K. C., & Engelman, C. D. (2018). Using recursive feature elimination in random forest to account for correlated variables in high dimensional data. *BMC genetics*, 19(1), 1-6.

DiMucci, D., Kon, M., & Segrè, D. (2018). Machine learning reveals missing edges and putative interaction mechanisms in microbial ecosystem networks. *Msystems*, 3(5), e00181-18.

Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., ... & Lautenbach, S. (2013). Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*, 36(1), 27-46.

Elmawgoud, H. A., Elshiekh, T. M., Khalil, S. A., Alsabagh, A. M., & Tawfik, M. (2015). Modeling of hydrogen sulfide removal from Petroleum production facilities using H₂S scavenger. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 131-137.

Enning, D., & Garrelfs, J. (2014). Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied and environmental microbiology*, 80(4), 1226-1236.

Fowler, S. J., Gutierrez-Zamora, M. L., Manefield, M., & Gieg, L. M. (2014). Identification of toluene degraders in a methanogenic enrichment culture. *FEMS microbiology ecology*, 89(3), 625-636.

Gieg, L. M., Jack, T. R., & Foght, J. M. (2011). Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(2), 263-282.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Jong, T., & Parry, D. L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water research*, 37(14), 3379-3389.

Kaushal, V., Najafi, M., & Love, J. (2018). Qualitative investigation of microbially induced corrosion of concrete in sanitary sewer pipe and manholes. In *Pipelines 2018: Condition Assessment, Construction, and Rehabilitation* (pp. 768-775). Reston, VA: American Society of Civil Engineers.

Keegan, K. P., Glass, E. M., & Meyer, F. (2016). MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. In *Microbial environmental genomics (MEG)* (pp. 207-233). Humana Press, New York, NY.

Knights, D., Costello, E. K., & Knight, R. (2011). Supervised classification of human microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 35(2), 343-359.

Kuhn, M. (2008). Building predictive models in R using the caret package. *Journal of statistical software*, 28(1), 1-26.

Lee, D. J., Liu, X., & Weng, H. L. (2014). Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm. *Bioresource technology*, 156, 14-19.

Li, X., Dai, L., Zhang, C., Zeng, G., Liu, Y., Zhou, C., ... & Lan, S. (2017). Enhanced biological stabilization of heavy metals in sediment using immobilized sulfate reducing bacteria beads with inner cohesive nutrient. *Journal of hazardous materials*, 324, 340-347.

Liu F, Yan J, Wang W, Liu J, Li J et al (2020) Scalable skin lesion multi-classification recognition system. *Comput Mater Contin* 62(2):801–816

Lv, M., Du, M., Li, X., Yue, Y., & Chen, X. (2019). Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X65 steel in seawater containing sulfate-reducing bacteria and iron-oxidizing bacteria. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(5), 4066-4078.

Moitinho-Silva, L., Steinert, G., Nielsen, S., Hardoim, C. C., Wu, Y. C., McCormack, G. P., ... & Hentschel, U. (2017). Predicting the HMA-LMA status in marine sponges by machine learning. *Frontiers in microbiology*, 8, 752.

Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 441-454.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G. (2010). Microbial diversity and soil functions. *European Journal Soil Science*. 54,655–670.

Pandith, V., Kour, H., Singh, S., Manhas, J., & Sharma, V. (2020). Performance evaluation of machine learning techniques for mustard crop yield prediction from soil analysis. *Journal of Scientific Research*, 64(2).

Pannekens, M., Kroll, L., Müller, H., Mbow, F. T., & Meckenstock, R. U. (2019). Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *New biotechnology*, 49, 1-9.

Parks, D. H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P. A., Woodcroft, B. J., Evans, P. N., ... & Tyson, G. W. (2017). Recovery of nearly 8,000 metagenome-

assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature microbiology*, 2(11), 1533-1542.

Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607-5612

Pasolli, E., Truong, D. T., Malik, F., Waldron, L., & Segata, N. (2016). Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: tools and biological insights. *PLoS computational biology*, 12(7), e1004977.

Peters A, Hothorn T (2013) ipred: Improved Predictors, version 0.9–3. R package. Available: <http://CRAN.R-project.org/package=ipred>.

Petrof, E. O., Claud, E. C., Gloor, G. B., & Allen-Vercoe, E. (2013). Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine?. *Beneficial microbes*, 4(1), 53-65.

Planckaert, M. (2005). Oil reservoirs and oil production. *Petroleum microbiology*, 1-19.

Plugge, C. M., Balk, M., & Stams, A. J. (2002). *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-oxidizing, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 391-399.

Rabus, R., Venceslau, S. S., Woehlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D., & Pereira, I. A. (2015). A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Advances in microbial physiology*, 66, 55-321.

Rahman, S. F., Olm, M. R., Morowitz, M. J., & Banfield, J. F. (2018). Machine learning leveraging genomes from metagenomes identifies influential antibiotic resistance genes in the infant gut microbiome. *MSystems*, 3(1), e00123-17.

Reiff, C., & Kelly, D. (2010). Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International journal of medical microbiology*, 300(1), 25-33.

Robinson, C. M., & Pfeiffer, J. K. (2014). Viruses and the microbiota. *Annual review of virology*, 1, 55-69.

Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., ... & Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(7695), 210-215.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Saitou, N. (2018). Prokaryote Genomes. In *Introduction to Evolutionary Genomics* (pp. 201-220). Springer, Cham.

Santos, J. C., Lopes, D. R. G., Da Silva, J. D., De Oliveira, M. D., Dias, R. S., Lima, H. S., ... & da Silva, C. C. (2020). Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *151*, 104966.

Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, *41*, 850-861.

Sunde, E., & Torsvik, T. (2005). Microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. In B. Ollivier, & M. Magot (Eds.), *Petroleum microbiology* (pp. 201–214). Washington, DC: ASM Press.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, *24*(8), 1596-1599.

Therneau, T. M., Atkinson, B., & Ripley, M. B. (2010). The rpart package. *R Foundation for Statistical Computing: Oxford, UK*.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, *25*(24), 4876-4882.

Tiburcio, S. R. G., Macrae, A., Peixoto, R. S., da Costa Rachid, C. T. C., Mansoldo, F. R. P., Alviano, D. S., ... & Vermelho, A. B. (2021). Sulphate-reducing bacterial community structure from produced water of the Periquito and Galo de Campina onshore oilfields in Brazil. *Scientific reports*, *11*(1), 1-11.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, *449*(7164), 804-810.

Wang, W., & Lu, Y. (2018, March). Analysis of the mean absolute error (MAE) and the root mean square error (RMSE) in assessing rounding model. In *IOP conference series: materials science and engineering* (Vol. 324, No. 1, p. 012049). IOP Publishing.

Xie, K., Guo, L., Bai, Y., Liu, W., Yan, J., & Bucher, M. (2019). Microbiomics and plant health: an interdisciplinary and international workshop on the plant microbiome. *Molecular plant*, *12*(1), 1-3.

Yu, L., Zhao, J., & Gao, L. (2018). Predicting potential drugs for breast cancer based on miRNA and tissue specificity. *International journal of biological sciences*, *14*(8), 971.

Zhang, Y., Jiang, H., Ye, T., & Juhas, M. (2021). Deep Learning for Imaging and Detection of Microorganisms. *Trends in Microbiology*.

Zhou, Q., Zhou, H., Zhou, Q., Yang, F., & Luo, L. (2014). Structure damage detection based on random forest recursive feature elimination. *Mechanical Systems and Signal Processing*, 46(1), 82-90.

CAPÍTULO 4: Efeito corretivo e preventivo do uso do THPS sobre a comunidade planctônica e sésil de cultura mista proveniente da indústria de petróleo.

1. Introdução

A corrosão de componentes metálicos tem representado um sério risco para a estrutura física de diversos setores industriais (Zain et al., 2018; Plaza et al., 2020). Quando há a participação de microrganismos, o processo de corrosão é conhecido como Microbiologically Influenced Corrosion (MIC), que pode ser dividido em biocorrosão direta e indireta. O processo indireto ocorre quando há a biocorrosão química (CMIC), e consiste na reação do sulfeto de hidrogênio (H_2S) biogênico com o ferro metálico (Fe^0) presente em ligas metálicas, resultando na precipitação de sulfetos de ferro. Enquanto o processo direto, ocorre quando há a biocorrosão elétrica (EMIC), e está relacionado com a utilização de Fe^0 como doador de elétrons por microrganismos litotróficos (Enning e Garrelfs, 2014).

Na indústria do petróleo, os procariotos redutores de sulfato (PRS) têm sido um dos principais agentes responsáveis pelo processo de biocorrosão de componentes metálicos. As características físico-químicas desses ambientes favorecem a colonização e atividade metabólica desse grupo, uma vez que são majoritariamente anóxicos e possuem elevada concentração de sulfato, proveniente principalmente da injeção de água do mar (Enning e Garrelfs, 2014). Os PRS são compostos por um grupo polifilético e metabolicamente diverso, que tem como principal característica a utilização do sulfato como acceptor final na cadeia transportadora de elétrons, gerando o H_2S . Eles podem viver tanto na forma livre (células planctônicas), quanto formar complexas comunidades aderidas a superfícies (biofilmes) (Cordas et al., 2008; Dall'agnol et al., 2014).

Biofilmes são estruturas complexas compostas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS); ecologicamente, a formação de biofilme traz importantes vantagens para os microrganismos que o compõe, como a proteção contra compostos antimicrobianos, facilita as interações com outros microrganismos, além de permitir a aderência às superfícies (Dang e Lovell 2016). Assim, para os PRS, o crescimento na forma de biofilme é extremamente benéfico, entretanto, para a indústria, o acúmulo de biofilmes representa um problema operacional, além de acelerar a deterioração dos materiais metálicos.

Além dos problemas relacionados com a biocorrosão, os PRS estão relacionados com diversos outros problemas econômicos, operacionais e ambientais, como: i) bioincrustação (*biofouling*) das tubulações, acarretando na diminuição do fluxo de petróleo nos dutos, elevando com isso os gastos de energia para bombeamento e o desgaste de equipamentos (Gieg et al., 2011), ii) acidulação biogênica (*souring*) dos reservatórios de petróleo, que consiste no aumento da concentração de compostos de enxofre no petróleo e no gás, principalmente o H₂S, que resulta na perda de qualidade do óleo e gás recuperados (Elmawgoud et al., 2015); e iii) produção de elevadas quantidades de H₂S, que é um gás altamente tóxico, corrosivo e inflamável, o que gera problemas de segurança e risco à saúde dos trabalhadores (Reiffenstein et al., 1992, Tang et al., 2009; Johnson et al., 2017). Mediante à essas problemáticas, a presença dos PRS vem elevando as despesas operacionais da exploração do petróleo e derivados, e só o custo de substituição da tubulação devido à biocorrosão pode chegar em até \$ 250 milhões de dólares por ano. Devido a esse impacto econômico e operacional proveniente da MIC, torna-se de fundamental importância encontrar alternativas para mitigar consideravelmente esse processo (Bhola et al., 2014; Zain et al., 2018).

Como forma de controle dos PRS, as indústrias petrolíferas aplicam diferentes medidas, como: i) dessulfatação da água de injeção; neste processo, a água do mar é filtrada em membranas de nanofiltração que reduzem a concentração de SO₄²⁻ antes de ser injetada nos reservatórios, reduzindo para valores menores que 0,5 mM (Gieg et al., 2011); ii) adição de nitrito (NO₂⁻) ou nitrato (NO₃⁻), esses compostos servem como aceptores finais de elétrons para microrganismos que competem com os PRS por fontes de elétrons, que pode resultar na exclusão competitiva dos PRS (Davidova et al., 2001; Dolfing e Hubert, 2017); iii) adição do inibidor metabólico MoO₄²⁻, esse composto entra na célula pelo sistema de transporte do sulfato e interfere com a formação de adenosina fosfosulfato (APS) (Patidar e Tare, 2005; Greene et al., 2006); e iv) utilização de biocidas, que ainda vem sendo a metodologia mais eficiente para o controle desse grupo (Gieg et al., 2011; Campbell 2017).

O Tetrakis Hidroximetil Fosfônico Sulfato (THPS) é um dos biocidas disponíveis no mercado. O THPS pode ser dissociado em trishidroximetil fosfina (THP⁺) e sulfato, em condições anaeróbicas (Kahrilas et al. 2014; Sharma et al., 2018). O THP⁺ apresenta meia vida de 21,2 dias em pH = 7, se mostrando estável nesse valor de pH, porém, é rapidamente degradado em pH alcalinos (James and Lorenzini

2010; Kahrilas et al. 2014; Sharma et al., 2018). É um biocida de amplo espectro, sendo que o principal mecanismo de ação consiste no rompimento da integridade da membrana celular, o THP⁺ tem a capacidade de quebrar as ligações enxofre-enxofre em aminoácidos (Zhao et al., 2008; Jones et al. 2012, Sharma et al., 2018). Atualmente, este é um dos biocidas amplamente utilizado pela indústria de petróleo e gás (Jones et al. 2012; Campbell 2017). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito, corretivo e preventivo, da aplicação de THPS em impedir ou retardar o desenvolvimento da comunidade planctônica e do biofilme de cultura mista proveniente de plataformas de extração de petróleo.

2. Material e métodos

2.1. Montagem dos microcosmos

Em ambos os experimentos, foi realizado a montagem do microcosmos em tubos de penicilina (50mL) com o meio de cultivo Postgate E (sem ferro) e utilizando água de produção como inóculo (10% v/v), incubados a 30 °C em condição estática. Para o crescimento do biofilme, quatro cupons de aço 1100 de 6 cm² (3 cm × 1 cm) foram adicionados em cada tubo. O produto biocida utilizado foi DORF OG304B (THPS 68 % m/v) na concentração de 200 ppm. Foi realizado dois tipos de tratamento, usando diferentes metodologias de aplicação do biocida, sendo eles o tratamento para o efeito corretivo e o efeito preventivo.

Com o intuito de avaliar a capacidade de ação do THPS sobre uma comunidade planctônica já pré-estabelecida e eliminação de biofilmes já formados, foi realizado o experimento corretivo. Nesse tratamento a amostragem, tanto da comunidade planctônica quanto do biofilme, foi realizada com 3, 5, 7 e 9 dias de incubação do microcosmo. A aplicação do biocida foi efetuada em cada um dos dias de amostragem, e as análises foram realizadas após 4 e 24 h de exposição da comunidade microbiana ao biocida, sendo esses tempos já utilizados para monitoramento da efetividade do tratamento com biocidas no contexto da indústria de petróleo.

Com o intuito de avaliar a capacidade do THPS de impedir ou retardar o desenvolvimento da comunidade e a conseqüente formação de biofilmes, foi realizado o experimento preventivo. Nesse experimento o período de amostragem foi o mesmo que do experimento anterior (3, 5, 7 e 9 dias após a incubação). Entretanto, nessa etapa, a aplicação do biocida foi realizada somente no primeiro dia de incubação.

Em ambos os experimentos, todas as análises foram realizadas em triplicata e frascos sem a adição do biocida foram mantidos como tratamento controle.

2.2. Quantificação do sulfeto de hidrogênio

Para quantificação do sulfeto dissolvido nas amostras, 1,0 ml de cada uma das amostras coletadas sob os diferentes tratamentos foi adicionado a mistura de 50 ml de NaOH 1,0 M e 5,0 ml de NH₄OH concentrado. A titulação potenciométrica foi realizada no equipamento Titulador Compacto G10S (Mettler Toledo, Columbus, Estados Unidos) usando o AgNO₃ 0,01 M como titulante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3. Sequenciamento e processamento dos dados

Para avaliar a composição da comunidade microbiana nos tratamentos do efeito corretivo e preventivo do uso do biocida, o DNA total das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2010) com modificações, para as células planctônicas e do biofilme, em triplicata. O DNA extraído foi enviado para sequenciamento de amplicon para as regiões variáveis V3 e V4 do gene 16S RNAr, usando os primers 338F (Whiteley et. al., 2000) e 806R (Caporaso et. al., 2011), na empresa Novogene (<http://www.novogene.com/>) pela plataforma Illumina MiSeq paired-end.

O resultado do sequenciamento foi processado utilizando o ambiente R (*version* 4.0), o pacote DADA2 (*version* 1.18.) foi utilizado para filtrar as *reads* de baixa qualidade. Um modelo de erro foi utilizado para realizar a inferência das *Amplicon sequence variant* (ASV) (Callahan et al., 2017). As *reads forward* e *reverse* foram *merged* e as quimeras removidas. O banco de dados Silva versão 138 (<http://www.arb-silva.de>) foi utilizado para afiliar taxonomia.

2.4. Análises de bioinformática e estatística

Para visualizar a dissimilaridade entre as amostras foi realizado o *Principal Coordinates Analysis* (PCoA), usando a matriz de dissimilaridade Bray-Curtis como base para a ordenação dos dados em 2 dimensões. Para verificar a separação dos gru-

pos no PCoA, a *Permutational Multivariate Analysis of Variance* (PERMANOVA) foi realizado. Para a mensuração da diversidade foram avaliados 3 diferentes índices, sendo eles Shannon, Richness e Simpson. As diferenças da abundância das ASV entre as amostras foram testadas usando Kruskal-Wallis e o p -valor ajustado por FDR. Todas as análises estatísticas foram realizadas no R (*version 4.0*) (R core team, 2021) com o suporte dos pacotes Vegan (Oksanen et al., 2013), McToolsR e Phyloseq (McMurdie et al., 2013). Para a inferência de interações ecológicas foi realizado a construção de 4 redes de co-ocorrência usando FlashWeave (Tackmann et al., 2019) implementado na linguagem de programação Julia, sendo elas 2 redes (planctônica e biofilme) para o efeito preventivo da aplicação do THPS, e 2 para o efeito corretivo (planctônica e biofilme). Para realizar a clusterização da rede, *Microbial association network clustering algorithm* (MANTA) foi utilizado (GitHub - ramellose/manta: microbial association network clustering algorithm). Para identificar padrões de interações não randômicos, únicos e conservados o algoritmo ANURAN foi utilizado (GitHub - ramellose/anuran: Toolbox for identification of non-random associations).

3. Resultados

3.1. Efeito preventivo da aplicação do THPS

O pico de produção de H_2S foi observado no controle após 3 dias de incubação, atingindo a concentração de 633,6 ($\pm 22,7$) ppm. Durante todo o período de incubação, a aplicação do biocida foi eficaz no controle da produção de H_2S , uma vez que, as amostras do tratamento tiveram uma redução significativa de produção de H_2S , quando comparadas com as amostras controle, sendo essa diferença, em média, de 480 ppm (Figura 1).

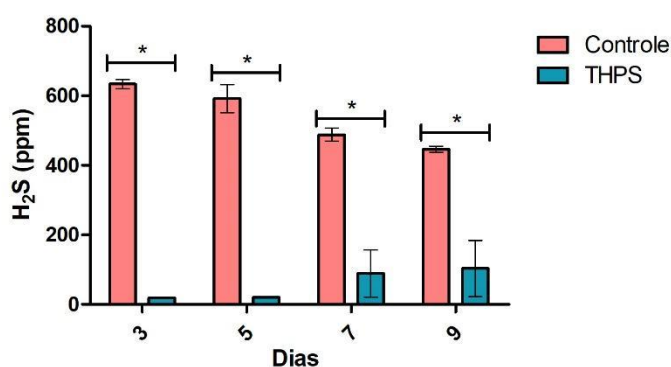


Figura 1. Quantificação de H₂S por titulação potenciométrica de amostras do tratamento preventivo, sem biocida (controle) e com biocida, THPS 200 ppm (tratamento). (*) representa diferença significativa entre as amostras (p -valor < 0.05).

É possível observar que a estrutura da comunidade bacteriana, tanto planctônica quanto do biofilme, mostrou-se significativamente dissimilar ($p < 0.05$) entre as amostras do controle e tratadas com THPS (Figura 2). Avaliando os diferentes dias de coleta, podemos observar que há uma sucessão microbiana na comunidade ao longo de tempo, tanto para as amostras controle e tratamento. Na comunidade de células planctônicas, é possível observar que a sucessão microbiana converge para maior similaridade entre as amostras (Figura 2A), enquanto na comunidade do biofilme não observamos esse fenômeno (Figura 2B).

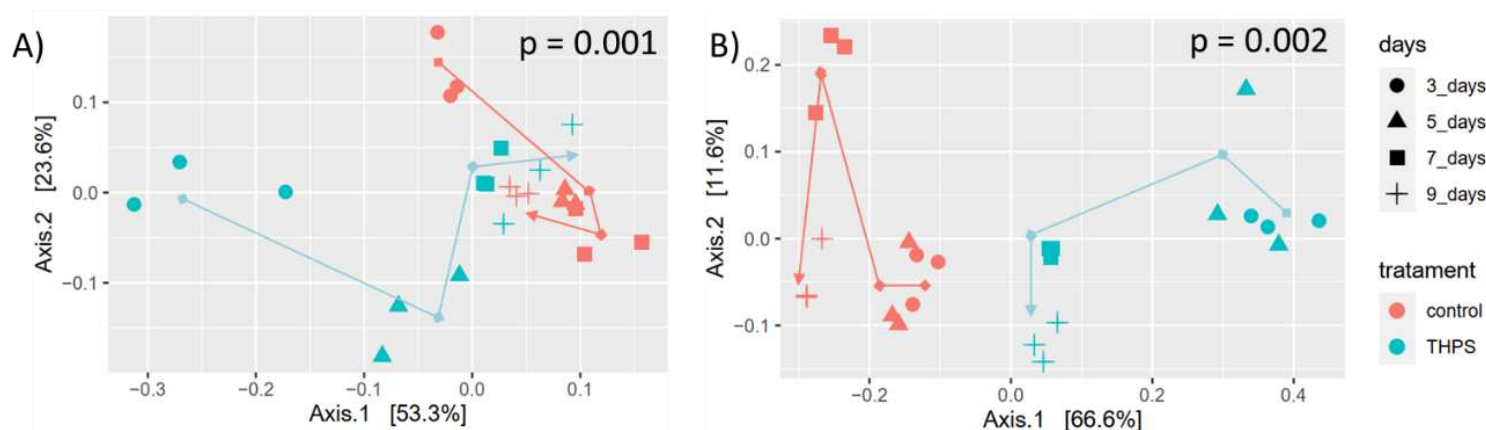


Figura 2. Análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis utilizando amostra de água de produção enriquecida para PRS sem tratamento (Controle) e tratada com biocida (THPS). Cada símbolo representa diferentes dias de incubação, sendo ● 3 dias, ▲ 5 dias, ■ 7 dias e + 9 dias. **A)** Amostras referentes a células planctônicas; **B)** Amostras referentes a células do biofilme.

A inferência do efeito do THPS na diversidade da comunidade bacteriana foi feita pela avaliação de 3 índices de diversidade, sendo eles Shannon, Richness e Simpson. A resposta da diversidade da comunidade bacteriana frente a exposição ao biocida foi a mesma para todos os índices avaliados. De forma geral, o contato do biocida com a comunidade bacteriana resultou no decaimento da diversidade, principalmente nos primeiros dias de análise (Figura 3). Com o avanço no estabele-

cimento da comunidade, é possível observar que o impacto negativo do biocida na diversidade é reduzido, tanto para as células planctônicas (Figura 3A) quanto para o biofilme (Figura 3B), fato que também pode ser observado na similaridade entre as amostras baseando-se na estrutura da comunidade bacteriana (Figura 2).

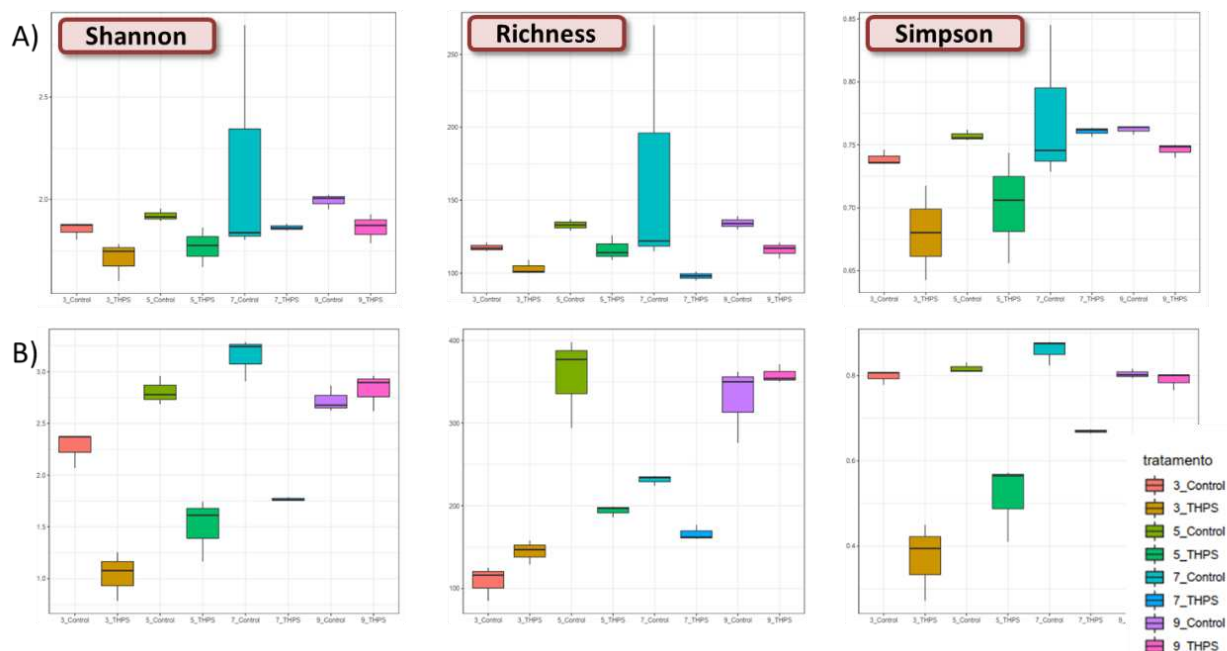


Figura 3. Índices de diversidade das amostras de água de produção enriquecida para PRS sem tratamento (Controle) e tratada com biocida (THPS). **A)** Amostras referentes a células planctônicas; **B)** Amostras referentes a células do biofilme.

A composição da comunidade bacteriana foi similar entre todas as amostras (controle e tratamento), tanto para as células planctônicas, quanto para as células do biofilme (Figura 4), ao longo de todos os dias avaliados. Ao avaliar os filos bacterianos, é possível observar a dominância de 3 em todas as amostras, sendo estes Firmicutes, Bacteroidetes e Synergistetes (Figura 3A). Quando aprofundamos o nível taxonômico para gênero, observa-se que também há a dominância dos mesmos gêneros em todas as amostras, sendo eles *Anaerophaga*, *Dethiosulfovibrio*, *Paranaledivibacter* e gêneros ainda desconhecidos e não cultivados (Figura 3B). Apesar dos gêneros mais abundantes serem os mesmos em todas as amostras, é possível observar que a aplicação do THPS foi responsável pela diminuição significativa na abundância de *Anaerophaga*, em contrapartida, provocou o enriquecimento de *Dethiosulfovibrio*, sendo esse efeito mais acentuado na comunidade do biofilme.

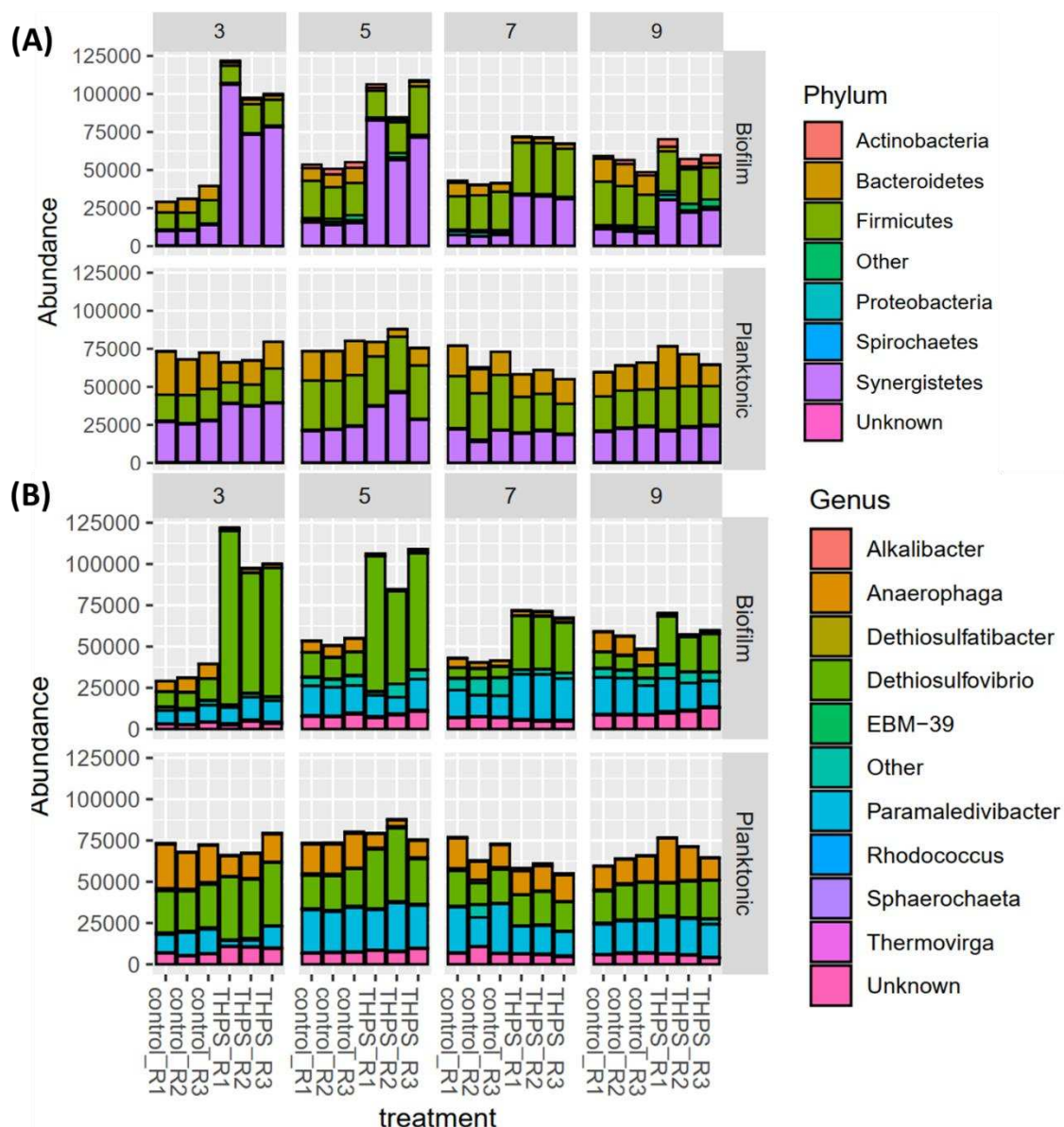


Figura 4. Abundância absoluta dos microrganismos mais representativos nas amostras de água de produção enriquecida para PRS sem tratamento (Controle) e tratada com biocida (THPS), em diferentes dias de incubação (3, 5, 7 e 9). **A)** Abundância absoluta dos filos bacterianos; **B)** Abundância absoluta dos gêneros bacterianos.

Com o intuito de avaliar as interações ecológicas entre as ASV que compõe a comunidade, foi avaliada as redes de co-ocorrência (Figura 5). A rede construída com a comunidade de células planctônicas apresentou o número de 150 nós e 164 arestas. Dentre essas 21 interações são de caráter negativo, enquanto 143 foram interações positivas. Apesar da existência de interações entre os microrganismos que compõe essa comunidade, essa rede não apresentou interações suficientes para o cálculo de *clusters* (Figura 5A). Já a rede para a comunidade bacteriana do bio-

filme apresentou 340 nós e 1596 arestas, sendo 360 interações de caráter negativo, enquanto 1236 foram interações positivas (Figura 5B).

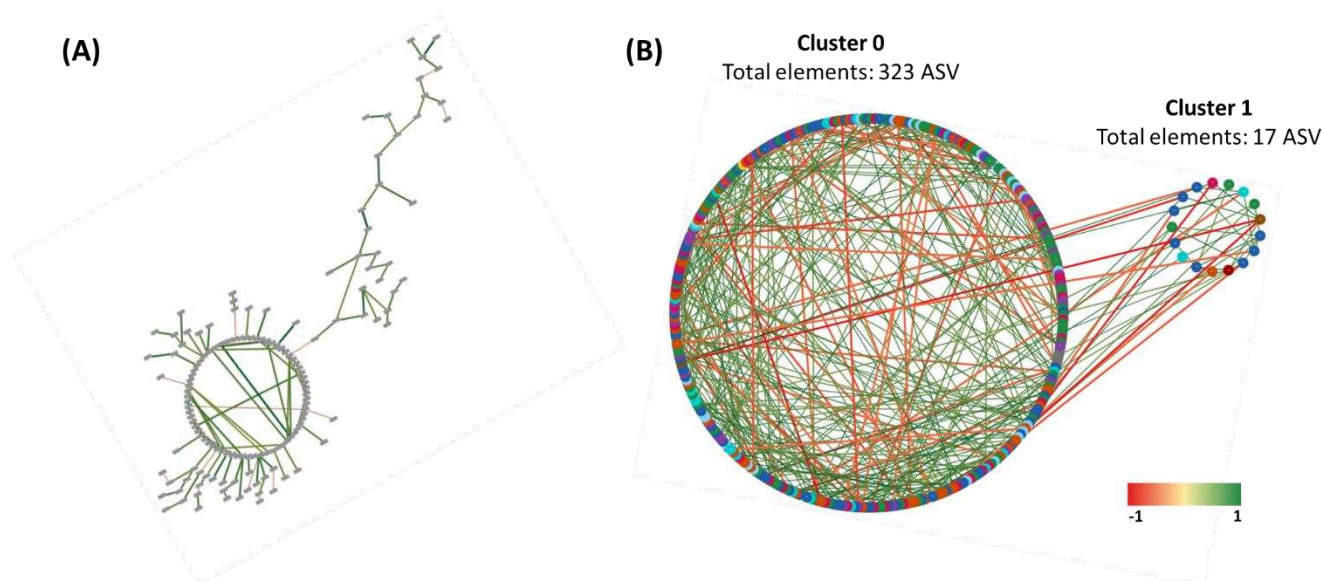


Figura 5. Rede de co-ocorrência para inferência das interações microbianas, os clusters representam táxons que podem apresentar resposta diferencial a estímulos ambientais. O 1 representa as interações completamente positivas e -1 interações completamente negativas. **A)** Comunidade de células planctônicas e **B)** Comunidade de células do biofilme.

Para a rede de co-ocorrência da comunidade do biofilme foi observado a formação de 1 *cluster* composto por 17 ASV (Figura 5B). Essas ASV estavam compreendidas em 7 diferentes filos, sendo eles os filos Actinobacteria, Patescibacteria, Proteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidetes e Fusobacteria (Tabela 1). Entretanto, nenhum dos filos pertencentes ao *cluster* tiveram a sua abundância significativamente enriquecida/depletada para essa rede.

Tabela 1. Análise de enriquecimento/depleção para avaliar quais os filos foram significativamente alterados entre os clusters gerados na rede de co-ocorrência.

Phylum	Cluster 1	Cluster 0	p-value
--------	-----------	-----------	---------

Actinobacteria	8	71	0.076
Patescibacteria	1	0	0.052
Proteobacteria	1	53	0.933
Chloroflexi	2	19	0.304
Firmicutes	3	70	0.719
Bacteroidetes	1	36	0.851
Fusobacteria	1	1	0.102

3.2. Efeito corretivo da aplicação do THPS

No efeito corretivo, a produção de H₂S se diferenciou ($p < 0.05$) entre o controle e tratamento somente no quinto dia de análise, com redução de, em média, 222.9 ppm de H₂S produzido entre os tratamentos com 4 e 24 horas. Com 3 dias de incubação, observou-se a maior concentração de H₂S tanto no controle quanto no tratamento com 4 e 24 horas, apresentando a concentração de 540.9 (± 34.7), 546.4 (± 21.9) e 491.7 (± 40.4) ppm, respectivamente, evidenciando a maior atividade metabólica dos PRS nesse ponto. Enquanto com 7 e 9 dias de incubação, os tratamentos com biocida apresentaram concentrações de H₂S similares aos controles, indicando estabilidade entre as amostras (Figura 6).

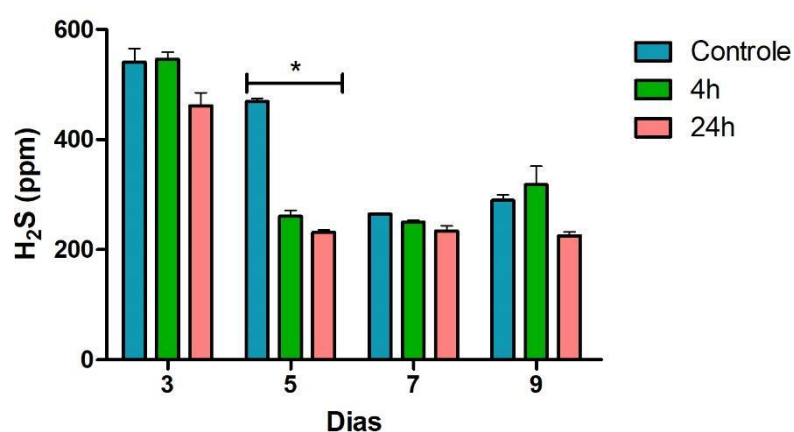


Figura 6. Quantificação de sulfeto de hidrogênio (H₂S) por titulação potenciométrica de amostras do tratamento corretivo, sem biocida (controle) e com biocida THPS 200 ppm após 4 e 24 h. (*) representa diferença significativa entre as amostras (p -valor < 0.05).

Em termos de similaridade entre amostras, pode ser observado que a estrutura da comunidade bacteriana se diferenciou significativamente entre os tratamentos (Controle, 4h e 24h de exposição ao THPS), bem como entre os dias de coleta, o que demonstrou que há uma sucessão de espécies, ao longo dos dias, dentro de cada um dos tratamentos, efeito que também foi observado no tratamento preventivo (Figura 7). Na comunidade planctônica vemos que o efeito do THPS foi acentuado nos primeiros dias do estabelecimento da comunidade, pois houve maior dissimilaridade entre as amostras do controle e das amostras de tratamento (4h e 24h). Já nos últimos dias, quando a comunidade já está mais estruturada, o efeito do THPS foi quase imperceptível em termos de composição da comunidade bacteriana, pois todas as amostras convergiram para um mesmo ponto (Figura 7A). Para a comunidade do biofilme, o padrão de resposta foi exatamente o mesmo encontrado para a comunidade planctônica (Figura 7B).

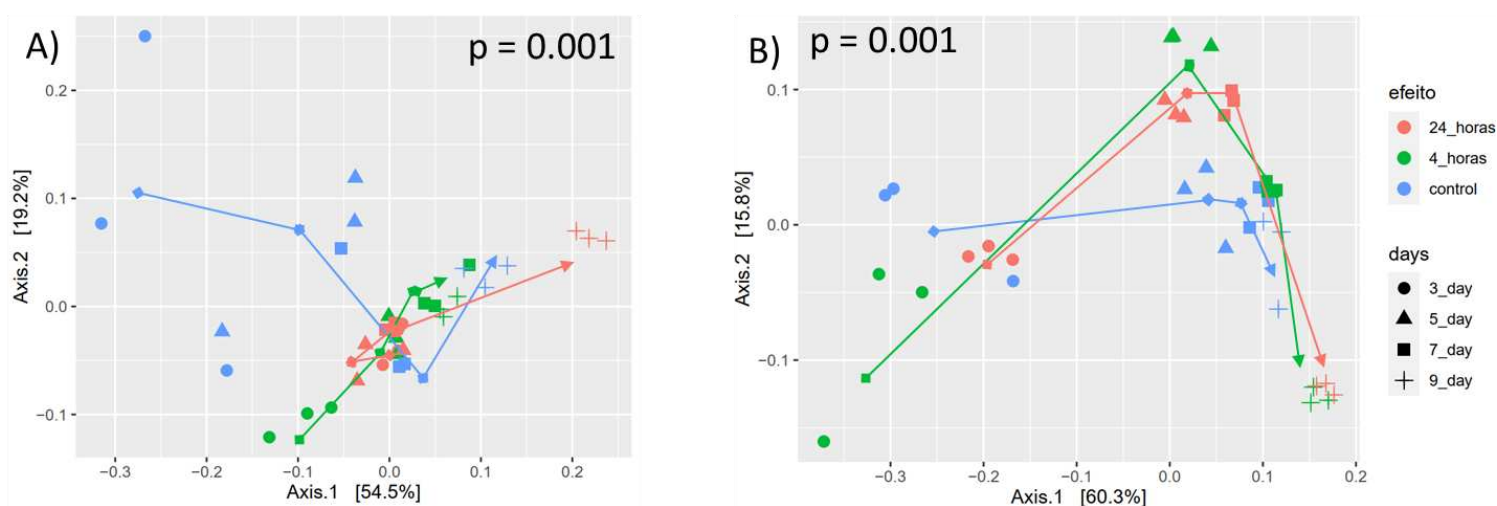


Figura 7. Análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis utilizando amostra de água de produção enriquecida para PRS sem tratamento (Controle) e tratada com o biocida THPS por 4 horas (4 hours) e 24 horas (24 hours). Cada símbolo representa diferentes dias de incubação, sendo ● 3 dias, ▲ 5 dias, ■ 7 dias e + 9 dias. **A)** Amostras referentes a células planctônicas; **B)** Amostras referentes a células do biofilme.

Em termos de diversidade microbiana, para a comunidade planctônica, assim como encontrado no tratamento preventivo, foi possível observar que as amostras

do controle apresentaram maior diversidade em detrimento as amostras dos tratamentos, porém, essa diferença só foi significativa para os índices Simpson e Shannon, nos dias 3 e 5 de coletas (Figura 8A). Já para as amostras da comunidade do biofilme, pode ser observado uma elevação na diversidade bacteriana das amostras do tratamento, nos primeiros dias, superando até as amostras do controle (Figura 8B).

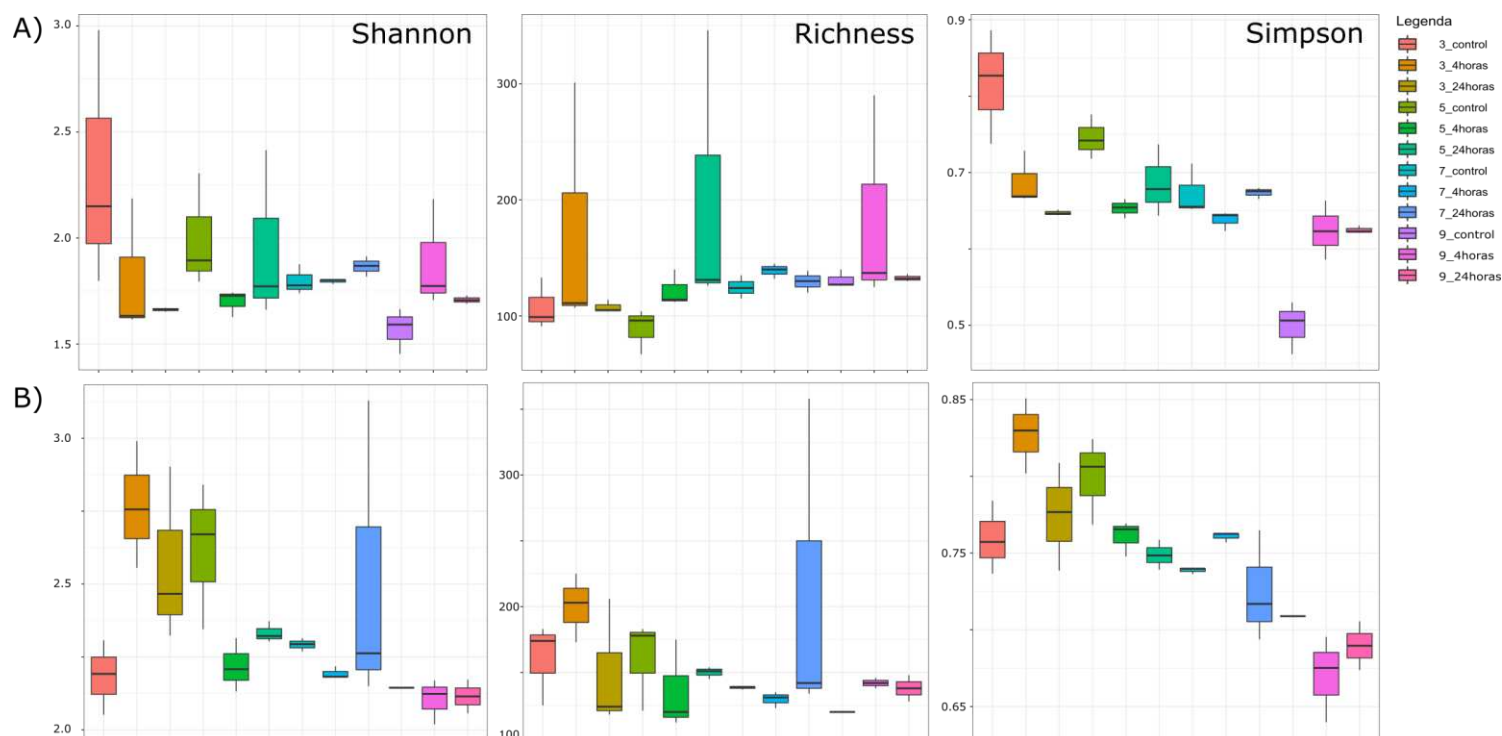


Figura 8. Índices de diversidade das amostras de água de produção enriquecida para PRS sem tratamento (Controle) e tratada com o biocida THPS por 4 horas (4 hours) e 24 horas (24 hours). **A)** Amostras referentes a células planctônicas; **B)** Amostras referentes a células do biofilme.

A composição da comunidade bacteriana foi a similar a encontrada no tratamento preventivo, em nível de filo e de gênero. Foi observado a dominância de 3 filios, Bacteroidetes, Firmicutes e Synergistetes, sendo estes os filios mais abundantes entre todas as amostras e ao longo de todo o período avaliado (Figura 9A). Para gênero, foi observado a dominância de *Anaerophaga*, *Dethiosulfovibrio* e gêneros ainda desconhecidos, sendo estes os gêneros mais abundantes entre todas as amostras e ao longo de todo o período avaliado (Figura 9B). Da mesma forma que ocorreu com

o efeito preventivo, aqui também é possível observar que a aplicação de THPS acarretou a alteração das proporções dos gêneros *Anaerophaga* e *Dethiosulfovibrio* nas amostras, provocando a depleção de *Anaerophaga* e o enriquecimento de *Dethiosulfovibrio* nas amostras de tratamento, principalmente na comunidade do biofilme (Figura 9B).

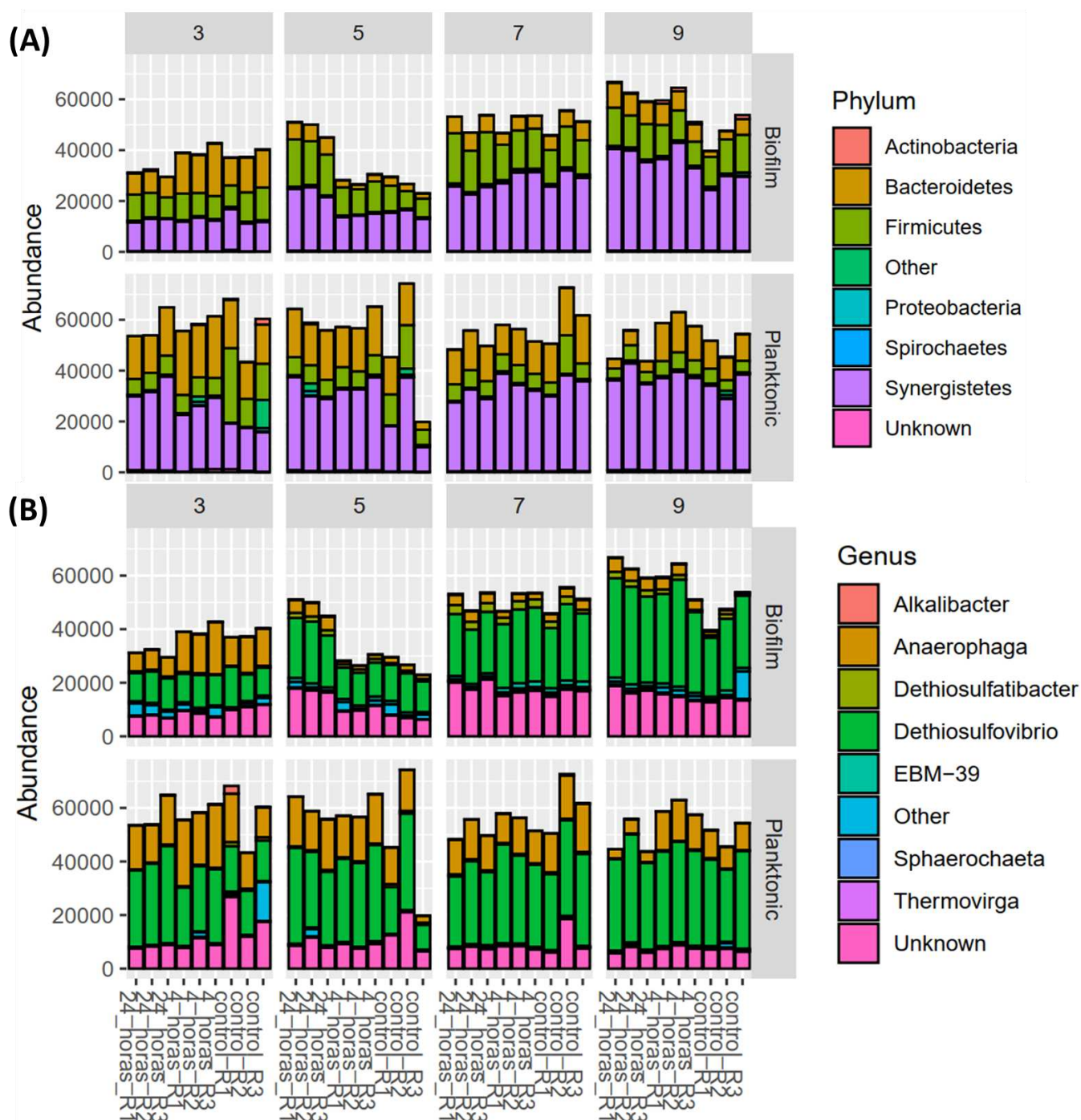


Figura 9. Abundância absoluta dos microrganismos mais representativos nas amostras de água de produção enriquecida para PRS sem tratamento (Controle) e tratada

com o biocida THPS por 4 horas (4 hours) e 24 horas (24 hours), em diferentes dias de incubação (3, 5, 7 e 9). **A)** Abundância absoluta dos filós bacterianos; **B)** Abundância absoluta dos gêneros bacterianos.

Para inferência das interações ecológicas entre as ASV que compõe a comunidade planctônica e do biofilme, foram avaliadas as redes de co-ocorrência (Figura 10). A rede construída com a comunidade de células planctônicas apresentou o número de 192 nós, que representaram as ASV, e 841 arestas, que representaram as interações entre as ASV. Dentre essas, 140 interações foram de caráter negativo, enquanto 701 foram interações positivas. (Figura 10A). Já a rede para a comunidade bacteriana do biofilme apresentou 203 nós e 1149 arestas, das quais 82 interações foram de caráter negativo, enquanto 1067 foram interações positivas (Figura 10B).

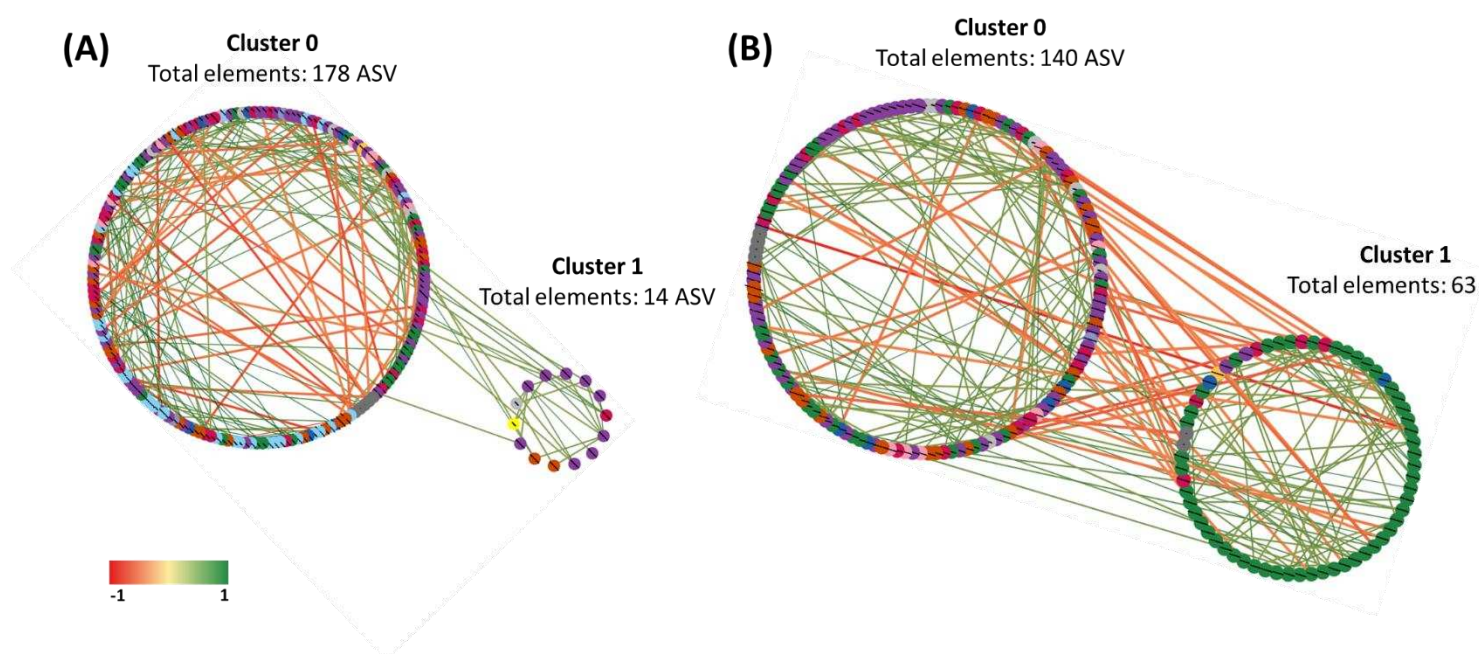


Figura 10. Rede de co-ocorrência para inferência das interações microbianas, os clusters representam táxons que podem apresentar resposta diferencial a estímulos ambientais. O 1 representa as interações completamente positivas e -1 interações completamente negativas. **A)** Comunidade planctônica; **B)** Comunidade do biofilme.

Foi observado a formação de *cluster* tanto para as redes de co-ocorrência da comunidade planctônica, quanto para a do biofilme (Figura 10). O *cluster* formado

para a rede da comunidade planctônica foi composto de 14 ASV. Essas ASV estavam compreendidas em 4 diferentes filos, Synergistetes, Proteobacteria, Bacteroidetes e filos não classificados taxonomicamente (Tabela 2); porém, nenhum dos filos pertencentes a esse *cluster* tiveram a sua abundância significativamente enriquecida/depletada para essa rede. Já para a rede da comunidade do biofilme, o *cluster* foi composto por 63 ASV, distribuídas em 5 diferentes filos, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Synergistetes e Tenericutes (Tabela 2). Dentre todos esses filos, Firmicutes teve sua abundância significativamente enriquecida ($p = 1.7e^{-07}$) dentro do cluster.

Tabela 2. Análise de enriquecimento/depleção para avaliar quais os filos foram significativamente alterados entre os clusters gerados na rede de co-ocorrência para células planctônicas e do biofilme.

	<i>Phylum</i>	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 0</i>	<i>p-value</i>
Planctônica	Synergistetes	9	49	0.05
	Bacteroidetes	1	26	0.870
	NA	2	5	0.100
	Proteobacteria	2	22	0.552
Biofilme	Firmicutes	51	27	1.714e-07
	Bacteroidetes	5	16	0.824
	Actinobacteria	2	5	0.694
	Synergistetes	2	52	1
	Tenericutes	1	0	0.313

NA: filos não classificados taxonomicamente

Ao avaliar a abundância das ASV compreendidas pelo *cluster*, pertencentes ao Filo Firmicutes, foi possível observar elevada correlação entre a abundância dessas espécies e o estágio de desenvolvimento do biofilme. Quando foram analisadas todas as espécies pertencentes a esse grupo, não foi possível observar esse efeito, porém, ao selecionar e analisar somente as espécies incluídas no *cluster*, verificou-se que elas possuíram abundância elevada no terceiro e quinto dias de formação do biofilme e, após esses dias, há o decréscimo em sua abundância (Figura 11).

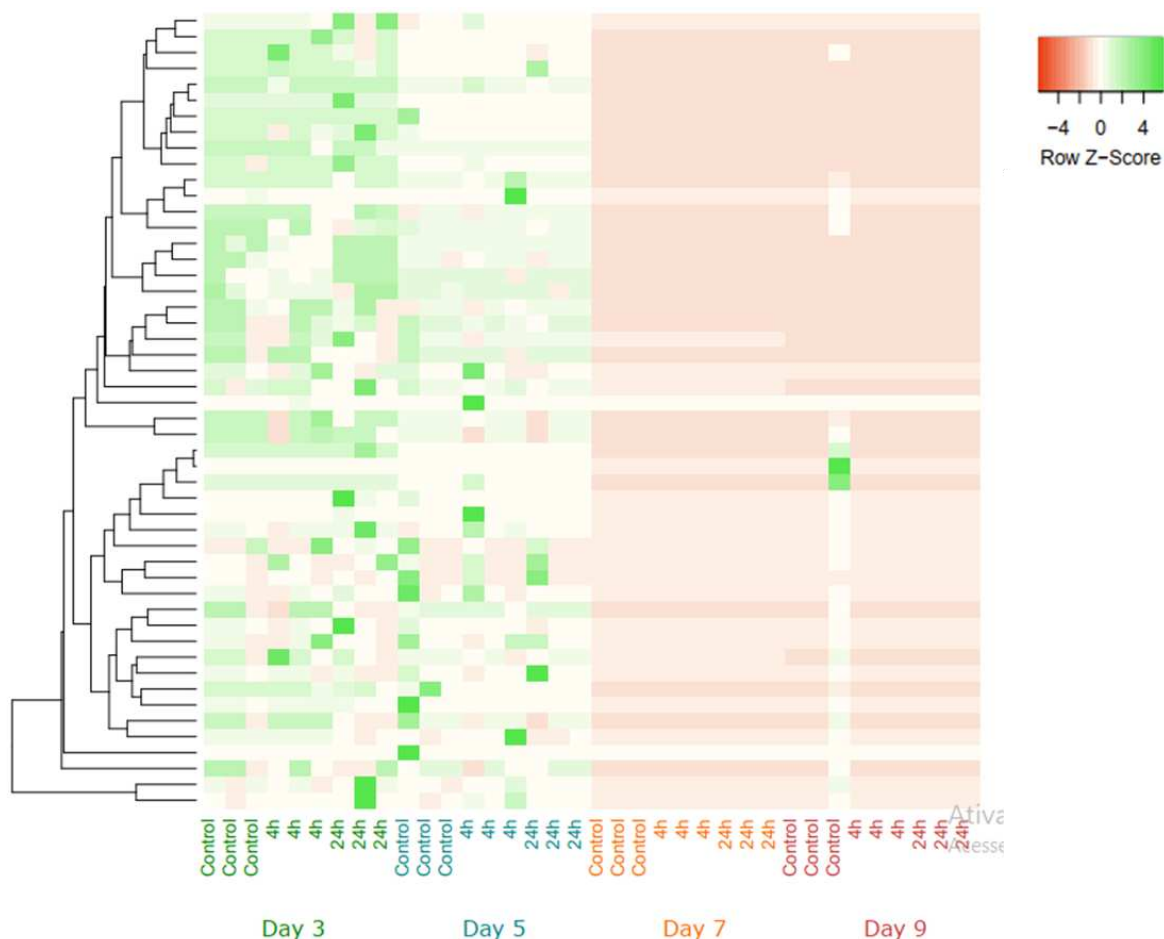


Figura 11. Heatmap demonstrando a variação na abundância, entre os diferentes dias de coleta (3, 5, 7 e 9), das ASV afiliadas ao filo Firmicutes que foram significativamente enriquecidas no *cluster* 1 na rede de co-ocorrência para células do biofilme.

4. Discussão

A compreensão do comportamento da comunidade microbiana frente a aplicação de um biocida é de fundamental importância para prever como o funcionamento do ecossistema responderá frente a esse estresse e, assim, conseguir planejar estratégias de controle da biocorrosão de forma eficiente. Neste trabalho, foi avaliado o impacto do uso do THPS em duas diferentes estratégias de aplicação, foi avaliada a capacidade de impedir ou retardar o desenvolvimento da comunidade em estágios iniciais de formação, bem como a capacidade de reduzir o crescimento da comunidade microbiana pré-formada.

Ao avaliar a composição taxonômica, não foi possível observar grande variação entre a comunidade planctônica e do biofilme, bem como entre os tratamentos preventivo e corretivo. Verificou-se a presença de poucas espécies, que foram do-

minantes nesse ambiente, mesmo mediante a aplicação do biocida. Esse resultado ressalta que o efeito do biocida não foi relacionado com a eliminação completa de determinados táxons, e sim com a depleção/enriquecimento, que culminou na alteração da proporção entre os microrganismos que compõem a comunidade do ambiente; entretanto esse efeito não foi claramente perceptível em níveis taxonômicos superiores, como por exemplo nos filos.

Apesar de não se observar grande variação taxonômica, em termos de metabolismo, a exposição ao THPS foi mais representativa. O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é o produto do metabolismo do grupo dos procariotos redutores de sulfato (PRS), sendo que esse gás é um dos crescentes desafios enfrentados pela indústria de petróleo e gás, uma vez que está relacionado com problemas de biocorrosão, *biofouling*, *souring*, além de colocar em risco a saúde dos operadores e do meio ambiente (Muyzer e Stams, 2008; Johnson, et al., 2017, Little et al., 2020). A produção de H_2S apresentou resposta diferencial entre os tratamentos, no tratamento preventivo, apesar de ser possível observar a elevação da produção de H_2S , ao longo do tempo, nas amostras com o biocida, a concentração final ainda foi menor que o controle, em todos os dias avaliados. Já no tratamento corretivo, houve uma discreta redução na produção de H_2S entre as amostras tratadas com o biocida e controle, sendo ela significativa somente para o quinto dia avaliado. Para a manutenção da comunidade microbiana presente nos ambientes relacionado aos campos de produção de petróleo, é necessário a realização de interações sinérgicas entre os microrganismos que o compõe, como os metanogênicos, acetogênicos, fermentativos e PRS, sendo essas interações um dos fatores para agravamento da biocorrosão (Li et al., 2017; Santos et al., 2022). Já vem sendo descrito que ambientes compostos por comunidade microbiana com alta diversidade e elevada interações entre espécies apresenta maior resistência a exposição a agentes estressores (Jia et al., 2017; Li et al., 2017). Esse pode ter sido um dos fatores para que o THPS tenha sido mais eficiente no controle da produção de H_2S na comunidade em estágios iniciais de formação, enquanto nas comunidades mais estruturadas, de forma geral, não foi observado o decaimento significativo da produção.

Ao avaliar a diversidade da comunidade planctônica, no tratamento preventivo, o impacto negativo do uso do THPS só foi observado nos estágios iniciais da formação da comunidade. Já no tratamento corretivo, esse efeito foi ainda mais sutil, sendo que, em alguns casos, foi possível observar maior diversidade nas amostras

do tratamento. Tal resultado também observado na similaridade da composição das amostras, onde se verificou o aumento da similaridade entre as amostras, com e sem a presença do biocida, nos estágios mais avançados do desenvolvimento da comunidade microbiana, tanto para o tratamento preventivo quanto para o corretivo, mostrando, novamente, a interferência do estágio de maturação que a comunidade se encontra para a eficiência da ação do biocida.

Células vivendo em biofilmes geralmente são mais resilientes frente a um estresse ambiental do que células planctônicas (Flemming et al., 2016). Ao avaliar comunidade do biofilme no tratamento preventivo, o padrão de resposta foi semelhante ao da comunidade planctônica, entretanto, para o tratamento corretivo foi observado que o THPS, no início, teve o efeito de elevar a diversidade bacteriana, mostrando uma possível indução da formação do biofilme nessas amostras. Os biofilmes são um mecanismo de sobrevivência para os microrganismos (Costerton, 2007; Flemming et al., 2016; Xu et al., 2022). Há trabalhos demonstrando que o controle da comunidade do biofilme requer concentrações de biocida até dez vezes maiores, quando comparada com a comunidade planctônica (Li et al., 2016; Xu et al., 2022). Isso ocorre porque o biofilme facilita cooperação social entre espécies, captura de recursos e maior sobrevivência após a exposição a substâncias tóxicas (Costerton, 2007; Flemming et al., 2016). Além da barreira física, as células do biofilme podem regular a expressão de genes que participam ativamente dos mecanismos que impedem a entrada dos biocidas nas células e alteração da atividade metabólica sob o estresse induzido (Lee et al., 2010).

Para além das vantagens adaptativas que o biofilme confere para as células que o compõem, permitindo assim maior resiliência da comunidade frente a exposição aos biocidas, diversos trabalhos vêm demonstrando que aplicação de doses subletais de biocidas podem induzir resistência dos microrganismos a esse composto, bem como estimular o crescimento dos PRS e a comunidade microbiana de forma geral. Xu et al. (2022) demonstraram que a biocorrosão provocada por *Desulfotribrio hontreensis* SY-21 foi mais severa quando aplicada a dose subletal do THPS (75 ppm) do que na ausência do biocida. Entretanto, aparentemente, esse padrão de resposta não foi exclusivo a estresses provocados pela exposição a substâncias tóxicas, Jia et al. (2018), observaram que o estresse provocado pela restrição de fonte de carbono induziu a biocorrosão do aço carbono C1018 e aumentou a contagem de

células presentes no biofilme formado por espécies de Archaeas redutoras de sulfato.

A diversidade e as interações ecológicas presentes em determinado ecossistema é um dos fatores que determinam a susceptibilidade da comunidade microbiana frente a exposição a uma substância tóxica. Por meio da inferência das interações ecológicas pela rede de co-ocorrência, observou-se que dentro de cada um dos tratamentos, a comunidade do biofilme apresentou maior número de interações positivas que a comunidade planctônica. Já entre os tratamentos, verificou-se que as comunidades, tanto planctônica quanto do biofilme, do tratamento corretivo apresentaram maior número de interações positivas que as comunidades do tratamento preventivo. A dinâmica da interação das espécies que compõe o ambiente é determinante para o funcionamento dos ecossistemas, a manutenção da multifuncionalidade do ecossistema depende do grau em que as espécies são adaptadas aos seus ambientes bióticos e abióticos (Lawrence et al., 2012). Após uma mudança no ambiente, como por exemplo a aplicação de um biocida, há impacto direto nos processos fisiológicos desempenhados pela comunidade (Harmon et al., 2009; Bassar et al., 2010; Lawrence et al., 2012). Entretanto, há evidências que comunidades diversas e com maiores números de interações ecológicas positivas podem impulsionar a coevolução entre as espécies que compõe essa comunidade, com isso, elevando a chance de adaptação das espécies para aumentar a resistência a presença de agentes estressores (Brockhurst et al., 2013; Lawrence et al., 2012). Sendo esse um dos fatores que pode explicar por que o impacto do THPS foi reduzido quando utilizado em comunidades em estado de maturação mais avançados, quando comparadas com a comunidade em estágios iniciais de formação.

A construção de redes de inferência de interações microbianas é uma análise exploratória que permite extrair informações biologicamente úteis de conjunto de dados complexos. Para identificação de grupos de táxons biologicamente significativos, algoritmos de *clustering* podem ser utilizados. Esses algoritmos agrupam táxons que tendem a ser conectados positivamente entre si. Biologicamente, esses táxons inseridos no mesmo *cluster*, geralmente covariam em resposta aos mesmos fatores ambientais, sendo realizado o teste de enriquecimento para os grupos taxonômicos (Faust, 2021). Neste trabalho observou-se o enriquecimento significativo de algumas ASV pertencentes ao filo Firmicutes no *cluster* gerado pela rede de co-ocorrência da comunidade do biofilme do tratamento corretivo. Ao selecionar somente essas ASV

foi possível observar que elas foram correlacionadas com o estágio de formação do biofilme, apresentando abundância elevada nos estágios iniciais ou um decréscimo da abundância nos últimos dias. Firmicutes foi um filo amplamente encontrado nos ambientes relacionados com a indústria do petróleo, sendo que alguns dos PRS são representantes desse filo (Varjani & Gnansounou, 2017). Como já discutido, esse ambiente é altamente dependente de relações sintróficas, sendo que os filios Proteobacteria e Firmicutes são descritos como os mais envolvidos nesse tipo de interação, assim representantes do filo Firmicutes já foram descritos como fermentadores, podendo disponibilizar fontes de carbono para o crescimento dos PRS (Berdugo-Clavijo & Gieg, 2014; Piceno et al., 2014; Fowler et al., 2016; Sierra-Garcia et al., 2017). Em geral, para iniciação do biofilme, os microrganismos devem possuir uma ampla flexibilidade metabólica, que facilita a colonização da superfície. Fernández et al. (2008) demonstraram que para o desenvolvimento do biofilme em um reator anaeróbico de tratamento de efluentes, os Firmicutes podem ser um dos responsáveis pela produção de intermediários por meio da degradação de macromoléculas. Verma et al. (2018) observou que Firmicutes foi o filo dominante da cavidade oral e sua abundância está relacionada ao início da hidrólise polissacarídica nesta cavidade. Assim, as ASV apontadas neste trabalho podem ter um papel importante para o estabelecimento inicial do biofilme multiespécies de comunidades provenientes de amostras associadas a indústria do petróleo; entretanto, essa hipótese precisa ser testada em trabalhos futuros.

5. Conclusões

O tratamento preventivo foi mais eficiente no controle da produção de H_2S que o tratamento corretivo, isso demonstra que a eficiência da ação do THPS varia a depender do estágio de formação da comunidade bacteriana, sendo maior efeito quando a comunidade está nos estágios iniciais. Quando a comunidade tem tempo para se estabelecer, como no tratamento corretivo, a doses aplicada teve efeito subletal, que culminou na indução da formação de biofilme. O THPS foi eficiente na redução do metabolismo para o tratamento preventivo. Já na estrutura da comunidade bacteriana, a composição foi semelhante em ambos os tratamentos. A comunidade do biofilme apresenta maior complexidade de interações ecológicas, e com isso maior resistência ao efeito do THPS. Há evidências de que Firmicutes desempenha um papel importante para o início da formação do biofilme, porém, testes laboratoriais

precisam ser realizados para comprovação biológica. Assim, torna-se de fundamental importância entender a dinâmica de formação da comunidade nesses ambientes e os fatores que interferem na resistência, para auxiliar no planejamento eficiente do controle da biocorrosão em ambientes relacionados a indústria do petróleo.

6. Referências

Bassar, R. D., Marshall, M. C., López-Sepulcre, A., Zandonà, E., Auer, S. K., Travis, J., ... & Reznick, D. N. (2010). Local adaptation in Trinidadian guppies alters ecosystem processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3616-3621.

Berdugo-Clavijo, C., & Gieg, L. M. (2014). Conversion of crude oil to methane by a microbial consortium enriched from oil reservoir production waters. *Frontiers in microbiology*, 5, 197.

Bhola, S. M., Alabbas, F. M., Bhola, R., Spear, J. R., Mishra, B., Olson, D. L., & Kakpovbia, A. E. (2014). Neem extract as an inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: a preliminary investigation. *Engineering Failure Analysis*, 36, 92-103.

Brockhurst, M. A., Morgan, A. D., Rainey, P. B., & Buckling, A. (2003). Population mixing accelerates coevolution. *Ecology Letters*, 6(11), 975-979.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643.

Campbell, C. (2017). Advances in testing and monitoring of biocides in oil and gas. *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies*, 489-511.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.

Cordas, C. M., Guerra, L. T., Xavier, C., & Moura, J. J. (2008). Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. *Electrochimica Acta*, 54(1), 29-34.

Costerton, J. W. (Ed.). (2007). *The biofilm primer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Dall'Agnol, L. T., Cordas, C. M., & Moura, J. J. (2014). Influence of respiratory substrate in carbon steel corrosion by a Sulphate Reducing Prokaryote model organism. *Bioelectrochemistry*, 97, 43-51.

Dang, H., & Lovell, C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 91-138.

Dolfing, J., & Hubert, C. R. (2017). Using thermodynamics to predict the outcomes of nitrate-based oil reservoir souring control interventions. *Frontiers in microbiology*, 8, 2575.

Elmawgoud, H. A., Elshiekh, T. M., Khalil, S. A., Alsabagh, A. M., & Tawfik, M. (2015). Modeling of hydrogen sulfide removal from Petroleum production facilities using H₂S scavenger. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 131-137.

Enning, D., & Garrelfs, J. (2014). Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied and environmental microbiology*, 80(4), 1226-1236.

Faust, K. (2021). Open challenges for microbial network construction and analysis. *The ISME Journal*, 15(11), 3111-3118.

Fernández, N., Díaz, E. E., Amils, R., & Sanz, J. L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology*, 56, 121-132.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.

Fowler, S. J., Toth, C. R., & Gieg, L. M. (2016). Community structure in methanogenic enrichments provides insight into syntrophic interactions in hydrocarbon-impacted environments. *Frontiers in microbiology*, 7, 562.

Greene, E. A., Brunelle, V., Jenneman, G. E., & Voordouw, G. (2006). Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7897-7901.

Gieg, L. M., Jack, T. R., & Foght, J. M. (2011). Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(2), 263-282.

Harmon, L. J., Matthews, B., Des Roches, S., Chase, J. M., Shurin, J. B., & Schluter, D. (2009). Evolutionary diversification in stickleback affects ecosystem functioning. *Nature*, 458(7242), 1167-1170.

James, B. R., & Lorenzini, F. (2010). Developments in the chemistry of tris (hydroxymethyl) phosphine. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(5-6), 420-430.

Jia, R., Yang, D., Al-Mahamedh, H. H., & Gu, T. (2017). Electrochemical testing of biocide enhancement by a mixture of D-amino acids for the prevention of a corrosive biofilm consortium on carbon steel. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(27), 7640-7649.

Jia, R., Yang, D., Xu, D., & Gu, T. (2018). Carbon steel biocorrosion at 80 C by a thermophilic sulfate reducing archaeon biofilm provides evidence for its utilization of elemental iron as electron donor through extracellular electron transfer. *Corrosion Science*, 145, 47-54.

Johnson, R. J., Folwell, B. D., Wirekoh, A., Frenzel, M., & Skovhus, T. L. (2017). Reservoir Souring—Latest developments for application and mitigation. *Journal of biotechnology*, 256, 57-67.

Jones, C., Downward, B., Edmunds, S., Curtis, T., & Smith, F. (2012). THPS: a review of the first 25 years, lessons learned, value created and visions for the future. *CORROSION* 2012.

Kahrilas, G. A., Blotevogel, J., Stewart, P. S., & Borch, T. (2015). Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. *Environmental science & technology*, 49(1), 16-32.

Lawrence, D., Fiegna, F., Behrends, V., Bundy, J. G., Phillimore, A. B., Bell, T., & Barraclough, T. G. (2012). Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS biology*, 10(5), e1001330.

Lee, M. H. P., Caffrey, S. M., Voordouw, J. K., & Voordouw, G. (2010). Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 1109-1118.

Li, Y., Jia, R., Al-Mahamedh, H. H., Xu, D., & Gu, T. (2016). Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 896.

Little, B. J. et al. Microbially influenced corrosion—Any progress? *Corrosion Science*, v. 170, n. November 2019, p. 108641, 2020.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.

Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 441-454.

Piceno, Y. M., Reid, F. C., Tom, L. M., Conrad, M. E., Bill, M., Hubbard, C. G., ... & Andersen, G. L. (2014). Temperature and injection water source influence microbial community structure in four Alaskan North Slope hydrocarbon reservoirs. *Frontiers in microbiology*, 5, 409.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... & Oksanen, M. J. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package*, version, 2(9), 1-295.

Patidar, S. K., & Tare, V. (2005). Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. *Bioresource technology*, 96(11), 1215-1222.

Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., & Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 32(1), 109-134.

Santos, J. C., Lopes, D. R. G., Silva, L. C. F., Ramos, J. L. L., Dias, R. S., Lima, H. S., ... & da Silva, C. C. (2022). Characterization of the biofilm structure and microbial diversity of sulfate-reducing bacteria from petroleum produced water supplemented by different carbon sources. *Journal of Environmental Management*, 304, 114189.

Sharma, M., Menon, P., Voordouw, J., Shen, Y., & Voordouw, G. (2018). Effect of long term application of tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS) in a light oil-producing oilfield. *Biofouling*, 34(6), 605-617.

Silva, C. C., Viero, A. F., Dias, A. C. F., Andreote, F. D., Jesus, E. C., De Paula, S. O., ... & Oliveira, V. M. (2010). Monitoring the bacterial community dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1), 21-29.

Sierra-Garcia, I. N., Dellagnezze, B. M., Santos, V. P., Chaves B, M. R., Capilla, R., Santos Neto, E. V., ... & Oliveira, V. M. (2017). Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales. *Extremophiles*, 21, 211-229.

Tackmann, J., Rodrigues, J. F. M., & von Mering, C. (2019). Rapid inference of direct interactions in large-scale ecological networks from heterogeneous microbial sequencing data. *Cell systems*, 9(3), 286-296.

Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 73-94.

Varjani, S. J., & Gnansounou, E. (2017). Microbial dynamics in petroleum oil-fields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource technology*, 245, 1258-1265.

Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of microbiology*, 200, 525-540.

Xu, L., Guan, F., Ma, Y., Zhang, R., Zhang, Y., Zhai, X., ... & Hou, B. (2022). Inadequate dosing of THPS treatment increases microbially influenced corrosion of pipeline steel by inducing biofilm growth of *Desulfovibrio hontreensis* SY-21. *Bioelectrochemistry*, 145, 108048.

Whiteley, A. S., & Bailey, M. J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2400-2407.

Zain, W. S., Hairul Salleh, N. I., & Abdullah, A. (2018). Natural biocides for mitigation of sulphate reducing bacteria. *International Journal of corrosion*, 2018.

Zhao, K., Wen, J., Gu, T., Koplaku, A., & Cruz, I. (2008, March). Mechanistic modeling of anaerobic THPS degradation in seawater under various conditions. In *CORROSION 2008*. OnePetro.

Considerações Finais

A partir do conjunto de resultados obtidos neste estudo foi possível elucidar alguns fatores relacionados com a modulação da produção de H₂S em amostras relacionadas com a indústria do petróleo. Observou-se que a estrutura da comunidade bacteriana total é um fator relevante para determinar a abundância de PRS totais em um ecossistema, haja vista a obtenção de um modelo relativamente acurado capaz de prever a abundância de PRS no ambiente. E que as interações ecológicas entre as espécies totais que compõe a comunidade é um dos fatores determinantes para a modulação da produção de H₂S no ambiente, sendo que comunidades que tem uma rede de interações coesa apresenta maior taxa de produção que outras. Em termos de controle da comunidade microbiana produtora de H₂S com biocida, foi observado que o tratamento preventivo foi mais eficiente, o que demonstrou a necessidade de manter a densidade populacional baixa no ambiente para a efetividade das estratégias de controle. Se a densidade populacional estiver elevada, necessita o aumento da dose do biocida aplicado, uma vez que doses subletais podem induzir a formação de biofilme, o que pode agravar o problema de biocorrosão dos sistemas. Esse fato ressaltou a importância da compreensão da relação biocida vs estrutura da comunidade bacteriana, com o intuito de otimizar a metodologia de frequência de aplicação do biocida na indústria. Há evidências de que Firmicutes tenha um papel importante no início da formação do biofilme multiespécie na indústria do petróleo, entretanto, ensaios laboratoriais futuros são necessários para comprovação dessa hipótese, sendo que, se comprovada, podem se tornar biomarcadores para o controle da biocorrosão.