

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

GABRIELA FEIX PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE BIOCIDAS NO TRATAMENTO DE ÁGUA
PRODUZIDA NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO E SEU IMPACTO NA
RESISTÊNCIA BACTERIANA**

Porto Alegre
2023

GABRIELA FEIX PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE BIOCIDAS NO TRATAMENTO DE ÁGUA
PRODUZIDA NA INDÚSTRIA DE ÓLEO E SEU IMPACTO NA RESISTÊNCIA
BACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Porto Alegre
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Gabriela
AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE BIOCIDAS NO TRATAMENTO
DE ÁGUA PRODUZIDA NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO E SEU
IMPACTO NA RESISTÊNCIA BACTERIANA / Gabriela Pereira.
-- 2023.
127 f.
Orientadora: Gertrudes Corção.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Petróleo. 2. Biocidas. 3. Resistência
bacteriana. I. Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

O doutorado sempre foi uma meta para mim, muitas vezes quase inalcançável devido a outros fatores. Entretanto, algumas pessoas nunca deixaram de acreditar que um dia seria realidade. Agradeço primeiramente ao maior dos meus incentivadores, meu pai Ubirajara. O meu sonho se tornou uma extensão do sonho dele, cujo desejo era ter uma filha doutora. Agradeço também à minha mãe, Lisane, que vibrava com cada conquista e ao meu irmão, Victor, pela competição saudável. Obrigada pai, mãe e mano, meu título também será de vocês. Também agradeço ao meu marido, William, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos bons e ruins. William, a tua parceria foi fundamental durante todo o processo.

Agradeço aos professores do PPGMAA pelos conhecimentos compartilhados. Em especial à minha orientadora, Prof. Dr^a. Gertrudes Corção, que sempre esteve presente na condução do estudo que originou esta tese. Agradeço, professora, primeiramente por me aceitar como sua aluna, após tanta insistência de minha parte, e principalmente pela sua compreensão com a minha vida profissional, sempre entendendo que muitas vezes eu precisava priorizar o meu trabalho em detrimento do doutorado. Espero que o resultado tenha ficado à altura de suas expectativas.

Agradeço ao colega Dr. Harry Pilz Junior pelo apoio essencial nas etapas de bioinformática apresentadas nesta tese.

Agradeço ao laboratório do Prof. Dr. Jeverson Frazzon pela condução das análises de sequenciamento de DNA.

Agradeço à empresa Dorf Ketal Brasil Ltda., onde sou colaboradora, pela oportunidade de desenvolver um doutorado conciliando com minhas atividades profissionais. Agradeço também à empresa pela disponibilização das amostras de água produzida e biocidas. Ainda em relação à empresa, agradeço especialmente ao meu antigo líder, Dr. Carlos Rodolfo Wolf, por me provocar a iniciar este projeto. E também agradeço à minha atual líder, Bibiana Braga pela amizade e compreensão neste período.

Agradeço à minha parceira de laboratório Taiah Rosin por ser meu braço direito.

Agradeço aos membros da banca de defesa pela disponibilidade e contribuições para o trabalho.

Por fim, agradeço à CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE BIOCIDAS NO TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA NA INDÚSTRIA DE ÓLEO E SEU IMPACTO NA RESISTÊNCIA BACTERIANA

Autor: MSc. Gabriela Feix Pereira
Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Gertrudes Corção

O impacto da ação bacteriana na indústria de óleo e gás se estende desde a extração do petróleo e armazenagem até o processo de transporte e refino. Uma das maiores fontes de contaminação microbiológica é a água produzida, cuja composição físico-química varia de acordo com as condições geográficas e com os processos químicos específicos de cada plataforma. Alguns grupos bacterianos como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e as bactérias produtoras de ácido (BPA) são comumente encontrados na água produzida e seu desenvolvimento está relacionado com o aumento da geração de sulfeto de hidrogênio (H₂S), com o aumento das taxas de corrosão em estruturas metálicas e, até mesmo, com entupimento de dutos e filtros pelo acúmulo de biofilmes. A aplicação de biocidas é uma alternativa de mitigação para essa problemática. Entretanto, o emprego de biocidas sem a seleção e monitoramento adequados induzem a aplicação de subdosagens que acarretam o aumento da pressão seletiva, selecionando bactérias mais resistentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças na composição do microbioma de diferentes amostras de água produzida, e como estas diferenças impactam na resistência bacteriana aos biocidas comumente utilizados na indústria de petróleo. O sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA foi utilizado para avaliação de taxonomia das amostras de água produzida e avaliações de concentração inibitória mínima (CIM), inibição e erradicação de biofilmes foram utilizadas para avaliação da resistência aos biocidas. As avaliações de taxonomia das amostras de água produzida indicaram composições microbiológicas diferentes entre todas as amostras avaliadas. A CIM dos consórcios de BPA e BRS variou conforme o biocida. Entretanto, quando avaliados os biofilmes, o biocida mais utilizado em campos de petróleo brasileiros, sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS), demonstrou tendência de aumento na formação de biofilmes, mesmo utilizando sobredosagem. Em relação à manutenção do microbioma de BRS após o enriquecimento em meio de cultura, observou-se uma maior diversidade na água produzida, o que demonstra que a maior parte das BRS presentes nas amostras não eram cultiváveis. Esses resultados levantam um alerta relacionado à necessidade do planejamento detalhado de tratamentos de controle microbiológico na indústria de petróleo, destacando-se a importância da seleção de métodos de monitoramento adequados, que representem o cenário microbiológico encontrado nas plataformas.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (127 p.) Maio, 2023.

EVALUATION OF BIOCIDAL USE DURING THE TREATMENT OF PRODUCED WATER IN OIL AND GAS INDUSTRY AND ITS IMPACT ON BACTERIAL RESISTANCE

Author: Gabriela Feix Pereira, MSc.
Advisor: Prof. Gertrudes Corção, PhD

The impact of bacterial growth in oil and gas industry extends from the oil extraction to transportation and refining process. One of the greatest sources of microbiological contamination is the produced water, which physical-chemical composition varies according to the geographic conditions and specific chemical processes of each platform. Some bacterial groups such as sulfate-reducing bacteria (SRB) and acid-producing bacteria (APB) are commonly found in produced water and their development is related to generation of hydrogen sulfide (H₂S), increase of corrosion rates in metallic structures and even clogging of pipelines and filters due to the accumulation of biofilms. The application of biocides is an alternative to mitigate this problem. However, the use of biocides without adequate selection and monitoring culminates in the application of low concentrations that lead to increased selective pressure, selecting more resistant bacteria. In this context, the objective of this study was to evaluate the difference in microbiome composition of different samples of produced water, and how these differences impact bacterial resistance to biocides commonly used in the oil and gas industry. The sequencing of 16S rRNA gene amplicons was used to evaluate the taxonomy of the produced water samples. Minimum inhibitory concentration (MIC) and biofilm inhibition and eradication were used to evaluate the resistance to biocides. The taxonomy evaluations of the produced water samples indicated different microbiological compositions among all evaluated samples. The MIC of the APB and SRB consortia varied according to the biocide. However, when evaluating the biofilms, the most used biocide in Brazilian oil fields, tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS), showed a tendency to increase the formation of biofilms, even using overdose. Regarding the maintenance of the SRB microbiome after enrichment in culture medium, a greater diversity was observed in the produced water, which demonstrates that most of the BRS present in the samples were not cultivable. These results raise an alert related to the necessity of detailed planning of microbiological control treatments in the oil industry, highlighting the importance of selecting adequate monitoring methods that represent the microbiological scenario found on platforms.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (127 p.) May, 2023.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	A indústria brasileira de petróleo	4
3.2	Problemas de origem microbiológica na indústria de petróleo	6
3.2.1	Procaríotos redutores de sulfato (PRS)	8
3.2.2	Bactérias produtoras de ácido (BPA)	9
3.3	Métodos para o controle de microrganismos na indústria de petróleo	10
3.4	Resistência bacteriana	13
3.5	Ferramentas de análise microbiológica	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Locais de realização do estudo	16
4.2	Coletas de água produzida.....	16
4.3	Avaliação das propriedades físico-químicas da água produzida.....	17
4.4	Diversidade microbiana nas amostras de água produzida	17
4.4.1	Extração de DNA das amostras de água produzida.....	17
4.4.2	Amplificação do gene 16SrRNA	17
4.4.3	Sequenciamento dos amplicons do gene 16S rRNA e análise taxonômica e funcional	18
4.5	Meios de cultura	18
4.6	Enriquecimento dos consórcios de BPA e BRS	20
4.7	Avaliação da diversidade bacteriana em consórcios de BRS.....	20
4.8	Biocidas utilizados para avaliação da inibição de consórcios de BRS e BPA e biofilmes de BRS	21
4.9	Pré-inóculos de consórcios de BPA e BRS	22
4.10	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de biocidas em consórcios de BPA e BRS	22
4.11	Formação e quantificação de biofilmes de consórcios de BRS.....	22
4.11.1	Inibição de biofilmes de consórcios de BRS por biocidas.....	23
4.11.2	Erradicação de biofilmes de consórcios de BRS por biocidas	23

5.	ARTIGOS	24
5.1	ARTIGO 1.....	25
5.2.	ARTIGO 2.....	45
5.3.	ARTIGO 3.....	67
6.	DISCUSSÃO GERAL	101
7.	CONCLUSÃO	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Modo de ação de biocidas utilizados na indústria do petróleo	11
TABELA 2 – Relação de amostras de água produzida e seus respectivos consórcios utilizados neste estudo.....	16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bacias brasileiras produtoras de petróleo <i>onshore</i> e <i>offshore</i> (Petrobras, 2022).....	4
Figura 2 – Sistema de produção de petróleo e geração de água produzida. Adaptado de Jiménez et al., 2018.	5
Figura 3 – Processo de limpeza de tanque de armazenamento de água produzida. Imagem cedida pela Dorf Ketal Brasil Ltda.	6
Figura 4 – Estrutura química do PCMX (A) e esquema relacionado ao modo de ação (B) – adaptado de Poger; Mark, 2019.	13
Figura 5 – Meios de cultura Caldo Vermelho Fenol (A) e Postgate E (B), estéreis (a esquerda) e após crescimento bacteriano (a direita).	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADBAC	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
API	<i>American Petroleum Institute</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BPA	Bactérias produtoras de ácido
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DBNPA	2,2-dibromo-3-nitripropionamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EBI	<i>European Bioinformatic Institute</i>
EUA	Estados Unidos
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
NACE	<i>National Association of Corrosion Engineers</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMP	Número Mais Provável
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
PCMX	<i>para-cloro-meta-xilenol</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPGMAA	Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
PRS	Procariotos redutores de sulfato
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico

RTPCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
THPS	Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfônio
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

A contribuição brasileira no cenário mundial relacionado à indústria de óleo e gás tem sido crescente nos últimos anos. Com a descoberta da camada pré-sal, anunciada em 2006 pela Petrobras, o Brasil passou a ser considerado uma potência mundial em produção de petróleo. Com isso, preocupações relacionadas à eficiência do sistema produtivo, garantia da integridade de equipamentos e questões ocupacionais tornaram-se de grande importância. Uma das grandes problemáticas está relacionada ao armazenamento e descarte da água produzida, principal efluente da extração de petróleo e importante fonte de contaminação microbiológica.

A composição físico-química da água produzida varia de acordo com as condições geográficas e com os processos químicos aos quais a água foi submetida. Essas diferenças na composição juntamente com as condições de temperatura e processamento típicas de cada plataforma, impulsionam o desenvolvimento de um microbioma específico que pode variar até mesmo entre poços de extração vizinhos, em um mesmo reservatório. Alguns grupos bacterianos como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e as bactérias produtoras de ácido (BPA) são comumente encontrados em água produzida. Embora tanto as BRS, quanto as BPA estejam intrinsecamente presentes, outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, também são encontrados em abundância somente após o contato da água produzida com atividade humana. A heterogeneidade no microbioma desse ambiente favorece as interações entre os grupos bacterianos, resultando em uma população mais robusta e resistente a agentes externos. O desenvolvimento desenfreado destes grupos bacterianos está relacionado com a geração do gás sulfeto de hidrogênio (H_2S), a potencialização da corrosão em dutos, tanques e equipamentos e, até mesmo, o entupimento de dutos e filtros pelo acúmulo de biofilmes.

A aplicação de biocidas é uma das alternativas comumente empregadas para mitigar a proliferação desenfreada de microrganismos. Entre os biocidas mais utilizados na indústria do petróleo estão sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfônio (THPS), glutaraldeído, 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA) e cloreto de alquil dimetil benzil amônio (ADBAC). Usualmente, concentrações padrão são aplicadas em campos de petróleo, muitas vezes sem considerar as condições físico-químicas da água produzida e a suscetibilidade do seu microbioma. O uso de biocidas sem

uma avaliação prévia das moléculas e concentrações mais adequadas em cada caso pode induzir à aplicação de subdosagens ou sobredosagens. Subdosagens acarretam o aumento da pressão seletiva, gerando populações bacterianas com menor susceptibilidade ao tratamento aplicado, enquanto sobredosagens geram aumento da exposição ocupacional e do impacto ambiental. Para aumentar a probabilidade de sucesso de tratamentos com biocida a definição clara do objetivo do tratamento e a seleção prévia das moléculas adequadas para cada caso através de ferramentas microbiológicas são pontos chave.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi demonstrar as diferenças na composição do microbioma de amostras de água produzida e o impacto dessas diferenças na susceptibilidade a biocidas. Com isso, amostras de água produzida de campos de petróleo brasileiros localizados em terra (*onshore*) e no mar (*offshore*) foram coletadas e avaliadas. Além disso, o impacto de biocidas na inibição da formação e na erradicação de biofilmes foi avaliada, uma vez que biofilmes são considerados fenótipos de resistência. Ferramentas moleculares foram utilizadas juntamente com avaliações em meio de cultura, possibilitando uma visão ampla do perfil microbiológico das amostras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição do microbioma de diferentes amostras de água produzida coletadas em plataformas brasileiras localizadas em terra (*onshore*) e no mar (*offshore*), bem como o impacto dessas diferenças na susceptibilidade a biocidas.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Buscar e sintetizar informações disponíveis em literatura relacionadas a aplicação de biocidas em indústrias de petróleo (artigo 1);
- 2.2.2 Avaliar a diversidade e composição do microbioma em amostras de água produzida de plataformas de petróleo *onshore* e *offshore* através de sequenciamento 16S rRNA (artigo 2);
- 2.2.3 Correlacionar a diversidade microbiana com fatores abióticos (teor de cloretos e teor de sulfato) nas amostras de água produzida (artigo 2);
- 2.2.4 Enriquecer consórcios de BPA e BRS provenientes das amostras de água produzida (artigo 2);
- 2.2.5 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos biocidas THPS, DBNPA, ADBAC e glutaraldeído nos consórcios enriquecidos de BPA e BRS (artigo 2);
- 2.2.6 Avaliar a composição do microbioma nos consórcios enriquecidos de BRS através de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA (artigo 3);
- 2.2.7 A partir do resultado do sequenciamento, analisar a abundância de rotas metabólicas de interesse nos diferentes consórcios de BRS e a diferença entre os perfis metabólicos (artigo 3);
- 2.2.8 Investigar o impacto da exposição a biocidas na inibição e erradicação de biofilmes formados pelos consórcios de BRS (artigo 3).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A indústria brasileira de petróleo

A descoberta do pré-sal em 2006 impulsionou o aumento da produção de petróleo no Brasil, chegando a inserir o país entre os dez maiores produtores mundiais (IBP, 2021). Em território nacional existem nove bacias petrolíferas *offshore* e 155 plataformas operantes. Dentre as plataformas operantes, 69 são plataformas localizadas em águas profundas e 86 são plataformas fixas localizadas no Nordeste e Sudeste. Além disso, o Brasil possui 114 blocos de exploração *onshore*, sendo a maioria nas bacias do Recôncavo, Potiguar, Espírito Santo e Parnaíba. A Figura 1 apresenta a distribuição das bacias produtoras de petróleo em atividade no território brasileiro (em verde).



Figura 1 – Bacias brasileiras produtoras de petróleo *onshore* e *offshore* (PETROBRAS, 2022).

Aumento na produção de petróleo ao longo dos anos levou à geração de maiores volumes de água produzida, considerada o principal efluente gerado durante a extração de petróleo (AL-GHOUTI et al., 2019a). O volume gerado de água produzida tem relação direta com a idade do poço produtor e com o método de extração utilizado. Em poços maduros, o volume de água produzida pode chegar a

nove vezes o volume de petróleo extraído. Além disso, durante a extração secundária de petróleo, água do mar pode ser injetada a fim de aumentar a pressão do poço, aumentando ainda mais o volume gerado de água produzida (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011; JIMÉNEZ et al., 2018).

Após o processo de extração, o petróleo sobe até a plataforma e é separado da água produzida. O objetivo final desse processo é atingir um teor de água abaixo de 1% v/v no petróleo, para poder ser exportado para as refinarias (MORIGAKI et al., 2010). O processo de separação ocorre normalmente por gravidade, e após a separação, o petróleo e a água produzida seguem caminhos distintos, conforme demonstrado na Figura 2. Mesmo após o processo de separação, a água produzida ainda pode conter aproximadamente $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de óleo. Para descarga no mar, a concentração de óleo é um critério fundamental, sendo que no Brasil, Equador e Colômbia a água produzida deve conter até $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de óleo para estar apta ao descarte. Outros países como Argentina, Venezuela e Estados Unidos têm limites mais rígidos. Quando a água produzida não atinge os requisitos necessários para descarte, a reinjeção é uma alternativa. Nesse caso, para evitar problemas de entupimento é adequado que o teor de sólidos não ultrapasse $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e o teor de óleo seja menor de $42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (JIMÉNEZ et al., 2018).

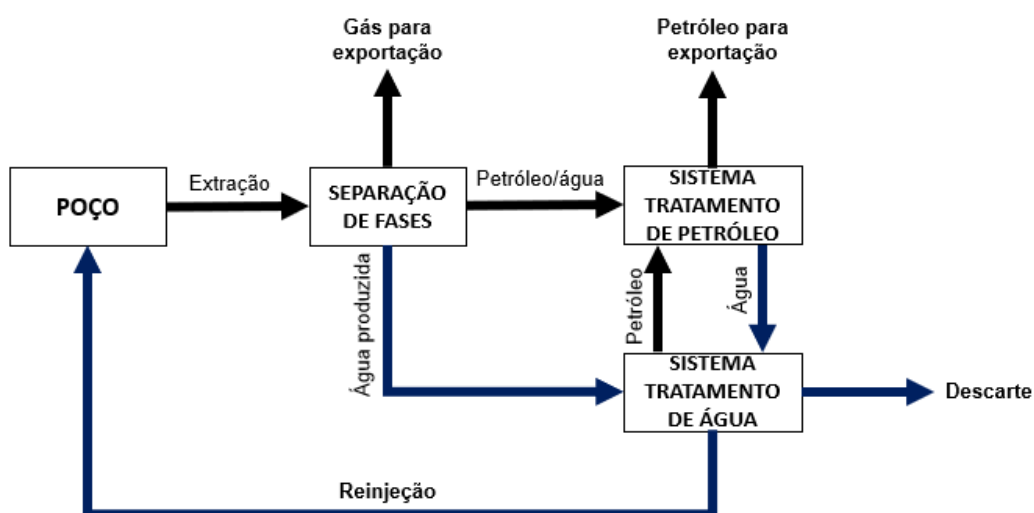


Figura 2 – Sistema de produção de petróleo e geração de água produzida.

Adaptado de JIMÉNEZ et al., 2018.

A água produzida que não se enquadra nos requisitos de descarte ou reinjeção é estocada em tanques de armazenamento (Figura 3). Entretanto, as condições físico-químicas encontradas nesses tanques os torna propícios para o desenvolvimento de diversos grupos microbianos (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000). O óleo residual presente na água produzida forma uma camada que dificulta a difusão do oxigênio, e aliado à pouca ou nenhuma agitação, fornece um ambiente adequado para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbicos. Além disto, microrganismos capazes de metabolizar hidrocarbonetos como fonte de carbono têm vantagem sob os demais. As variações na composição da água produzida, como teor de cloretos, teor de sulfato, temperatura e pH, tornam o microbioma nos tanques bastante diverso. Também contribuem para a diversidade do microbioma a localização geográfica, a composição química do petróleo, os produtos químicos utilizados durante o processo de extração, entre outros fatores (AL-GHOUTI et al., 2019a).



Figura 3 – Processo de limpeza de tanque de armazenamento de água produzida.

Imagem cedida pela Dorf Ketal Brasil Ltda.

3.2 Problemas de origem microbiológica na indústria de petróleo

O desenvolvimento microbiano descontrolado ao longo do processo de separação e estocagem da água produzida gera problemas importantes, que oneram em bilhões de dólares a cadeia de produção de petróleo mundial, anualmente (JIA et al., 2019a). Dentre os mais recorrentes estão a corrosão induzida por

microrganismos, ou biocorrosão, que também está associada ao surgimento de biofilmes, e a geração de sulfeto de hidrogênio (H₂S), ou *biosouring*.

A biocorrosão afeta estruturas metálicas como dutos e equipamentos e é decorrente de uma variedade de processos metabólicos que contribuem para o aumento das taxas de corrosão. Em ambientes com baixo teor de oxigênio, a biocorrosão em metais é classificada em dois tipos. A biocorrosão Tipo I está relacionada ao uso por células sésseis de íons presentes no metal, por exemplo íons de ferro, como doadores de elétrons. A biocorrosão Tipo I é chamada de transferência extracelular de elétrons. Já o Tipo II está relacionado a corrosão gerada por metabólitos secretados por microrganismos (JIA et al., 2019a).

Esses processos podem ser gerados pelo crescimento de bactérias, archaea ou fungos, sendo o processo bacteriano o mais estudado. Nesse caso, o grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) é o mais recorrente, já que o sulfato normalmente está presente em altos teores na água produzida (LV; DU, 2018). As BRS são relacionadas principalmente à biocorrosão Tipo I, já que o processo de redução de sulfato pode utilizar ferro como doador de elétrons, levando à despolarização catódica (LI et al., 2018). Outro grande grupo bacteriano associado a processos corrosivos é o grupo das bactérias produtoras de ácidos (BPA), ou bactérias fermentativas. Esse grupo contribui principalmente para a biocorrosão Tipo II, onde ácidos orgânicos gerados como subproduto de metabolismo podem elevar as taxas de corrosão (SENTHILMURUGAN et al., 2019). Entretanto, em microbiomas complexos como os da água produzida, a biocorrosão ocorre de maneira dinâmica, muitas vezes através de ambos os mecanismos de biocorrosão simultaneamente, como em caso de biofilmes heterogêneos de BRS e BPA (XU; LI; GU, 2016).

Além de estarem associados à biocorrosão, o acúmulo de biofilmes pode prejudicar o escoamento de fluidos e a filtração em membranas utilizadas nos processos de remoção de sais. Biofilmes são formados pela adesão de células planctônicas às superfícies, metálicas ou não, através da liberação de uma matriz polimérica, composta por exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FLEMMING et al., 2016). Biofilmes heterogêneos de BRS e BPA compostos por diversas camadas estruturadas de acordo com a sensibilidade ao oxigênio já foram descritos (XU; LI; GU, 2016).

A geração de H₂S é outro problema comum na indústria de petróleo e que pode ter origem microbiológica. O H₂S é um gás extremamente tóxico, corrosivo e inflamável. A corrosão associada a este gás é chamada de *sour corrosion* e possui uma morfologia de corrosão localizada, gerando perfurações no metal chamadas de *pites* (KVAREKVÅL; MOLONEY, 2017). Além das questões relacionadas à toxicidade e à corrosão, o H₂S é responsável pela elevação do teor de enxofre no petróleo, reduzindo seu valor agregado. O Procariotos redutores de sulfato (PRS), incluindo bactérias e archaea, são os principais responsáveis pela geração biológica desse gás (MUYZER; STAMS, 2008). Esses microrganismos estão presentes desde o reservatório até o destino final da água produzida (MYHR et al., 2002; PICENO et al., 2014; GOVIL et al., 2019).

3.2.1 Procariotos redutores de sulfato (PRS)

PRS são um grupo polifilético de sete linhagens filogenéticas: cinco pertencentes ao domínio Bactéria e duas ao domínio Archaea (HIDALGO et al., 2021). O domínio Bactéria (referido como BRS) é o mais comum em campos de petróleo e é representado principalmente pelas classes Deltaproteobacteria e Clostridia (SANTOS et al., 2020; HIDALGO et al., 2021). Reservatórios de petróleo podem chegar a altas temperaturas (até 300°C), e apesar de microrganismos somente serem identificados até aproximadamente 80°C (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000), nesses locais podem ser encontradas BRS termófilas do filo Thermodesulfobacteria e das famílias *Nitrospirae* e *Thermodesulfobiaceae*. O domínio Archaea, menos abundante, é composto pelos filos Euryarchaeota e Crenarchaeota (MUYZER; STAMS, 2008; LI et al., 2017a).

BRS usam uma ampla variedade de moléculas como fonte de carbono, como etanol, lactato, piruvato e malato. Além disso, demonstraram a habilidade de metabolizar ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos de cadeia longa e compostos aromáticos, por exemplo fenol e benzoato, encontrados em abundância no petróleo e na água produzida (MUYZER; STAMS, 2008; ALVES et al., 2020). Sulfato e outros compostos são utilizados pelas BRS como aceptores de elétrons no metabolismo energético. A via de redução do sulfato pode ser dividida em assimilatória, onde o H₂S é um intermediário cujo enxofre é aproveitado na síntese de compostos celulares, e dissimilatória, que resulta na liberação de H₂S para o meio

(BARTON; FAUQUE, 2022). Diversos gêneros de BRS têm sido reportados em água produzida. Os mais frequentes são *Desulfovibrio*, *Desulfonauticus*, *Desulfoplanes*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium* e *Thermodesulfovibrio* (BONIFAY et al., 2017; SANTOS et al., 2020; HIDALGO et al., 2021; JURELEVICIUS et al., 2021; PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021).

3.2.2 Bactérias produtoras de ácido (BPA)

BPA também estão presentes em abundância no microbioma da água produzida e podem oxidar moléculas orgânicas complexas como hidrocarbonetos, através da fermentação anaeróbica, produzindo subprodutos como os ácidos-graxos voláteis (AGV), acetato, lactato, propionato e butirato, que podem ser utilizados como doadores de elétrons por BRS (XU; LI; GU, 2016). Além disso, as formas aniônicas desses subprodutos podem ser encontradas, como ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico e ácido butírico, entre outros. Essas formas ácidas influenciam na corrosão por dissociação, produzindo íons hidrogênio (H^+) (XU; LI; GU, 2016; DAWUDA; TALEB-BERROUANE; KHAN, 2021).

Dependendo da etapa de tratamento da água produzida, diferentes comunidades de BPA podem estar presentes. No reservatório e antes da estocagem da água produzida em tanques, a predominância é de bactérias da ordem Halanaerobiales, especialmente os membros do gênero *Halanaerobium* (OLLIVIER; CAYOL, 2005; BOOKER et al., 2019; DANIEL et al., 2021; E. et al., 2021; RAJBONGSHI; GOGOI, 2021). Outro gêneros bastante comuns são *Thermotoga*, *Thermosipho* e *Geotoga*, que pertencem ao grupo dos termófilos (GRIGORYAN et al., 2008; LI et al., 2017a). Após a separação do petróleo e posterior estocagem da água produzida em tanques, a predominância de BPA pertencentes ao grupo das enterobactérias tem sido reportada, principalmente os gêneros *Enterobacter*, *Serratia* e *Enterococcus* (AGRAWAL; VANBROEKHOVEN; LAL, 2010; SONG et al., 2019; TIAN; XUE; MA, 2020). A presença dessas bactérias é fortemente relacionada com atividades antropogênicas (VIGNERON et al., 2017), e pode ser explicada pela mistura da água produzida com outros resíduos aquosos gerados na plataforma, como água da chuva e água de limpeza.

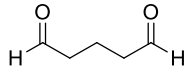
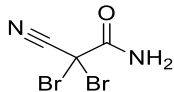
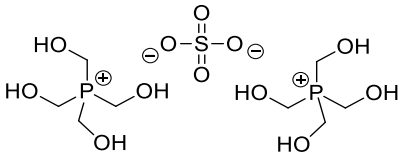
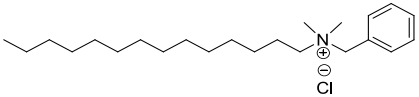
O grupo das enterobactérias tem sido extensivamente estudado devido a sua resistência a agentes antibacterianos e biocidas. Membros deste grupo possuem diferentes mecanismos de resistência, com destaque para a transferência horizontal de genes de resistência por plasmídeos (KRAEMER; RAMACHANDRAN; PERRON, 2019; MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2021). A relação sintrófica entre BPA e BRS já foi descrita, e a possibilidade de transferência de genes de resistência entre os gêneros é um assunto preocupante, uma vez que ambos os grupos coexistem em ambientes como os tanques de armazenamento de água (CAMPA et al., 2019a).

3.3 Métodos para o controle de microrganismos na indústria de petróleo

O controle de microrganismos na indústria de petróleo pode ser realizado por métodos químicos e/ou físicos, sendo a aplicação de biocidas o método mais comum. Biocidas oxidantes e não-oxidantes possuem diferentes características, enquanto biocidas não-oxidantes são menos reativos e mais seletivos, biocidas oxidantes são extremamente reativos, inclusive podendo ter sua eficiência reduzida em sistemas com maior teor de matéria orgânica (JONES; JOSHI, 2021). A reatividade dos biocidas oxidantes se estende também aos metais, resultando no aumento das taxas de corrosão, o que limita a sua aplicação na indústria de petróleo.

Dentre os biocidas mais utilizados mundialmente para tratamento de água na indústria de petróleo estão glutaraldeído, 2,2-dibromo-2-cianoacetamida (DBNPA), sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS), cloreto de alquildimetilbenzilamônio (ADBAC), também conhecido como cloreto de benzalcônio, e hipoclorito de sódio (KAHRILAS et al., 2015). Dentre os cinco, apenas o hipoclorito de sódio é classificado como oxidante, os demais são biocidas não oxidantes com modos de ação distintos. Glutaraldeído, THPS e DBNPA são classificados como eletrofílicos, ou seja, possuem grupos funcionais aceptores de elétrons que reagem com nucleófilos -SH (tiol) e -NH (amina secundária) de proteínas. ADBAC é um biocida lítico. Os biocidas líticos atuam na bicamada lipídica que compõe a membrana celular bacteriana, onde a permeabilidade é aumentada induzindo a liberação de enzimas autolíticas, que resultam na lise celular (JONES; JOSHI, 2021). A Tabela 1 explora detalhes do modo de ação de cada um dos biocidas citados acima.

Tabela 1 – Modo de ação de biocidas utilizados na indústria do petróleo

Biocida/ CAS number	Molécula	Modo de ação
Glutaraldeído 111-30-8		<p><i>Crosslinking</i> de proteínas por, pelo menos, oito diferentes reações (MIGNEAULT et al., 2004). Efetivo contra biofilmes de BRS (GARDNER; STEWART, 2002). Induz a superexpressão de genes relacionados ao choque térmico de proteínas. A modificação química de proteínas pelo glutaraldeído leva a perda ou modificação da função e a célula bacteriana passa a reconhecer essas proteínas como desnaturadas, similares a proteínas que passaram pelo processo de choque térmico (LEE et al., 2010).</p>
DBNPA 10222-01-2		<p>DBNPA reage com nucleófilos -SH, liberando bromo. Não é considerado um biocida oxidante pois o potencial de oxirredução não é similar à classe (WILLIAMS; MCGINLEY, 2010). DBNPA penetra na parede celular por difusão, atingindo os nucleófilos -SH encontrados em aminoácidos (ex. Glutaciona e cisteína), causando danos irreversíveis à proteínas, interrompendo o transporte na membrana celular e inibindo a respiração e síntese de adenosina trifosfato (ATP) (BARROS; MELO; PEREIRA, 2022). Por outro lado, aminoácidos não sulfurados como a tirosina, aumentaram a eficiência do DBNPA contra <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (UNSAI et al., 2021).</p>
THPS 55566-30-8		<p>Sob condições alcalinas, o THPS libera tris hidroximetil fosfina (THP), que reage com pontes dissulfeto em aminoácidos (KAHRILAS et al., 2015). A sinergia do THPS com moléculas naturais no controle de biofilmes tem sido estudada, e resultados promissores foram encontrados utilizando Peptídeo A – um peptídeo sintético baseado em uma proteína de anêmona do mar (JIA et al., 2019).</p>
ADBAC 68424-85-1		<p>Atinge a membrana citoplasmática bacteriana, interrompendo o transporte de solutos, o movimento flagelar e a geração de ATP. Uma vez em contato com o ADBAC, a expressão celular de genes relacionados a proteínas de membrana é afetada (LEE et al., 2010). O ADBAC tem um efeito sinérgico bem conhecido com o glutaraldeído e ambas as moléculas são comumente usadas na indústria de petróleo (GREENE et al., 2006).</p>
Hipoclorito de sódio 7681-52-9	NaOCl	<p>Promove danos oxidativos à membrana celular, proteínas intracelulares e aminoácidos. O aumento da permeabilidade na membrana celular induz a entrada de NaOCl no citoplasma, danificando organelas (JONES; JOSHI, 2021).</p>

A busca por tratamentos biocidas mais eficientes e com menor toxicidade tem levado à exploração de tecnologias alternativas. A mistura de moléculas é uma das estratégias convencionalmente adotadas para aumentar eficiência de tratamentos biocida. Resultados superiores à aplicação de apenas uma molécula têm sido relatados através de combinações com inibidores metabólicos, como nitrito e nitrato; com aminoácidos e através do uso concomitante de biocidas com diferentes modos de ação, como THPS ou glutaraldeído com ADBAC (GREENE et al., 2006; LI et al., 2016; KEASLER et al., 2017). A utilização de moléculas com diferentes modos de ação aumenta o espectro de atuação do tratamento, tornando-o mais robusto e menos suscetível à problemática relacionada à resistência bacteriana. O produto comercial DEFENDER OG 327B (Dorf Ketal Brasil Ltda.) é um exemplo dessa estratégia. Nesse produto, duas moléculas com efeito sinérgico e distintos modos de ação (segredo industrial) foram combinadas. Uma das moléculas é classificada como um biocida lítico, derivado de guanidina, enquanto a outra é um liberador de formaldeído. O produto é indicado pelo fornecedor para tratamento de água produzida.

Sob a ótica da redução da toxicidade pela exposição a biocidas, moléculas de fontes naturais têm sido exploradas, como os óleos essenciais e biosurfactantes (JIA et al., 2019; SOUZA et al., 2017). Apesar de efetivas e menos tóxicas ao ser humano, essas moléculas necessitam de uma avaliação mais aprofundada quanto ao custo-benefício e à disponibilidade de matéria-prima para suprir as necessidades da indústria de petróleo. Uma alternativa sintética, mas com menor toxicidade comparado aos biocidas convencionalmente utilizados é o *para-cloro-meta-xilenol* (PCMX; CAS number 88-04-0; Figura 4A).

O PCMX é extensivamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmética como preservante e higienizante devido a sua baixa toxicidade dérmica (GUESS; BRUCH, 1986). A ação do PCMX na célula bacteriana se dá através da redução da fluidez da membrana celular, aumentando a rigidez e podendo causar o rompimento da membrana, conforme demonstrado na Figura 4B (POGER; MARK, 2019). Contudo, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão da atuação do PCMX na célula bacteriana. Em relação a eficiência, as informações se restringem

às áreas onde o PCMX é comumente utilizado, não contemplando microrganismos ambientais, como BRS e BPA.

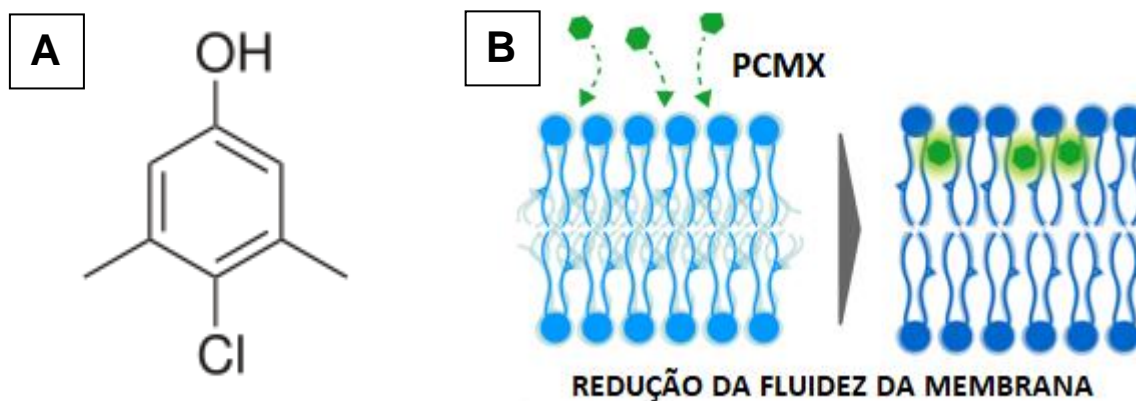


Figura 4 – Estrutura química do PCMX (A) e esquema relacionado ao modo de ação (B) – adaptado de POGGER; MARK, 2019.

3.4 Resistência bacteriana

Biocidas apresentam um espectro de ação estendido e baixa especificidade celular quando comparados a outras classes de antimicrobianos. Mesmo assim, tratamentos mal dimensionados e subdosagens podem induzir no microbioma o aumento da expressão de genes relacionados a mecanismos de resistência intrínsecos, por exemplo, bombas de efluxo, alterações na membrana celular e formação de biofilmes (MAH; O'TOOLE, 2001; CHAPMAN, 2003; SOUZA et al., 2017; MAILLARD, 2018).

O aumento na formação de biofilmes é um dos mecanismos mais comuns de resistência bacteriana. Condições como variações na disponibilidade de nutrientes, na vazão de fluidos e presença de substâncias tóxicas, como biocidas em concentrações inadequadas, induzem ao estresse celular, gerando respostas morfológicas para agrupamento de células em uma superfície (JENNEMAN; DE LEON, 2022). Fluidos aquosos com vazões menores de 1 m³/s, como as encontradas em tanques, induzem ao desenvolvimento de biofilmes pois parte da matriz aquosa e sólidos suspensos ficam parados no fundo do tanque, criando condições em que as bactérias sésseis são expostas a ciclos intermitentes de disponibilidade e limitação de nutrientes (JENNEMAN; DE LEON, 2022). A heterogeneidade do biofilme também é um importante fator de resistência. Associações complexas de

microrganismos incluindo BRS e BPA, produzindo grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares para proteção já foram descritas (VASCONCELLOS et al., 2011; XU; LI; GU, 2016; DAWUDA; TALEB-BERROUANE; KHAN, 2021). O controle de biofilmes é um desafio, uma vez que a penetração de biocidas nessas estruturas é dependente, entre outros fatores, da densidade celular (STEWART; GRAB; DIEMER, 1998) e biofilmes densos requerem concentrações de biocidas até dez vezes maiores em comparação a microrganismos planctônicos (SAUER et al., 2009).

Além da formação de biofilmes devido às condições citadas acima, outras condições ambientais podem aumentar a pressão seletiva e, conseqüentemente, a resistência bacteriana. Campos de petróleo são ambientes altamente estressantes para a população bacteriana devido a condições como alta salinidade, temperaturas e pH extremos. Essas condições afetam o metabolismo bacteriano, gerando períodos de crescimento lento e dormência, modificando o nível energético das células e interferindo na susceptibilidade a biocidas. Condições que induzem à redução do nível energético celular como a presença de inibidores de crescimento bacteriano como nitrito, aumentam a susceptibilidade a biocidas. Condições que induzem ao aumento do nível energético, como variações na salinidade e a presença de biofilmes maduros, reduzem a susceptibilidade (JENNEMAN; DE LEÓN, 2022).

3.5 Ferramentas de análise microbiológica

A fim de selecionar biocidas e concentrações adequadas para cada aplicação e monitorar o tratamento em campo, algumas ferramentas de análise microbiológica podem ser utilizadas. Análises com base em técnicas dependentes de cultura são as mais utilizadas e recomendadas por normas da área. A norma NACE TM0194-2014 - *Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems*, por exemplo, descreve meios de cultura para enumeração de BRS e outras bactérias e protocolos de teste com base nesses meios para a avaliação de biocidas. A norma API-RP-38 - *Recommended Practice for Biological Analysis of Subsurface Injection Waters*, também recomenda diferentes meios de cultura para a enumeração de bactérias. A norma em desenvolvimento NACE TM21495 - *Laboratory Evaluation of the Effect of Biocides on Biofilms* abordará protocolos de avaliação em laboratório

com base em meio de cultura para análise da eficiência de biocidas em biofilmes (WADE et al., 2023).

A avaliação de biofilmes em laboratório pode ser realizada através de técnicas como o crescimento em microplacas e avaliação por espectrofotometria (STEPANOVIĆ et al., 2007) ou ainda sob cupons metálicos e quantificação por Número Mais Provável (NMP) ou diluição seriada (JIA et al., 2017a; WANG et al., 2022). Cupons metálicos podem ser utilizados também como superfície de adesão para biofilmes em campo, bem como para a quantificação de corrosão do sistema (MCGINLEY; VAN DER KRAAN, 2012).

Na prática, a complementação dessas análises com métodos moleculares independentes de cultura pode ser necessária, já que se sabe no mínimo 90% dos microrganismos ambientais não são cultiváveis, especialmente aqueles advindos das condições extremas dos campos de petróleo (SKOHUS; WHITBY, 2019). Diversos estudos reportam a utilização de sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliação da diversidade do microbioma em campos de petróleo (KEASLER et al., 2013; LI et al., 2017b; HIDALGO et al., 2021). Além da diversidade, essa técnica fornece dados relacionados ao possível metabolismo dos microrganismos presentes através da predição funcional. Embora seja uma ferramenta ainda onerosa em termos de custo, a sua utilização pode ser crucial para a definição dos alvos do tratamento com biocidas. Outra ferramenta molecular de importância nesta área de estudo é a técnica PCR em Tempo Real (RT-PCR), com a qual através de oligonucleotídeos específicos para um determinado gene se pode quantificar os microrganismos presentes em uma amostra sem a necessidade de crescimento em meio de cultura e também avaliar a expressão de genes de resistência que possam afetar a eficiência do tratamento em campo (CAMPA et al., 2019a; MARSHALL et al., 2019).

Ferramentas com base em reações enzimáticas também podem ser utilizadas para compor a gama de análises da eficiência de biocidas. A quantificação de ATP fornece dados de concentração total de células viáveis na amostra (HAMMES et al., 2010). Apesar de não ser indicada como ferramenta única devido à abrangência da resposta, pode ser utilizada como técnica complementar, uma vez que devido ao amplo espectro de ação dos biocidas, uma redução na concentração total de células é esperada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de realização do estudo

As estruturas utilizadas para realização desta pesquisa foram o Laboratório de Microbiologia da Dorf Ketal Brasil Ltda., localizado em Nova Santa Rita – RS; o Laboratório de Pesquisa e Análises Microbiológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS-ICBS), o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (UFRGS -ICTA), localizados em Porto Alegre – RS; e a empresa Neopropecta Microbiome, localizada em Florianópolis - SC. As análises envolvendo cultivo foram realizadas na Dorf Ketal, enquanto as preparações para os sequenciamentos de DNA foram realizadas na UFRGS. Os sequenciamentos foram realizados na UFRGS e também na empresa Neopropecta.

4.2 Coletas de água produzida

Cinco amostras de água produzida de quatro diferentes campos de petróleo brasileiros foram utilizadas neste estudo (Tabela 2). Um mapa dos pontos de coleta das amostras pode ser observado no ARTIGO 2 - Figure 1. As amostras foram cedidas pela empresa Dorf Ketal Brasil Ltda. Após a coleta, as amostras foram imediatamente enviadas ao laboratório em isopor com gelo para manutenção das características. O tempo médio de trajeto até o laboratório foi de 48 h.

Tabela 2 – Relação de amostras de água produzida e seus respectivos consórcios utilizados neste estudo.

Bacia	Campo	Artigo 2	Artigo 3
Bacia de Campos – RJ	1	Offshore 1a	CON1
Bacia de Campos – RJ	1	Offshore 1b	
Bacia de Campos – RJ	2		CON2
Bacia do Recôncavo – BA	3	Onshore 1	
Bacia do Recôncavo – BA	4	Onshore 2	CON3

4.3 Avaliação das propriedades físico-químicas da água produzida

As amostras de água produzida foram caracterizadas quanto à salinidade, teor de sulfato, pH e concentração de ATP. A salinidade (teor de cloreto) foi determinada por titulação potenciométrica em Titrino Plus 848 (Metrohm, Suíça). O equipamento foi conectado a um eletrodo de prata, tendo como padrão a solução de AgNO_3 $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A quantificação de sulfato em amostras de água foi realizada através do equipamento ICP-OES Agilent 5100 (Agilent, EUA). Um padrão de enxofre foi usado para determinar o teor de sulfato. O pH foi determinado com um medidor de pH (Hanna Instruments, EUA). A concentração microbiana foi determinada pela quantificação de ATP usando um luminômetro Photonmaster (Luminultra, Canadá) e kit ATP *Quench Gone Aqueous* (Luminultra, Canadá).

4.4 Diversidade microbiana nas amostras de água produzida

4.4.1 Extração de DNA das amostras de água produzida

As amostras de água produzida a serem analisadas foram divididas em duas alíquotas de 100 mL cada e filtradas em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ para a obtenção de duplicatas. O DNA genômico total foi extraído das membranas usando o kit DNEasy PowerSoil (Qiagen, Alemanha). Resumidamente, pequenos pedaços das membranas foram agitados vigorosamente com micropartículas de vidro e tampão de lise. Depois de centrifugadas, o sobrenadante foi aplicado a colunas para a extração de DNA. A coluna foi primeiramente lavada com tampão e por último DNA foi eluído com Tampão Tris/HCl 10mM /EDTA 1mM pH $8,0$. Após eluição, o DNA extraído foi quantificado através do fluorímetro Quantus (Promega, EUA).

4.4.2 Amplificação do gene 16SrRNA

A região conservada V4 do gene 16S rRNA foi amplificada através dos primers 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') e R806 (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3') (CAPORASO et al., 2011). A amplificação por PCR foi realizada através da mistura de aproximadamente $\sim 100 \text{ ng}$ de DNA genômico, $1,0 \text{ mM}$ de MgCl_2 , $0,5 \mu\text{M}$ de cada *primer*, $0,2 \text{ mM}$ de dNTP, 2 U de Platinum Taq DNA *Polymerase High Fidelity* (Life Technologies, EUA) e tampão de reação 1x. Para a amplificação foram utilizados ciclos de 2 min a 94°C seguidos por

25 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C e 1 min a 72°C e um ciclo final 6 min a 72°C, utilizando o equipamento Mastercycler Personal 5332 Thermocycler (Eppendorf, Alemanha). Os amplicons foram purificados utilizando Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, EUA).

4.4.3 Sequenciamento dos amplicons do gene 16S rRNA e análise taxonômica e funcional

O sequenciamento foi conduzido no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, liderado pelo Prof. Dr. Jeverson Frazzon. A plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA) foi utilizada. Os dados gerados foram processados seguindo os protocolos padrão de bioinformática, incluindo controle de qualidade, alinhamento das sequências com remoção de quimeras, classificação taxonômica, agrupamento em *operational taxonomic unit* (OTU) e análise de riqueza e diversidade das comunidades através do software Mothur 1.44.3 (SCHLOSS et al., 2009) usando a base de dados SILVA 138.1 (YILMAZ et al., 2014). As sequências foram depositadas na base de dados do *European Bioinformatic Institute* (EBI) sob o número de acesso ERP121357. A riqueza e abundância foram avaliadas nas amostras de acordo com a α -diversidade e β -diversidade. A predição funcional foi realizada pelo software PICRUSt 2 (YE; DOAK, 2009; LOUCA; DOEBELI, 2018; BARBERA et al., 2019; CZECH; STAMATAKIS, 2019; DOUGLAS et al., 2020) e anotada através do KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2016, 2021; KANEHISA, 2019).

Além disso, a análise de correspondência canônica foi realizada para verificação de padrão de distribuição de microrganismos de acordo com as propriedades abióticas das amostras de água produzida, como pH, teor de cloretos e sulfato. A análise foi conduzida através do pacote R *Vegan: community ecology* na versão 2.5–7.

4.5 Meios de cultura

Meios de cultura específicos foram usados para crescimento de BRS e BPA. Para o crescimento de BPA foi utilizado o meio comercial Caldo Vermelho Fenol (Merck, Alemanha) com adição de 15 g·L⁻¹ de glicose como fonte de carbono. Para

o crescimento de BRS o meio de cultura Postgate E (POSTGATE, 1984; JAIN, 1995) foi utilizado (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição do meio de cultura Postgate E.

Componente	Concentração
KH ₂ PO ₄	0,5 g·L ⁻¹
NH ₄ Cl	1,0 g·L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	1,0 g·L ⁻¹
CaCl ₂ ·6H ₂ O	1,0 g·L ⁻¹
MgCl ₂ ·7H ₂ O	1,8 g·L ⁻¹
lactato de sódio	7,0 mL·L ⁻¹
extrato de levedura	1,0 g·L ⁻¹
ácido ascórbico	0,1 g·L ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g·L ⁻¹
ágar	1,0 g·L ⁻¹

O pH do meio Postgate E foi ajustado para 7,6 com solução de NaOH e como indicador de oxigênio, 4,0 mL·L⁻¹ de solução de resazurina a 0,025% (v/v) esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm foi adicionada. Ambos os meios de cultura foram purgados com N₂ para redução do teor de oxigênio (1 h por L) (BALCH; WOLFE, 1976) e adicionados a frascos selados de 30 mL (Figura 4). Os frascos foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121°C. Antes do uso, 300 µL de uma solução de tioglicolato de sódio 124 g/L previamente esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm foram adicionados aos frascos para ajuste do potencial redox.

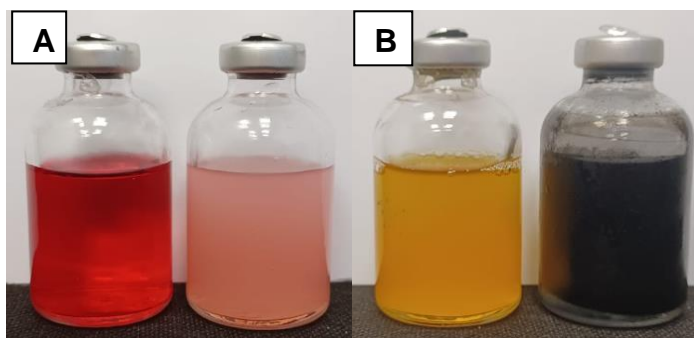


Figura 5 – Meios de cultura Caldo Vermelho Fenol (esquerda) e Postgate E (direita), estéreis (A) e após crescimento bacteriano (B).

O meio de cultura Caldo Vermelho Fenol possui um indicador de pH em sua composição de muda da cor vermelho para amarelo em $\text{pH} < 6,5$. O meio de cultura Postgate E possui FeSO_4 na composição, o que propicia a formação de FeS por BRS, gerando um precipitado preto (POSTGATE, 1984).

4.6 Enriquecimento dos consórcios de BPA e BRS

Inicialmente, uma alíquota de 10% (v/v) de cada amostra de água produzida foi transferida para o respectivo meio de cultura e incubada a 35°C por 7 dias. Por 21 dias, semanalmente, alíquotas de 10% (v/v) das culturas foram transferidas para frascos estéreis para enriquecimento.

Após o enriquecimento, os consórcios de BRS foram mantidos em meio de cultura Postgate B modificado (Postgate 1984; McKenzie e Hamilton 1992). A diferença entre os meios de cultura Postgate E e Postgate B modificado é a ausência de ágar no Postgate B modificado. O ágar exerce um papel de redução da difusão de oxigênio no meio (JAIN, 1995), entretanto, durante as avaliações optou-se pelo Postgate B modificado a fim de reduzir possíveis interferências que pudessem ser causadas pela presença do ágar, uma vez que o ágar também pode ser uma fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano.

4.7 Avaliação da diversidade bacteriana em consórcios de BRS

Os consórcios de BRS foram enviados à empresa Neopropecta Microbiome (Santa Catarina, Brasil) para a realização da extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA e posterior sequenciamento de amplicons. A extração de DNA e preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário. Basicamente, a extração de DNA foi realizada manualmente por *beads* magnéticas com protocolo desenvolvido internamente. O DNA total obtido por cada extração foi quantificado através do fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A região V3/V4 do gene 16S rRNA foi amplificada usando os primers 341F (5'-CCTACGGGRRSGCAGCAG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al. 2011; Y. Wang et al. 2009), seguindo as etapas descritas no item 4.4.2. Entretanto, os *primers* 341F e 806R sequenciam uma região mais ampla do gene 16S rRNA em comparação aos utilizados no item 4.4.2. As bibliotecas de

amplicons foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA). As sequências foram depositadas no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e estão acessíveis sob o ID PRJNA913889. A montagem das sequências, a classificação taxonômica e a α -diversidade e β -diversidade foram realizadas através do software QIIME 2 (BOLYEN et al., 2019). A tabela com as sequências foi utilizada para a predição metabólica através do pipeline PiCRUST2 (YE; DOAK, 2009; LOUCA; DOEBELI, 2018; BARBERA et al., 2019; CZECH; STAMATAKIS, 2019; DOUGLAS et al., 2020). As rotas metabólicas encontradas foram comparadas com o banco de dados MetaCyc (KARP; CASPI, 2011; CASPI et al., 2014, 2020). A preferência pela utilização do MetaCyc em relação ao KEGG nesta etapa deve-se ao fato de que o MetaCyc contém uma base de dados mais completa em relação a rotas metabólicas em comparação ao KEGG (CASPI et al., 2014).

4.8 Biocidas utilizados para avaliação da inibição de consórcios de BRS e BPA e biofilmes de BRS

Os biocidas utilizados nesse estudo foram Glutaraldeído, THPS, DBNPA, ADBAC, PCMX e o biocida comercial DEFENDER OG 327B, que é composto por uma combinação de duas moléculas diferentes das citadas acima (informações cedidas pela Dorf Ketal Ltda.; segredo industrial).

Os biocidas utilizados no estudo foram cedidos pela Dorf Ketal Ltda. e por serem amostras comerciais, possuíam diferentes teores de ativo (m/m). O glutaraldeído possuía 50% de teor de ativo; o THPS, 75%; o DBNPA, 20%; o ADBAC, 50%; o PCMX foi apresentado em forma de pó, com pureza > 99% e o DEFENDER OG 327B, 30%. Para possibilitar a comparação entre os biocidas, os teores de ativo foram equalizados através de diluições com água destilada, realizadas imediatamente antes das análises a fim de garantir a estabilidade das moléculas

O THPS, o glutaraldeído, o DBNPA e o ADBAC são os biocidas mais utilizados para controle microbiológico em campos de petróleo (KORENBLUM et al., 2010; KAHNILAS et al., 2015), enquanto o PCMX representa uma alternativa de menor toxicidade ocupacional frente aos biocidas convencionais. O DEFENDER OG 327B é apresentado como uma alternativa por ser composto por duas moléculas sinérgicas.

4.9 Pré-inóculos de consórcios de BPA e BRS

Para garantir a viabilidade celular das bactérias nos consórcios durante as avaliações de MIC e biofilmes, pré-inóculos foram cultivados. Um volume de 10% (v/v) de cada consórcio foi adicionado ao meio de cultura correspondente: Caldo Vermelho Fenol para BPA e Postgate B modificado para BRS. As culturas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h.

4.10 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de biocidas em consórcios de BPA e BRS

A metodologia utilizada foi baseada na metodologia de CIM em microplacas de 96 poços para avaliação da susceptibilidade a biocidas por bactérias (SCHUG et al., 2020). Os meios de cultura Caldo Vermelho Fenol e Postgate B modificado foram utilizados como matriz para avaliação da susceptibilidade de consórcios de BPA e BRS, respectivamente. Inicialmente, 1% (v/v) de inóculo, cuja preparação foi descrita no item 4.9, foi adicionado em poços contendo 200 µL de meio de cultura. Em seguida, diferentes concentrações dos biocidas foram adicionadas. As microplacas foram incubadas em jarras com gerador de anaerobiose (Probac, Brasil) por 72 h a 35°C. Cada condição foi analisada em triplicata e controles positivos (meio de cultura e inóculo) e negativos (somente meio de cultura) foram utilizados para validação do teste. A CIM foi definida como a menor concentração de biocida que inibiu o crescimento bacteriano.

4.11 Formação e quantificação de biofilmes de consórcios de BRS

Consórcios de BRS foram utilizados para formação de biofilmes em microplacas de 96 poços de poliestireno de fundo plano conforme metodologia previamente descrita (STEPANOVIĆ et al., 2007). Os pré-inóculos a serem utilizados foram preparados conforme descrito no item 4.9. Em cada poço foram adicionados 20 µL de pré-inóculo e 180 µL de meio de cultura Postgate B modificado. As microplacas foram incubadas em jarra com gerador de anaerobiose (Anaerobac, Probac, Brasil) a 35°C por 5 dias.

Após o crescimento dos biofilmes, os poços foram lavados com solução salina estéril 0,85% NaCl para remoção de células não aderidas. Os biofilmes foram fixados

com metanol 99% por 15 min. Após a fixação, 200 μ L de uma solução cristal violeta 2% foi adicionada para corar os biofilmes, que permaneceram em contato por 5 min. O excesso de cristal violeta foi removido com água destilada. Por fim, os biofilmes foram dissolvidos em 200 μ L de etanol 95%. A quantificação foi realizada em um espectrofotômetro com leitor de microplacas (Anthos Zenyth 200rt, Biochrom Ltd.) a 570 nm.

4.11.1 Inibição de biofilmes de consórcios de BRS por biocidas

A inibição da formação de biofilmes dos consórcios de BRS através da exposição aos biocidas THPS, glutaraldeído, PCMX e DEFENDER OG 327B foi avaliada. As concentrações 0,5xCIM, CIM e 2xCIM foram utilizadas. Para a avaliação de inibição, o protocolo descrito no item 4.11 foi seguido, com adição dos biocidas a serem analisados. Cada condição foi avaliada em octuplicada e controles negativo (somente meio de cultura) e positivo (meio de cultura e inóculo) foram utilizados para a validação do teste. As microplacas foram incubadas em jarra com gerador de anaerobiose (Probac, Brasil) por 5 dias a 35°C para formação dos biofilmes. A média da octuplicata foi realizada e a porcentagem de inibição foi calculada através da comparação com o controle positivo.

4.11.2 Erradicação de biofilmes de consórcios de BRS por biocidas

A eficácia dos biocidas na erradicação de biofilmes previamente formados, também foi avaliada. O protocolo de formação e quantificação de biofilmes descrito no item 4.11 foi utilizado. Após a formação dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina estéril (NaCl 0,85% (m/v)). Água do mar sintética (descrita na ASTM D1141) foi utilizada como matriz e 200 μ L foram adicionados em cada poço. Os biocidas foram testados nas concentrações CIM e 2xCIM, que foram adicionadas juntamente à matriz nos poços. Os biofilmes permaneceram expostos aos biocidas por 24 h a 35°C. As condições foram avaliadas em octuplicata. Para cada consórcio de BRS, um controle positivo (biofilme não exposto a biocidas) foi realizado. Dois controles negativos, um utilizando somente água do mar sintética e outro utilizando somente meio de cultura foram utilizados para validação. A porcentagem de erradicação dos biofilmes foi calculada através da comparação com o controle positivo.

5. ARTIGOS

Os resultados obtidos nesse trabalho estão apresentados em forma de artigos científicos publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas internacionais.

Artigo 1: Improving the microbial control in produced water from oil fields: a five steps approach. A ser submetido ao periódico *Journal of Petroleum Technology*.

Artigo 2: The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. Publicado em novembro de 2021 no periódico *Scientific Reports*.

Artigo 3: Enhanced biofilm formation after exposure to biocides by heterogeneous consortia containing sulfate-reducing bacteria. A ser submetido ao periódico *International Biodeterioration and Biodegradation*.

5.1 ARTIGO 1

Melhora do controle microbiano na água produzida de campos de petróleo: uma abordagem de cinco etapas

Gabriela Feix Pereira* ^{1,2}, Taiah Rajeh Rosin ², Bibiana Braga ², Gertrudes Corção¹

¹ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciência Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brasil.

*E-mail: gabriela.pereira@dorfketal.com

² Dorf Ketal – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Rua da Pedreira 559, Nova Santa Rita, RS, 92480-000, Brasil.

Resumo

O controle de problemas microbianos em campos de petróleo pode ser considerado um assunto complexo, uma vez que a diversidade do microbioma e as características físico-químicas da água produzida (AP) originam um perfil único nos campos de petróleo. Devido à pressão seletiva gerada pelo uso incorreto de biocidas, grupos microbianos importantes, como procariotos redutores de sulfato (PRS) e bactérias produtoras de ácido (BPA), têm demonstrado mecanismos de resistência aprimorados. Devido ao aumento da resistência, maiores concentrações de biocidas têm sido necessárias para o controle microbiano adequado em AP. No entanto, biocidas padrão são geralmente moléculas tóxicas e os altos volumes usados para controlar os sistemas podem causar elevado impacto ambiental. A eficácia do tratamento e, conseqüentemente, a redução do impacto ambiental, podem ser melhoradas através de um planejamento adequado. A presente revisão examina os mecanismos de resistência bacteriana em campos de petróleo, apresenta alternativas para substituir os biocidas padrão e sugere uma abordagem de cinco etapas para o planejamento do tratamento: 1) determinação de objetivos do tratamento; 2) bioauditoria para uma visão integrada do sistema; 3) seleção do(s) biocida(s) adequado(s) em laboratório considerando as condições do processo e a suscetibilidade do microbioma; 4) seleção de indicadores-chave de desempenho (KPI) representativos; e 5) monitoramento do tratamento.

Palavras-chave: água produzida, campo de petróleo, biocida, resistência bacteriana, BRS, BPA, monitoramento

5.1.1. Introdução

A água produzida (AP) é o principal resíduo aquoso gerado nos campos de petróleo. O aumento da produção de petróleo ao longo dos anos levou à geração de maiores volumes de AP (Al-Ghouti et al. 2019). O volume gerado de AP está diretamente relacionado à idade do reservatório de óleo e ao método de extração utilizado. Em poços maduros, o volume de AP pode chegar a nove vezes o volume de óleo extraído. Além disso, durante a extração secundária de petróleo, a água do mar pode ser injetada para aumentar a pressão do poço, aumentando ainda mais a geração de AP (Jiménez et al. 2018).

O processo de gerenciamento da AP é um ponto crítico em campos de petróleo, pois a composição físico-química da AP e as condições de processamento e armazenamento podem impulsionar o desenvolvimento de microbiomas específicos. Procariotos redutores de sulfato (PRS) e bactérias produtoras de ácido (BPA) são onipresentes neste ambiente e associados a diversos problemas, como deficiências na integridade das instalações e questões de saúde e segurança dos trabalhadores. O grupo PRS é conhecido principalmente pela geração de sulfeto de hidrogênio (H_2S), um gás corrosivo e tóxico (Muyzer e Stams 2008). BPA, por sua vez, podem liberar metabólitos altamente corrosivos, por ex. ácidos orgânicos, aumentando a biocorrosão (Marciales et al. 2019). Além do impacto independente de PRS e BPA no sistema, já foram relatadas interações sintróficas entre os dois grupos (Dawuda et al. 2021; Xu et al. 2016).

Com o objetivo de mitigar os problemas microbianos em campos de petróleo, sugere-se o uso de biocidas. Os biocidas mais utilizados - mundialmente são o glutaraldeído, 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA), sulfato de tetraquis(hidroximetil)fosfônio (THPS) e cloreto de alquil dimetil benzil amônio (ADBAC) (Kahrilas et al. 2015). No entanto, o planejamento de tratamentos biocidas baseados em moléculas ou concentrações inadequadas, desencadeia a resistência microbiana, diminuindo consideravelmente a eficácia do tratamento e causando aumento dos danos ambientais.

Um planejamento de tratamento biocida adequado deve levar em consideração os dados do processo anterior, a problemática a ser resolvida, o

microbioma da AP e a suscetibilidade aos biocidas. Além do planejamento, o monitoramento por meio de indicadores-chave de desempenho (KPI) alinhados com os objetivos é obrigatório para a efetividade do tratamento (Abbas et al. 2020). Nesta revisão são apresentados os dados relativos à resistência aos biocidas mais utilizados na indústria do petróleo, bem como alternativas para substituir os biocidas padrão. Além disso, uma abordagem de planejamento de tratamento em cinco etapas é sugerida com o objetivo de melhorar a eficácia. As seguintes etapas foram abordadas: 1) determinação de objetivos claros de tratamento; 2) bioauditoria para uma visão integrada do sistema; 3) seleção do(s) biocida(s) adequado(s) em laboratório considerando as condições do processo e a suscetibilidade do microbioma; 4) seleção de indicadores-chave de desempenho (KPI); e 4) monitoramento do tratamento.

5.1.2. Composição do microbioma em AP

A geologia dos reservatórios e os processos de separação de petróleo determinam as características físico-químicas da AP, e essas características selecionam os microrganismos mais adaptados. Em geral, devido às condições extremas nos campos de petróleo, o microbioma é composto principalmente por Bactéria e Archaea, no entanto, foi demonstrada a predominância do domínio Bactéria sobre Archaea (Hidalgo et al. 2021; Sierra-Garcia et al. 2017). Apesar da variação na composição do microbioma, foi revelado um núcleo funcional permanente composto por funções celulares básicas relacionadas à energia e replicação, vias de metanogênese e genes associados à degradação de hidrocarbonetos (Hidalgo et al. 2021).

Devido ao impacto negativo na indústria do petróleo, determinados grupos microbianos são mais estudados do que outros. Procariotos redutores de sulfato (PRS), principalmente bactérias redutoras de sulfato (BRS), estão diretamente relacionadas à geração biológica de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e têm sido associadas à biocorrosão tipo I (Jia et al. 2019a; Rajbongshi e Gogoi 2021). Bactérias produtoras de ácido (BPA), também denominadas bactérias fermentativas, liberam subprodutos de metabolismo corrosivos que podem aumentar a biocorrosão tipo II (Jia et al. 2019a; Marciales et al. 2019). Além do papel único de BRS e BPA, interações sintróficas foram relatadas em populações de campos de petróleo.

Biofilmes heterogêneos compostos por camadas BRS e BPA apresentaram processos dinâmicos de biocorrosão através camadas de biofilme depositadas sob superfícies metálicas de acordo com a tolerância ao oxigênio. Dependendo do sistema, essa deposição pode originar biofilmes espessos, dificultando a penetração do biocida (Xu et al. 2016).

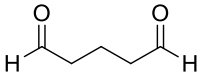
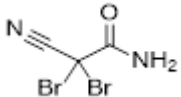
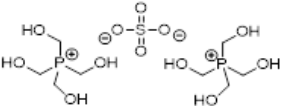
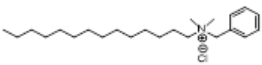
Embora menos relatados, outros grupos microbianos apresentam papel importante nos processos de biocorrosão e deterioração do petróleo, como as archaea metanogênicas e bactérias redutoras de nitrato (BRN) (Ji et al. 2020; Lahme et al. 2019). As arqueias metanogênicas estão envolvidas na biodegradação de hidrocarbonetos, devido a sua capacidade de oxidar o hidrogênio do petróleo bruto e outros componentes, como n-alcanos, benzeno, tolueno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Rajbongshi e Gogoi 2021). BRN reduzem o nitrato a nitrito e podem remover o sulfeto existente no sistema ou inibir a produção de sulfeto na AP (Rajbongshi e Gogoi 2021).

5.1.3. Resistência bacteriana a biocidas

A maneira mais comum de mitigar problemas microbianos em campos de petróleo é a aplicação de biocidas. Os biocidas padrão usados em todo o mundo em AP e seus modos de ação descritos são apresentados na Tabela 1. Os mecanismos de resistência descritos para os biocidas padrão são demonstrados na Tabela 2. Os biocidas usados quase exclusivamente em campos de petróleo (ou seja, THPS e DBNPA) não apresentam o modo de ação e os mecanismos de resistência completamente elucidados. Por outro lado, os biocidas comumente aplicados nas áreas de saúde e alimentação apresentaram alta densidade de estudos.

Dentre os principais mecanismos de resistência descritos estão as bombas de efluxo e a formação de biofilme. As bombas de efluxo são responsáveis por reduzir a concentração de moléculas tóxicas na célula bacteriana. As famílias de bombas de efluxo AcrAB–TolC e MATE são amplamente disseminadas em bactérias e podem conferir aumento na resistência a uma variedade de biocidas, como compostos quaternário de amônio e glutaraldeído. O aumento da expressão de genes relacionados com bombas de efluxo foi identificado durante a exposição a biocidas, suportando a ideia de um importante mecanismo de resistência em bactérias

Tabela 1. Modo de ação dos biocidas mais utilizados em AP

Biocida/ CAS number	Frequência de uso ¹	Molécula	Modo de ação
Glutaraldehyde 111-30-8	27%		Reticulação com proteínas por, pelo menos, 8 reações diferentes (MIGNEAULT et al., 2004). É eficaz contra biofilmes de BRS (GARDNER; STEWART, 2002) e induz a regulação positiva de genes relacionados a proteínas de choque térmico. A modificação química e/ou reticulação pelo glutaraldeído leva a proteínas disfuncionais ou modificadas, que a célula reconhece como semelhantes às proteínas desnaturadas resultantes do choque térmico (LEE et al., 2010).
DBNPA 10222-01-2	24%		DBNPA reage com nucleófilos contendo enxofre liberando bromo – não é considerado um biocida oxidante (WILLIAMS; MCGINLEY, 2010). O DBNPA penetra na parede celular por difusão, atingindo nucleófilos contendo enxofre (por exemplo, aminoácidos - glutationa ou cisteína), causando danos irreversíveis às proteínas, interrompendo o transporte através da membrana celular e inibindo a respiração e a síntese de ATP (BARROS; MELO; PEREIRA, 2022; KAHRILAS et al., 2015) . Por outro lado, aminoácidos não sulfurados, como a D-tirosina, aumentaram a eficiência do DBNPA contra <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (UNSAI et al., 2021).
THPS 55566-30-8	9%		Em condições alcalinas, libera tris (hidroximetil) fosfina (THP), que reage com ligações enxofre-enxofre nos aminoácidos dissulfeto (KAHRILAS et al., 2015). Moléculas sinérgicas naturais foram estudadas e resultados interessantes contra biofilmes foram encontrados usando o Peptídeo A (uma proteína sintética dispersante de biofilme) (JIA et al., 2019) e aminoácidos (LI et al., 2016; XU et al., 2012).
ADBAC 68424-85-1	3%		Composto quaternário de amônio classificado como biocida lítico devido à reação com a membrana citoplasmática, interrompendo o transporte de solutos, o movimento flagelar e a geração de ATP. Uma vez em contato com o ADBAC, a expressão celular de genes relacionados a proteínas de membrana é afetada (LEE et al., 2010). O ADBAC tem um efeito sinérgico bem conhecido com o glutaraldeído. Ambas as moléculas são comumente usadas em campos de petróleo (GREENE et al., 2006).

¹ Data referent to use of biocides in oil wells (KAHRILAS et al., 2015).

Tabela 2. Mecanismos de resistência a biocidas utilizados em AP

Biocida	Mecanismos de resistência bacteriana	
Glutaraldeído	Degradação enzimática	A aldeído desidrogenase (ALDH) converte aldeídos em produtos menos nocivos e facilmente excretados (PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021). Em <i>Escherichia coli</i> , a tolerância ao glutaraldeído aumentou pela superexpressão dos genes ALDH (MERCHEL PIOVESAN PEREIRA et al., 2021).
	Redução da penetração em biofilmes	Biofilmes heterogêneos dificultam a difusão do biocida. O controle de biofilmes bacterianos pelo glutaraldeído exigiu muito mais tempo do que as células planctônicas (EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2016). Genes envolvidos na biossíntese lipídica foram superexpressos durante a exposição ao glutaraldeído e podem contribuir para a resistência do biofilme ao glutaraldeído (VIKRAM; BOMBERGER; BIBBY, 2015; HUANG et al., 2019).
	Bombas de efluxo	As bombas de efluxo foram induzidas após a exposição ao glutaraldeído, entretanto, a inibição química das bombas de efluxo potencializou a ação do glutaraldeído (VIKRAM; BOMBERGER; BIBBY, 2015).
DBNPA	Desconhecido	-
THPS	Formação de biofilmes	O aumento na formação de biofilmes por <i>Desulfovibrio hontreensis</i> foi observada quando a cultura foi exposta a concentrações inadequadas de THPS (XU et al., 2022).
ADBAC	Proteínas da membrana externa	Em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a superexpressão de uma porina da membrana externa (<i>OprR</i>) foi correlacionada com o nível de resistência ao ADBAC (TABATA et al., 2003). Este resultado também foi encontrado para <i>Salmonella enterica</i> (KARATZAS et al., 2008) e <i>Escherichia coli</i> (BORE et al., 2007).
	Estrutura da membrana externa	The presence of the lipopolysaccharide (LPS) layer in Gram negative bacteria present a role in decreasing the efficiency of membrane active agents such as ADBAC (MAILLARD, 2018). Wild-type strains of <i>Escherichia coli</i> with no defect in LPS demonstrated resistance to ADBAC, whereas LPS-deficient strains were sensible to the biocide (OBŁĄK; FUTOMA-KOŁOCH; WIECZYŃSKA, 2021).
	Efflux pumps	Single component efflux pumps (e.g., PACE and SMR families) showed a high prevalence in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to quaternary ammonium compounds, especially ADBAC (MAILLARD, 2018).

(Bedoya et al. 2021; Morente et al. 2013). Além das bombas de efluxo, a formação de biofilmes é um importante mecanismo de resistência, especialmente considerando os campos de petróleo. Campos de petróleo são ambientes altamente estressores, com nutrientes limitados, pH e temperaturas extremas. Estas condições aliadas à presença de biocidas podem iniciar respostas morfológicas na população bacteriana que aderem a uma superfície como estratégia de sobrevivência. Após a fase de adesão do biofilme, a fase de crescimento pode ocorrer em tubulações com baixas taxas de vazão de fluidos ou tanques de armazenamento, onde tanto a água quanto os sólidos suspensos se depositam no fundo e criam condições onde as bactérias sésseis são expostas a ciclos intermitentes de nutrientes e fome, resultando na formação de biofilmes (Jenneman e De León 2022). A resistência dos biofilmes aos biocidas aumenta de acordo com a maturidade do biofilme, atingindo concentrações necessárias para o controle até 10 vezes maiores quando comparado a bactérias planctônicas (Sauer et al. 2009).

5.1.4. Tratamento biocida da AP

O uso de biocidas para controle microbiano em campos de petróleo não tem sido seriamente considerado. Um tratamento biocida inadequado pode contribuir para o aumento da pressão seletiva e, conseqüentemente, da resistência bacteriana (Campa et al. 2019a). Este estudo sugere um planejamento de cinco etapas para tratamentos biocidas, visando reduzir os impactos das variáveis físico-químicas, microbiológicas e de processo na eficácia do tratamento.

5.1.4.1. Etapa 1 – objetivos do tratamento

Várias razões podem fundamentar a aplicação de biocidas em AP, por exemplo o controle da biocorrosão, a redução de H₂S, a limpeza de tanques e dutos, a inibição ou erradicação de biofilme em filtros, etc. Habitualmente, cada uma destas questões está associada a um ou mais grupos de microrganismos. Apesar do amplo espectro de ação dos biocidas em geral, a suscetibilidade dos microrganismos é variável (Pereira et al. 2021), e, por esta razão, é importante determinar os objetivos do tratamento e os alvos microbianos.

5.1.4.2. Etapa 2 - bioauditoria

A etapa de bioauditoria visa investigar a presença de microrganismos ao longo do processo e encontrar os pontos críticos de contaminação. Amostras de diferentes pontos do processo devem ser avaliadas e os pontos que apresentarem maior concentração dos alvos microbianos são candidatos à injeção do biocida.

A bioauditoria consiste na varredura do processo através do uso de ferramentas microbiológicas com abordagens moleculares, enzimáticas ou dependentes de cultura (Paschoalino 2021). Análises baseadas em técnicas dependentes de cultura são as mais utilizadas e recomendadas pelas normas para determinar a concentração bacteriana. A norma NACE TM0194-2014 - Monitoramento de Campo de Crescimento Bacteriano em Sistemas de Petróleo e Gás, por exemplo, descreve o método e meio de cultura para enumeração de SRB e outros grupos bacterianos. A norma API-RP-38 - Prática Recomendada para Análise Biológica de Águas de Injeção Subsuperficial, também recomenda diferentes meios de cultura para a enumeração de diversos grupos bacterianos.

Na prática, complementar essas análises com métodos moleculares, independentes de cultura, pode ser necessário, pois sabe-se que pelo menos 90% dos microrganismos ambientais não são cultiváveis, principalmente aqueles encontrados em campos de petróleo com condições extremas (Skovhus e Whitby 2019). Apesar das desvantagens em termos de custo, o uso de métodos moleculares pode ser crucial para definir os alvos do tratamento biocida. Vários estudos relatam o uso do sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliar a diversidade do microbioma em campos de petróleo (Hidalgo et al. 2021; Keasler et al. 2013; Li et al. 2017). Outra ferramenta molecular importante nesta área de estudo é a técnica de Real Time PCR (RTPCR), que utiliza primers específicos para quantificar um determinado gene e correlacionar com os microrganismos presentes na amostra. Usando esta ferramenta também pode ser avaliada a expressão de genes de resistência que podem afetar a eficácia do tratamento biocida (Campa et al. 2019b).

Ferramentas enzimáticas também podem ser usadas na etapa de bioauditoria. A quantificação de ATP fornece dados sobre a concentração total de células viáveis

na amostra (HAMMES et al., 2010). Apesar de não ser indicada como ferramenta única pela abrangência da resposta, pode ser utilizada como técnica complementar.

5.1.4.3. Etapa 3 – *Screening* dos biocidas em laboratório

Além da composição microbiológica, os dados físico-químicos dos pontos de injeção candidatos também precisam ser considerados antes da triagem de biocidas, uma vez que a estabilidade química de biocidas sintéticos pode ser prejudicada por determinadas condições, por exemplo, pH, temperatura e presença de produtos químicos reativos (Williams and Schultz 2015), e a desestabilização química pode afetar a eficácia do tratamento. A Tabela 3 mostra os principais interferentes conhecidos na estabilidade química dos biocidas. Considerando a estabilidade química, esta etapa visa encontrar os biocidas mais eficientes nas condições do sistema.

Os métodos padrão mencionados no passo 2 (item 3.2.) também descrevem “*challenge tests*” para determinar a suscetibilidade de grupos bacterianos planctônicos a biocidas. A norma NACE TM21495 - *Laboratory Evaluation of the Effect of Biocides on Biofilms*, abordará protocolos de avaliação laboratorial baseados em meio de cultura para análise da eficiência de biocidas em biofilmes (Wade et al. 2023). Além disso, os biofilmes podem ser avaliados através do crescimento em microplacas de 96 poços e lidos por espectrofotometria (Stepanović et al. 2007), ou sob cupons de metal e quantificados por Número Mais Provável (MPN) (Jia et al. 2017a; Wang et al. 2022).

Tabela 3. Principais fatores físico-químicos que afetam a estabilidade química dos biocidas convencionais

Biocida		Interferentes
DBNPA	pH	Prontamente hidrolisado sob condições ácidas e alcalinas. A meia-vida aproximada do DBNPA é de 24 h em pH 7,5, 2 h em pH 8,0, 15 min em pH 9,0 (Loiko et al., 2022).
	Temperatura	A meia-vida do DBNPA reduz consideravelmente em temperaturas > 40°C (Gao et al., 2001).
	Presença de sulfetos	DBNPA é reduzido por diversas espécies contendo enxofre, como sulfito, bissulfito, sulfeto, fenil, mercaptano e tiosulfato (Chervenak, 2000).
THPS	pH	O THPS não é indicado para uso em sistemas com pH > 8.0 (Moiseev and James, 2020).
	Alto teor de ferro	O THPS é quelante de Fe ²⁺ , reduzindo seu o efeito como biocida. Concentrações mais altas podem ser necessárias em sistemas com alto teor de FeS (Lu et al., 2022).
ADBAC	Espécies aniônicas	Uma interação entre o ADBAC (um surfactante catiônico) e espécies aniônicas pode ser esperada, podendo interferir na eficácia biocida (Yuli et al., 2023).
Glutaraldeído	pH	Polimeriza rapidamente a pH > 9-10 (Migneault et al., 2004).
	Aminas primárias	Incompatível com aminas primárias (Migneault et al., 2004).

5.1.4.4. Etapa 4 - Seleção dos principais indicadores de desempenho (KPI)

Indicadores chave de desempenho (KPI) são usados para quantificar a eficácia do tratamento com biocidas em campos petrolífero (Johnson 2017; Keasler et al. 2017), e o uso de KPIs apropriados é um dos principais pontos para o sucesso do tratamento (Jiang et al. 2021). A seleção do KPI depende do problema a ser resolvido (etapa 1; item 3.1.), dos alvos microbianos (etapa 2; item 3.2.) e dos biocidas selecionados para uso (etapa 3; item 3.3.). Este estudo classificou possíveis KPIs de acordo com abordagens diretas e indiretas. KPIs diretos referem-se a dados relacionados ao crescimento microbiano e biocidas. Exemplos de KPI direto são a concentração de células planctônicas ou sésseis nos sistemas e o conteúdo biocida residual. Os KPIs indiretos estão relacionados à integridade do sistema e dados físico-químicos, por exemplo, taxas de corrosão, quantificação de subprodutos do metabolismo corrosivo, teor de H₂S, pressão em tubulações e filtros de água, entre outros.

5.1.4.5. Etapa 5 – Monitoramento do tratamento

O monitoramento de KPIs selecionados apoia a tomada de decisões relacionadas ao tratamento (Johnson 2017). Relacionado ao KPI direto, o crescimento microbiano pode ser monitorado por diferentes métodos, desde técnicas dependentes de cultura até técnicas moleculares (Paschoalino 2021). Os métodos de quantificação microbiana descritos na etapa 2 (item 3.2.) também podem ser utilizados durante o monitoramento. Os biocidas residuais podem ser analisados por HPLC-MS/MS (Paijens et al. 2020). Quanto ao KPI indireto, o teor de H₂S pode ser monitorado por meio de métodos de titulação (Nasser et al. 2021), e as taxas de corrosão podem ser monitoradas por cupons metálicos instalados ao longo do sistema, sondas de resistência elétrica, instrumentos de polarização linear ou métodos equivalentes (Al- Janabi 2020).

5.1.5. Biocidas alternativos

A aplicação de moléculas alternativas aos biocidas sintéticos tem sido estudada. Os óleos essenciais, principalmente emulsionados, a fim de aumentar a dispersão na AP, são uma abordagem recente. Citral, linalol, eugenol e geraniol demonstraram eficiência contra um consórcio de BRS de AP, com uma concentração

inibitória mínima (CIM) inferior a 78 ppm, sendo consideradas alternativas para reduzir o uso de biocidas sintéticos segundo os autores (Souza et al. 2017). O extrato de alho é outra alternativa que apresentou resultados promissores na inibição de biofilmes, com CIM de 100ppm (Parthipan et al. 2018). Além dos óleos essenciais, os líquidos iônicos, como o cloreto de 1-butilpirrolidínio ([BPm1,1]Cl), são alternativas ecologicamente corretas, e os resultados têm mostrado ação tanto biocida quanto na inibição da corrosão em aço carbono (Abbas et al. 2019). Apesar da sua eficiência e características *ecofriendly*, estas alternativas carecem de uma avaliação mais detalhada no que diz respeito à disponibilidade de volumes necessários para o tratamento da AP e aos custos associados.

O efeito de diversos compostos naturais como biocidas é fato, mas o principal desafio é viabilizar sua aplicação em sistemas industriais. A síntese química inspirada em compostos naturais pode ser uma alternativa (Melander et al. 2020). Um exemplo é a proteína Equinatoxina II proveniente da anêmona do mar *Actinia equina*, que foi mimetizada a um peptídeo cíclico sintético (“Peptídeo A”) (Jia et al. 2019b; Zlotkin 2016). O Peptídeo A demonstrou atividade na dispersão de biofilmes, conservando a propriedade do representante natural. Avaliações adicionais foram realizadas usando o Peptídeo A como um potencializador do biocida THPS e resultaram em uma redução adicional de 1 log nas contagens de células sésseis de BRS e BPA, quando comparado ao THPS sozinho (Wang et al. 2022).

Outra forma de aumentar a eficácia do tratamento é adicionar moléculas sinérgicas aos tratamentos biocidas sintéticos convencionais. D-aminoácidos como D-metionina, D-tirosina, D-triptofano e D-leucina foram estudados como dispersores de biofilme, devido ao seu papel no mecanismo de *quorum sensing* (Idrees et al. 2020). Os aminoácidos mostraram resultados promissores quando combinados em baixas concentrações com THPS, isotiazolinonas e ADBAC (Jia et al. 2017a; Jia et al. 2017b; Liu et al. 2020).

Experimentos de laboratório e de campo demonstraram a eficácia da aplicação de nitrato ou nitrito em adição aos biocidas durante o controle de BRS. Nitrato e nitrito atuam como inibidores do crescimento de BRS devido a um processo de exclusão competitiva, onde BRN e BRS competem por substrato (Kamarisima et al. 2019). A injeção contínua de nitrato além dos pulsos de THPS foi implementada

em um campo de petróleo no Brasil. O tratamento controlou a produção de H₂S por 34 meses, em comparação com 17 meses quando o THPS sozinho foi usado (Jurelevicius et al. 2021). Apesar dos resultados promissores, questões remanescentes tornam o método controverso, por exemplo, a determinação de uma concentração efetiva de nitrato e o período ideal para injeção (Kamarisima et al. 2019). Ao contrário do nitrato e do nitrito, outros inibidores do crescimento de BRS estão envolvidos na diminuição da função respiratória em BRS, como a antraquinona (Burger 2004) e o ácido nitroso livre (Jiang et al. 2013).

5.1.6. Conclusões

Esta revisão explora aspectos microbiológicos em campos de petróleo e como melhorar a eficácia dos tratamentos com biocidas. A variável composição físico-química do AP contribui para a presença de uma população microbiana diversa; no entanto, PRS e BPA são grupos onipresentes em campos de petróleo. Tratamentos biocidas inadequados podem levar a populações mais resistentes com mecanismos mal compreendidos. Alternativas para substituir os biocidas sintéticos têm sido desenvolvidas, mas em uma visão holística, considerando não só a eficiência, mas também a disponibilidade dos volumes necessários para o tratamento da AP e o respectivo custo, mais estudos são necessários para estabelecer opções viáveis.

Com foco em melhorar o controle microbiano na AP e reduzir interferências devido à composição físico-química e microbiológica, esta revisão sugere uma abordagem de cinco etapas para tratamentos biocidas. Os objetivos do tratamento devem ser claros antes do planejamento, e uma bioauditoria é desejável para entender a composição do microbioma e selecionar alvos microbianos precisos. Depois de selecionar os alvos microbianos, uma triagem de biocidas em laboratório pode demonstrar quais biocidas são adequados considerando sua eficiência e estabilidade química. Por fim, KPIs representativos de acordo com os objetivos do tratamento podem ser monitorados por meio de várias técnicas descritas nesta revisão.

5.1.7. References

Abbas MA, Zakaria K, El-Shamy AM, El Abedin SZ. Utilization of 1-Butylpyrrolidinium Chloride Ionic Liquid as an Eco-Friendly Corrosion Inhibitor and Biocide for Oilfield Equipment: Combined Weight Loss, Electrochemical and SEM Studies. *Zeitschrift für Phys. Chemie. De Gruyter*; 2019;

Abbas RH, Hernandez JF, Al Abbas FM. Holding Water — A Corrosion Management Program in a Vast Seawater Injection System. *Corros. 2020. 2020. p. NACE-2020-14764.*

Al-Ghouti MA, Al-Kaabi MA, Ashfaq MY, Da'na DA. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *J. Water Process Eng.* 2019.

Al-Janabi YT. An overview of corrosion in oil and gas industry: upstream, midstream, and downstream sectors. *Corros. Inhib. Oil Gas Ind. Wiley Online Library*; 2020;1–39.

Barros AC, Melo LF, Pereira A. A Multi-Purpose Approach to the Mechanisms of Action of Two Biocides (Benzalkonium Chloride and Dibromonitropropionamide): Discussion of *Pseudomonas fluorescens*' Viability and Death. *Front. Microbiol.* 2022;13:842414.

Bedoya K, Niño J, Acero J, Cabarcas F, Alzate JF. Assessment of the microbial community and biocide resistance profile in production and injection waters from an Andean oil reservoir in Colombia. *Int. Biodeterior. Biodegradation [Internet]*. 2021;157:105137. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830520310684>

Bore E, Hebraud M, Chafsey I, Chambon C, Skjæret C, Moen B, et al. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology. Microbiology Society*; 2007;153(4):935–46.

Burger ED. Synergism of anthraquinone with an oilfield biocide to inhibit sulfide generation from sulfate-reducing bacteria. *Corros. 2004. OnePetro*; 2004.

Campa MF, Wolfe AK, Techtmann SM, Harik A-M, Hazen TC. Unconventional oil and gas energy systems: an unidentified hotspot of antimicrobial resistance? *Front. Microbiol. Frontiers Media SA*; 2019;10:2392.

Chervenak MC. The environmental fate of commonly used oxidizing and non-oxidizing biocides: reactions of industrial water biocides within the system. *Int Env. Conf Exhib. Citeseer*; 2000. p. 579–94.

Dawuda A-W, Taleb-berrouane M, Khan F. A probabilistic model to estimate microbiologically influenced corrosion rate. *Process Saf. Environ. Prot. Elsevier*; 2021;148:908–26.

El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. Elsevier*; 2016;47:60–71.

Gao Y, Zhou P, Lin YE, Vidic RD, Stout JE. Efficacy of DBNPA against *Legionella pneumophila*: experimental results in a model water system. *ASHRAE Trans. American Society of Heating, Refrigeration and Air Conditioning Engineers, Inc.*; 2001;107:184.

Gardner LR, Stewart PS. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* [Internet]. 2002 Dec 1;29(6):354–60. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000284>

Greene EA, Brunelle V, Jenneman GE, Voordouw G. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;

Hidalgo KJ, Sierra-Garcia IN, Zafra G, de Oliveira VM. Genome-Resolved Meta-Analysis of the Microbiome in Oil Reservoirs Worldwide. *Microorg.* . 2021.

Huang L, Wang M, Mo T, Liu M, Biville F, Zhu D, et al. Role of LptD in Resistance to Glutaraldehyde and Pathogenicity in *Riemerella anatipestifer* [Internet]. *Front. Microbiol.* . 2019. p. 1443. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01443>

Idrees M, Mohammad AR, Karodia N, Rahman A. Multimodal role of amino acids in microbial control and drug development. *Antibiotics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020;9(6):330.

Jenneman GE, De León KB. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. *Int. Biodeterior. Biodegradation. Elsevier*; 2022;169:105385.

Ji J-H, Liu Y-F, Zhou L, Irfan M, Mbadanga SM, Pan P, et al. Methanogenic biodegradation of C13 and C14 n-alkanes activated by addition to fumarate. *Int. Biodeterior. Biodegradation. Elsevier*; 2020;153:104994.

Jia R, Unsal T, Xu D, Lekbach Y, Gu T. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2019a.

Jia R, Yang D, Abd Rahman H Bin, Gu T. Laboratory testing of enhanced biocide mitigation of an oilfield biofilm and its microbiologically influenced corrosion of carbon steel in the presence of oilfield chemicals. *Int. Biodeterior. Biodegradation [Internet]*. 2017a;125:116–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830517308508>

Jia R, Yang D, Dou W, Liu J, Zlotkin A, Kumseranee S, et al. A sea anemone-inspired small synthetic peptide at sub-ppm concentrations enhanced biofilm mitigation. *Int. Biodeterior. Biodegradation [Internet]*. 2019b;139:78–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830518307637>

Jia R, Yang D, Li Y, Xu D, Gu T. Mitigation of the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm using alkyldimethylbenzylammonium chloride enhanced by d-amino acids. *Int. Biodeterior. Biodegradation [Internet]*. 2017b;117:97–104. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516308162>

Jiang G, Keating A, Corrie S, O'halloran K, Nguyen L, Yuan Z. Dosing free nitrous acid for sulfide control in sewers: results of field trials in Australia. *Water Res. Elsevier*; 2013;47(13):4331–9.

Jiang W, Lin L, Xu X, Cheng X, Zhang Y, Hall R, et al. A critical review of analytical methods for comprehensive characterization of produced water. *Water. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2021;13(2):183.

Jiménez S, Micó MM, Arnaldos M, Medina F, Contreras S. State of the art of produced water treatment. *Chemosphere.* 2018. p. 186–208.

Johnson RJ. Combining Advanced Biocide Evaluation and Microbial Monitoring to Optimise Microbial Control. SPE Int. Conf. Oilf. Chem. OnePetro; 2017.

Jurelevicius D, Ramos L, Abreu F, Lins U, de Sousa MP, dos Santos VVCM, et al. Long-term souring treatment using nitrate and biocides in high-temperature oil reservoirs. *Fuel*. 2021;288:119731.

Kahrilas GA, Blotevogel J, Stewart PS, Borch T. Biocides in Hydraulic Fracturing Fluids: A Critical Review of Their Usage, Mobility, Degradation, and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* [Internet]. American Chemical Society; 2015 Jan 6;49(1):16–32. Available from: <https://doi.org/10.1021/es503724k>

Kamarisima, Miyanaga K, Tanji Y. The utilization of aromatic hydrocarbon by nitrate- and sulfate-reducing bacteria in single and multiple nitrate injection for souring control. *Biochem. Eng. J.* [Internet]. 2019;143:75–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X18304273>

Karatzas KAG, Randall LP, Webber M, Piddock LJ V, Humphrey TJ, Woodward MJ, et al. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol. Am Soc Microbiol*; 2008;74(5):1508–16.

Keasler V, Bennett B, Keller C, Whalen P, Cairns J, De Paula RM. Expanding the microbial monitoring toolkit: Evaluation of traditional and molecular monitoring methods. *Int. Biodeterior. Biodegradation. Elsevier*; 2013;81:51–6.

Keasler V, De Paula RM, Nilsen G, Grunwald L, Tidwell TJ. Biocides overview and applications in petroleum microbiology. *Trends oil gas Corros. Res. Technol. Elsevier*; 2017;539–62.

Lahme S, Enning D, Callbeck CM, Menendez Vega D, Curtis TP, Head IM, et al. Metabolites of an oil field sulfide-oxidizing, nitrate-reducing *Sulfurimonas* sp. cause severe corrosion. *Appl. Environ. Microbiol. Am Soc Microbiol*; 2019;85(3):e01891-18.

Lee MHP, Caffrey SM, Voordouw JK, Voordouw G. Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;

Li X-X, Mbadinga SM, Liu J-F, Zhou L, Yang S-Z, Gu J-D, et al. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *Int. Biodeterior. Biodegradation. Elsevier*; 2017;120:170–85.

Li Y, Jia R, Al-Mahamedh HH, Xu D, Gu T. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. *Front. Microbiol. Frontiers*; 2016;7:896.

Liu X, Li Z, Fan Y, Lekbach Y, Song Y, Xu D, et al. A mixture of D-amino acids enhances the biocidal efficacy of CMIT/MIT against corrosive *Vibrio harveyi* biofilm. *Front. Microbiol. Frontiers Media SA*; 2020;11.

Loiko N, Kanunnikov O, Tereshkina K, Pankratov T, Belova S, Botchkova E, et al. Biocides with Controlled Degradation for Environmentally Friendly and Cost-Effective Fecal Sludge Management. *Biology (Basel)*. MDPI; 2022;12(1):45.

Lu H, Brooks J, Margan S, Evans P, Shi W. FeS Scale Control and Prevention in Water Injection Systems. SPE Int. Oilf. Scale Conf. Exhib. OnePetro; 2022.

Maillard J-Y. Resistance of bacteria to biocides. *Microbiol. Spectr. Am Soc Microbiol*; 2018;6(2):2–6.

Marciales A, Peralta Y, Haile T, Crosby T, Wolodko J. Mechanistic microbiologically influenced corrosion modeling—A review. *Corros. Sci.* 2019.

Melander RJ, Basak AK, Melander C. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Nat. Prod. Rep. Royal Society of Chemistry*; 2020;37(11):1454–77.

Merchel Piovesan Pereira B, Adil Salim M, Rai N, Tagkopoulos I. Tolerance to Glutaraldehyde in *Escherichia coli* Mediated by Overexpression of the Aldehyde Reductase YqhD by YqhC [Internet]. *Front. Microbiol.* . 2021. p. 1622. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.680553>

Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques. Future Science*; 2004;37(5):790–802.

Moiseev D V, James BR. Tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium salts: Their properties, hazards and toxicities. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem. Taylor & Francis*; 2020;195(4):263–79.

Morente EO, Fernández-Fuentes MA, Burgos MJG, Abriouel H, Pulido RP, Galvez A. Biocide tolerance in bacteria. *Int. J. Food Microbiol. Elsevier*; 2013;162(1):13–25.

Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008.

Nasser B, Saito Y, Alarawi M, Al-Humam AA, Mineta K, Gojobori T. Characterization of microbiologically influenced corrosion by comprehensive metagenomic analysis of an inland oil field. *Gene. Elsevier*; 2021;774:145425.

Obląg E, Futoma-Kołoch B, Wiczyńska A. Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* [Internet]. 2021;37(2):22. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02978-0>

Pajens C, Frère B, Caupos E, Moilleron R, Bressy A. Determination of 18 biocides in both the dissolved and particulate fractions of urban and surface waters by HPLC-MS/MS. *Water, Air, Soil Pollut. Springer*; 2020;231(5):210.

Parthipan P, Elumalai P, Narenkumar J, Machuca LL, Murugan K, Karthikeyan OP, et al. *Allium sativum* (garlic extract) as a green corrosion inhibitor with biocidal properties for the control of MIC in carbon steel and stainless steel in oilfield environments. *Int. Biodeterior. Biodegradation* [Internet]. 2018;132:66–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051730375X>

Paschoalino M. Influence of Chemical Treatments and Topsides Processes on the Dominant Microbial Communities at Conventional Oilfields. *Microb. Bioinforma. Oil Gas Ind. CRC Press*; 2021. p. 81–97.

Pereira GF, Pilz-Junior HL, Corção G. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*; 2021;11(1):1–12.

Rajbongshi A, Gogoi SB. A review on anaerobic microorganisms isolated from oil reservoirs. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Springer; 2021;37(7):1–19.

Sauer K, Thatcher E, Northey R, Gutierrez AA. Neutral super-oxidised solutions are effective in killing *P. aeruginosa* biofilms. *Biofouling.* Taylor & Francis; 2009;25(1):45–54.

Sierra-Garcia IN, Dellagnezze BM, Santos VP, Capilla R, Neto EVS, Gray N, et al. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales. *Extremophiles.* Springer; 2017;21(1):211–29.

Skovhus TL, Whitby C. *Oilfield Microbiology.* CRC Press; 2019.

Souza PM, Goulart FR, Marques JM, Bizzo HR, Blank AF, Groposo C, et al. Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria in Produced Water from the Petroleum Industry Using Essential Oils. *Mol.* . 2017.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, BONAVENTURA GDI, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis.* Wiley Online Library; 2007;115(8):891–9.

Tabata A, Nagamune H, Maeda T, Murakami K, Miyake Y, Kourai H. Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antimicrob. Agents Chemother.* Am Soc Microbiol; 2003;47(7):2093–9.

Unsal T, Wang D, Kumseranee S, Punpruk S, Mohamed ME-S, Saleh MA, et al. Assessment of 2, 2-Dibromo-3-Nitrilopropionamide Biocide Enhanced by D-Tyrosine against Zinc Corrosion by a Sulfate Reducing Bacterium. *Ind. Eng. Chem. Res.* ACS Publications; 2021;60(10):4009–18.

Vikram A, Bomberger JM, Bibby KJ. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;

Wade SA, Webb JS, Eckert RB, Jenneman GE, Rice SA, Skovhus TL, et al. The role of standards in biofilm research and industry innovation. *Int. Biodeterior. Biodegradation* [Internet]. 2023;177:105532. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830522001603>

Wang D, Unsal T, Kumseranee S, Punpruk S, Saleh MA, Alotaibi MD, et al. Mitigation of carbon steel biocorrosion using a green biocide enhanced by a nature-mimicking anti-biofilm peptide in a flow loop. *Bioresour. Bioprocess.* [Internet]. 2022;9(1):67. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00553-z>

Williams TM, McGinley HR. Deactivation of industrial water treatment biocides. *Corros.* 2010. OnePetro; 2010.

Xu D, Li Y, Gu T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. *Bioelectrochemistry.* 2016;

Xu D, Wen J, Fu W, Gu T, Raad I. D-amino acids for the enhancement of a binary biocide cocktail consisting of THPS and EDDS against an SRB biofilm. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Springer; 2012;28(4):1641–6.

Xu L, Guan F, Ma Y, Zhang R, Zhang Y, Zhai X, et al. Inadequate dosing of THPS treatment increases microbially influenced corrosion of pipeline steel by inducing biofilm growth of *Desulfovibrio hontreensis* SY-21. *Bioelectrochemistry* [Internet]. 2022;108048. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156753942100311X>

Yuli I, Tzafirir I, Salama P. Compatibility Investigation of Cationic Surfactants with Anionic Species. *Cosmetics*. MDPI; 2023;10(2):45.

Zlotkin A. Dispersion and detachment of cell aggregates. Google Patents; 2016.

5.2. ARTIGO 2

The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields

Gabriela Feix Pereira ^{1,2}, Harry Luiz Pilz-Junior ¹, Gertrudes Corção^{1*}

¹ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

*E-mail: corcao@ufrgs.br.

² Dorf Ketal Research and Development Center, Rua da Pedreira 559, Nova Santa Rita, RS, 92480-000, Brazil.

Abstract

Extreme conditions and the availability of determinate substrates in oil fields promote the growth of a specific microbiome. Sulfate-reducing bacteria (SRB) and acid-producing bacteria (APB) are usually found in these places and can harm important processes due to increases in corrosion rates, biofouling, and reservoir biosouring. Biocides such as glutaraldehyde, dibromo-nitrilopropionamide (DBNPA), tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS) and alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC) are commonly used in oil fields to mitigate uncontrolled microbial growth. The aim of this study was to evaluate the differences among microbiome compositions and their resistance to standard biocides in four different Brazilian produced water samples, two from a Southeast Brazil offshore oil field and two from different Northeast Brazil onshore oil fields. Microbiome evaluations were carried out through 16S rRNA amplicon sequencing. To evaluate the biocidal resistance, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the standard biocides were analyzed using enriched consortia of SRB and APB from the produced water samples. The data showed important differences in terms of taxonomy but similar functional characterization, indicating the high diversity of the microbiomes. The APB and SRB consortia demonstrated varying resistance levels against the biocides. These results will help to customize biocidal treatments in oil fields.

Keywords: biocide, biocidal resistance, SRB, APB, amplicon sequencing, oilfield.

5.2.1. Introduction

In oil fields, systems containing water are prone to uncontrolled microbial growth, which may trigger serious problems. Uncontrolled microbial activity can increase oil contamination, microbially induced corrosion, biofouling and the generation of dangerous metabolic byproducts, such as hydrogen sulfide (H₂S), known as biosouring (ISMAIL et al., 2017; KANNAN et al., 2018).

In mature fields, the secondary recovery of oil requires water/gas injection to push the oil from the well to the platform surface. To decrease storage costs, produced water generated during oil extraction is commonly used, but it first receives a biocidal treatment to prevent microbial contamination in the well. Among the most employed biocides worldwide used in produced water treatment are glutaraldehyde (27% of the market share), dibromo-nitrilopropionamide (DBNPA; 24% of the market share), tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS; 9% of the market share) and alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC; 3% of the market share)(KAHRILAS et al., 2015). The Brazilian O&G industry usually employs THPS (batch application) and/or ADBAC (continuous low concentration application) as chemical treatments for produced water (KORENBLUM et al., 2010).

Due to the extreme environmental conditions found in oil fields, such as high temperature, low oxygen content and high salinity, some specific groups of bacteria are present. Among them, the main biocide targets are acid-producing bacteria (APB), also known as fermentative bacteria, and sulfate-reducing bacteria (SRB) (LI et al., 2017b). APB produces several types of organic and inorganic acids and other metabolites under anaerobic conditions. The generated metabolites interact with steel surfaces, affecting electrochemical reactions and, consequently, the corrosion rate. The SRB group, in addition to increasing corrosion, is known to generate H₂S, a toxic, corrosive and inflammable gas, which causes concerns in terms of oil field structural integrity and worker safety (RAJBONGSHI; GOGOI, 2021).

The application of similar treatments over the years without technical monitoring selects those microorganisms with high biocide resistance levels (CHAPMAN, 2003). Factors such as microbiome composition, treatment history and resistance level need to be observed to choose the best method for microbial control.

Therefore, the aim of this study was to evaluate four different produced water samples in terms of their microbiome compositions and metabolic activities. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of glutaraldehyde, DBNPA, THPS and ADBAC against SRB and APB consortia obtained from produced water samples were determined.

5.2.2. Materials and Methods

5.2.2.1. Produced water samples and biocides

Four samples of produced water from three Brazilian oil fields were used in this study. Two samples were collected in different wells from the same offshore field located in the state of Rio de Janeiro (Offshore 1a and Offshore 1b), and two samples were collected from different fields in the state of Bahia (Onshore 1 and Onshore 2) (Figure 1). Sampling flasks were filled to the top to avoid oxygen contamination. The samples were kept refrigerated and in the dark during transportation and were filtered immediately after the arrived, within 72 h by a 0.22 μm filter. The filters were maintained at -20°C before analysis. Dorf Ketel Brazil Ltda. provided the produced water and biocide samples (glutaraldehyde, DBNPA, THPS and ADBAC).

5.2.2.2. Produced water characterization

Produced water samples were characterized immediately after receipt according to salinity, sulfate content, pH, and microbial concentration. Salinity (chloride content) was determined by potentiometric titration in a Titrino Plus 848 (Metrohm, Switzerland). The equipment was connected to a silver electrode, and $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ solution was used as the standard. Sulfate quantification in water samples was carried out by the ICP-OES Agilent 5100 technique (Agilent, USA). A sulfur standard was used to determine the sulfate content. pH was determined with a pH meter (Edge, Hanna Instruments). The microbial concentration was determined by ATP quantification using a luminometer (Photonmaster, Luminultra) and specific reagent kit (ATP Quench Gone Aqueous Kit, Luminultra).

5.2.2.3. DNA extraction and quality check

Two 100 mL aliquots of each sample were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ membranes to obtain duplicates. Total genomic DNA was extracted from each membrane using a

DNEasy PowerSoil Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. The extracted DNA was quantified by a Quantus fluorimeter (Promega, USA).

5.2.2.4. 16S rRNA gene amplification and sequencing

The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using primers 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') and R806 (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3'), both modified to contain an Illumina adapter region (CAPORASO et al., 2011). PCR amplification was carried out by mixing ~100 ng of genomic DNA, 1.0 mM MgCl₂, 0.5 μM of each primer, 0.2 mM of dNTP, 2 U Platinum *Taq DNA* Polymerase High Fidelity (Life Technologies, USA), and 1x reaction buffer. The thermal cycling conditions for amplification were an initial denaturation (2 min at 94°C) followed by 25 cycles of amplification (45 s at 94°C, 45 s at 55°C and 1 min at 72°C) and a final extension cycle (6 min at 72°C) in a Mastercycler Personal 5332 Thermocycler (Eppendorf, Germany).

Amplicons were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) following the manufacturer's instructions. Sequencing was conducted on the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., USA) with a v2 500 kit, which generates paired end reads of 250 bp.

5.2.2.5. Taxonomic profiling of bacterial communities

All the data were processed following standard bioinformatics pipelines, including quality control, sequence alignment (with chimera removal), taxonomic classification, operational taxonomic unit (OTU) clustering and community richness analysis (Mothur 1.44.3 (SCHLOSS et al., 2009)) using the SILVA database (YILMAZ et al., 2014) (release 138.1). Amplicon sequences are available at the European Bioinformatic Institute (EBI) under the EBI Metagenomic Database with accession number ERP121357.

Functional abundances were predicted through PICRUST 2 software (DOUGLAS et al., 2019) and annotated by KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2016, 2021; KANEHISA, 2019). The predicted functional abundances were scaled based on the abundance of taxa from which they were

derived. Thus, high taxonomic abundances usually generate high functional abundances.

5.2.2.6. Composition of bacterial communities

Richness and bacterial abundance were examined in each sample for α -diversity and β -diversity with multivariate analysis on a relative abundance matrix. Richness, bacterial abundance and microbiome composition were compared through Jaccard similarity based on observed richness using Tree.shared in Mothur (SCHLOSS et al., 2009).

The α -diversity was evaluated through the observed richness, Simpson's index and Shannon's index based on the number of OTUs. Diversity estimates were compared between fields by applying two-way ANOVA with a posterior Tukey test.

To verify the spatial distribution patterns of bacteria and their response to variables, multidimensional ordering was carried out to identify which explanatory variables could affect the variances between location and abundance. A canonical correspondence analysis (CCA) was performed to determine whether a linear or unimodal ordering method could be applied to the data. The highest gradient obtained was greater than 3.0 SD units, which indicated that a restricted method based on a unimodal model was adequate. For that, we used CCA (double scale) with an explanatory matrix (abiotic factors) with general averages for the following: pH, chlorides, and sulfates. The communities were tested and inferred by the possible ecological preferences for the explanatory variables, considering the different collection points. For a more conservative approach, the analysis was carried out with the phyla and the main bacterial genera identified. Thus, a triple plot CCA was performed to better observe how explanatory variables (vectored lines) influence the distribution of samples and locations, represented in the axes. The type 2 scaling parameter was used to observe the position of the maximum values of the variables with the explanatory ones by the average of the orthogonal distance between samples and vectored lines. The analysis was conducted using the Vegan community ecology package in R version 2.5–7.

5.2.2.7. Culture media

Specific culture media were used for SRB and APB growth. For APB growth, Phenol Red Broth medium (Merck, Germany) with 15 g·L⁻¹ glucose was used. The medium was purged with N₂ to decrease the oxygen content (BALCH; WOLFE, 1976) (1 h per L) and added to 30 mL sealed bottles. The bottles were sterilized in an autoclave for 15 min at 121°C. The same process was carried out for the SRB growth medium, which was Postgate E (POSTGATE, 1984; JAIN, 1995) (KH₂PO₄, 0.5 g·L⁻¹; NH₄Cl, 1.0 g·L⁻¹; Na₂SO₄, 1.0 g·L⁻¹; CaCl₂·6H₂O, 1.0 g·L⁻¹; MgCl₂·7H₂O, 1.8 g·L⁻¹; sodium lactate, 7.0 mL·L⁻¹; yeast extract, 1.0 g·L⁻¹; ascorbic acid, 0.1 g·L⁻¹; FeSO₄·7H₂O, 0.5 g·L⁻¹; agar, 1.0 g·L⁻¹). The pH was adjusted to 7.6 with NaOH solution, and before the use, 4.0 mL·L⁻¹ of a 0.025% resazurin solution previously filtered in a 0.22 µm membrane filter, was added.

5.2.2.8. Enrichment of SRB and APB from produced water samples

APB and SRB consortia were enriched in specific media for 21 days at 35°C (average oilfield temperature). APB and SRB consortia were transferred weekly (10% (v/v)) to sterile sealed bottles containing Phenol Red Glucose Broth and Postgate E, respectively. After inoculation with SRB or APB consortia, a layer of mineral oil was added to maintain the anaerobic environment.

5.2.2.9. Minimum Inhibitory concentration (MIC) of biocides against SRB and APB

To evaluate the resistance of the consortia against glutaraldehyde, DBNPA, THPS and ADBAC, MIC analyzes were carried out. Concentrations of 25, 50, 100, 250 and 500 mg·L⁻¹ of the biocides were added in 96-well microtiter plates (SCHUG et al., 2020) containing specific culture medium and an inoculum of 1×10⁶ cells/mL, quantified by a luminometer (Photonmaster, Luminultra) using a specific reagent kit (ATP Quench Gone Aqueous Kit, Luminultra). A positive control of each consortium was used for the validation of the test. The bottles were incubated in an anaerobic jar with an anaerobiosis generator (Anaerobac, Probac, Brazil) for 72 h at 35°C.

5.2.3. Results and discussion

5.2.3.1. Produced water characterization

In the O&G industry, produced water is the term used for water emulsified with oil during the extraction process, and due to the large volumes generated, it is considered one of the most important effluents in O&G. In 2009, the world generation of produced water was estimated to be >70 billion barrels per year. In Brazil, the average generation is approximately 224 million barrels per day (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2020). Worldwide, the volume of produced water is increasing due to the maturation process of reservoirs and the greater number of production fields (DICKHOUT et al., 2017; AL-GHOUTI et al., 2019a).

Produced water presents a variable composition according to the geographic location of the field, age and depth of the well, composition of the oil, and extraction method (AL-GHOUTI et al., 2019a). Despite the proximity of the onshore fields where the samples were collected (Figure 1), their chemical and biological characteristics were very distinct. Onshore 1, approximately 50 km from Onshore 2, showed higher salinity and sulfate contents but lower pH and microorganism concentrations. The offshore samples presented more similar characteristics (except sulfate content), as expected, since they were collected from the same platform but different wells (Table S1 - supplemental material).

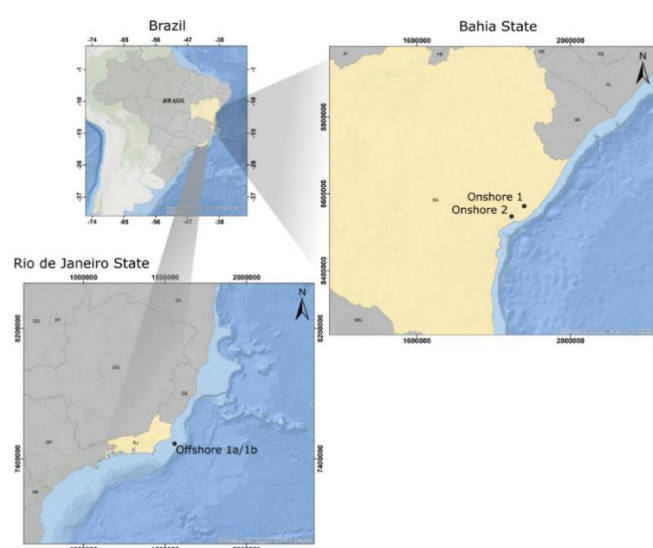


Figure 1. Map of Brazil with detailed locations of the sample collection points in Bahia State (right) and Rio de Janeiro State (bottom). Created using the component ArcMap from the software ArcGIS 10.6.1 (<https://www.arcgis.com/>).

5.2.3.2. Composition of the bacterial communities from produced water samples

The sequencing produced a total of 438,361 sequences from the produced water samples. After removal of primers, sequences not belonging to the hypervariable V4 region, preclusters and chimeras, 263,241 sequences were used for taxonomic identification. Using Mothur for removal, 258,741 bacterial sequences were filtered, of which 29,929 were unique sequences. A total of 2,636 OTUs were obtained, covering a maximum distance of 3% for the 16S rRNA gene. The coverage was evaluated by a rarefaction curve (Figure S1A – supplemental material), where a trend in the reduction of the curve slope was observed, demonstrating that the majority of OTUs were sampled but sometimes not detected. Figure S1B (supplemental material) shows the results of alpha diversity analysis carried out in the samples. Indications of alpha diversity showed significant differences ($p < 0.0001$) between the collection sites. The Chao 1 index showed that most samples presented differences, except Offshore 1a and Onshore 1 ($p = 0.8471$). The Shannon index did not show significant differences between the samples ($p > 0.9999$). These data demonstrate that bacterial communities do not share rare species in an expressive way. OTUs from archaea were found in low number (less than 0.1%) in the samples.

Similar to the physical-chemical characteristics, the microbiome of produced water changed according to the sample collection location. However, some microorganisms with important ecological roles have been frequently reported. Sulfate- and sulfur-reducing, acid-producing, thermophilic, halotolerant and halophilic bacteria are the most common groups comprising oil reservoir ecosystems (LI et al., 2017b; RAJBONGSHI; GOGOI, 2021). Phyla and genera belonging to these groups were also identified in the produced water samples evaluated in this study. Figure 2A shows the relative abundance of bacterial phyla found in the samples. The results demonstrate the presence of Desulfobacterota, Proteobacteria, Halanaerobiaeota, Firmicutes and Campylobacterota as the most abundant phyla. The relative abundance of genera can be seen in Figure 2B; *Desulfoplanes* (SRB), *Halanaerobium* (APB), *Syntrophotalea* (sulfur-reducing), *Halomonas* (APB), *Desulfonauticus* (SRB), *Sulfurospirillum* (sulfur-reducing) and *Guyparkeria*, also named *Halothiobacillus* (sulfur-oxidizing), were predominant. The identification of these groups of

microorganisms can be explained by the extreme conditions found in oilfields, such as high sulfur derivative contents in water, high salinity, and high temperatures.

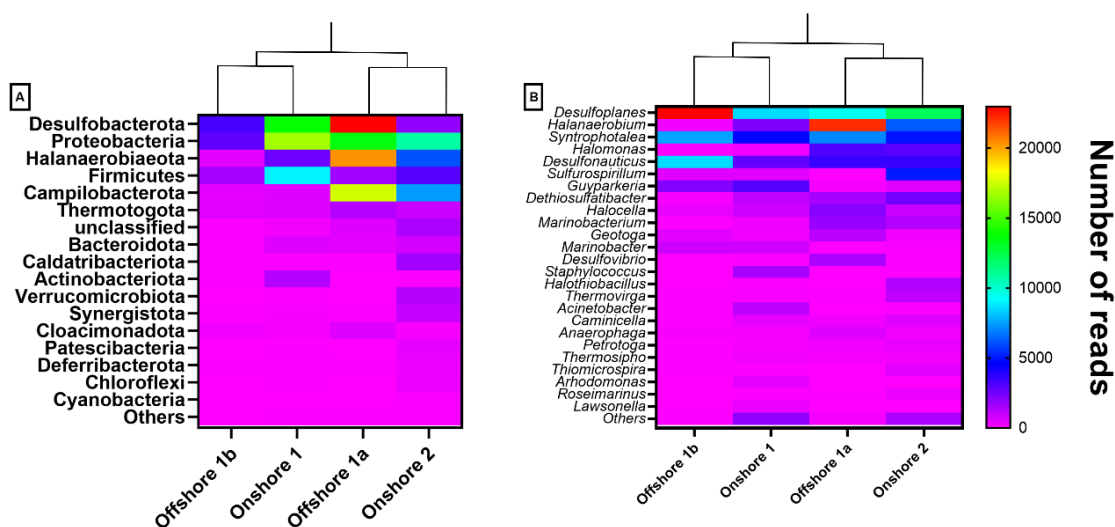


Figure 2. Heatmap of taxonomic analysis at the phylum level (A) and genus level (B)

Among the microorganisms found in the samples, SRB are generally the main target in biocidal treatments due to the negative impact caused by H₂S generation and increased corrosion rates (XU; LI; GU, 2016; MARCIALES et al., 2019; JURELEVICIUS et al., 2021). Produced water normally provides favorable conditions for the development of SRB due to the concentrated supply of sulfate and low oxygen content (MUYZER; STAMS, 2008; ROYCHOUDHURY et al., 2013). All samples evaluated in this study demonstrated a high abundance of SRB. These microorganisms are able to use sulfate (SO₄²⁻) as an electron acceptor in dissimilatory sulfate reduction for anaerobic respiration processes, generating H₂S and other byproducts (MUYZER; STAMS, 2008; QIAN et al., 2019).

In the analyzed samples, the sulfate content was highest in samples Onshore 1 and Offshore 1a (Table S1 - supplemental material). Although sulfate plays an important role in the development of the SRB group, the sulfate content was not the only factor affecting the microbiome. Other factors, such as salinity, geographic location, and bacterial competition, influence the predominance of some genera over others.

Similar to SRB, sulfur-reducing bacteria generate H₂S but use only sulfur (S⁰) and oxidized forms as electron acceptors (except sulfate). Bacteria from sulfur-

reducing groups are able to grow through the dissimilatory reduction of elemental sulfur to sulfide in a respiratory type of metabolism (FAUQUE; BARTON, 2012; GOVIL et al., 2019) and are frequently found in extreme environments, such as coal mine wastewater and heavy metal-containing waters (GUY RIEFLER et al., 2008; SUN et al., 2019). Despite their similarities with the SRB group, sulfur-reducing bacteria show important differences in taxonomy (WANG et al., 2018), suggesting that organic substrates suitable for SRB may not be suitable for their growth (GUO et al., 2019). This group of microorganisms seems to have a key role in the balance of determinate microbiomes, but in most environments, especially in oilfield wastewaters, their role remains unclear.

APBs such as *Halanaerobium* and *Halomonas* intrinsically enter seawater due to their halophilic characteristics and are involved in corrosive processes (AN; KUNTE; KOERDT, 2021; ELUMALAI et al., 2021; PROCÓPIO, 2021; WANG et al., 2021). *Halanaerobium*, predominant in Offshore 1a, is a strictly anaerobic and moderately halophilic genus that requires NaCl concentrations between 30,000–200,000 mg·L⁻¹ for optimal growth (OREN, 2014). The role of APB microorganisms in biocorrosion has been demonstrated, mostly due to their capacity for biofilm formation (LIANG et al., 2014; ELUMALAI et al., 2021) and the production of acids from sugars (MATA et al., 2002; RAJBONGSHI; GOGOI, 2021). In addition, studies have demonstrated the synergistic role of APB in SRB biofilms, where the presence of both groups enhances biofilm aggressiveness (XU; LI; GU, 2016; WANG et al., 2020). Another APB identified in the Offshore 1a sample was *Geotoga*. Despite the low relative abundance in this sample, *Geotoga* has been identified in oil reservoirs (S. et al., 2021; SOLER et al., 2021) and fuel storage tanks (GONZÁLEZ-BENÍTEZ et al., 2020).

Another abundant genus found in the analyzed samples was *Syntrophotalea*, also named *Pelobacter* (VIGNERON et al., 2017; WAITE et al., 2020). The *Syntrophotalea* genus consists of strictly anaerobic gram-negative bacteria whose members are unable to ferment sugars, metabolizing only an extremely limited number of substrates. *This genus* plays an important role in the fermentative degradation of unusual organic matter, such as ethanol and butanol, and is able to use sulfur (S⁰) as an electron acceptor in these reactions (SUN et al., 2019). In addition, the association of *Syntrophotalea* species with methanogenic bacteria in the

degradation of crude oil alkanes, an intrinsic substrate from oil reservoirs, was observed (GRAY et al., 2011; VIGNERON et al., 2021).

A significant number of unclassified genera (38% in the four samples), especially those collected from onshore fields, and the high number of OTUs demonstrated the high complexity of the microbiome in produced water. In addition to environmental factors, such as temperature, pressure and geographic location (AL-GHOUTI et al., 2019a), the microbiome complexity may be influenced by the water composition.

Figures 3 and 4 show CCA plots of phyla and genera, respectively, according to the abiotic factors associated with the produced water composition that may interfere with microbiome complexity (pH, sulfate, and chloride content). Samples Offshore 1b, Onshore 1 and Onshore 2 showed correlations with the factors pH and sulfate content. Desulfobacterota, the most representative SRB phylum found in the four samples, was influenced by these two factors. In addition, although much less abundant, some known APB phyla also demonstrated correlations with pH and sulfate content (Fermentibacterota, Acidobacteriota and Acetothermia). In terms of genera, pH was the most influential, and *Desulfovibrio*, *Desulfoplanes* and *Desulfonauticus* were influenced by this factor.

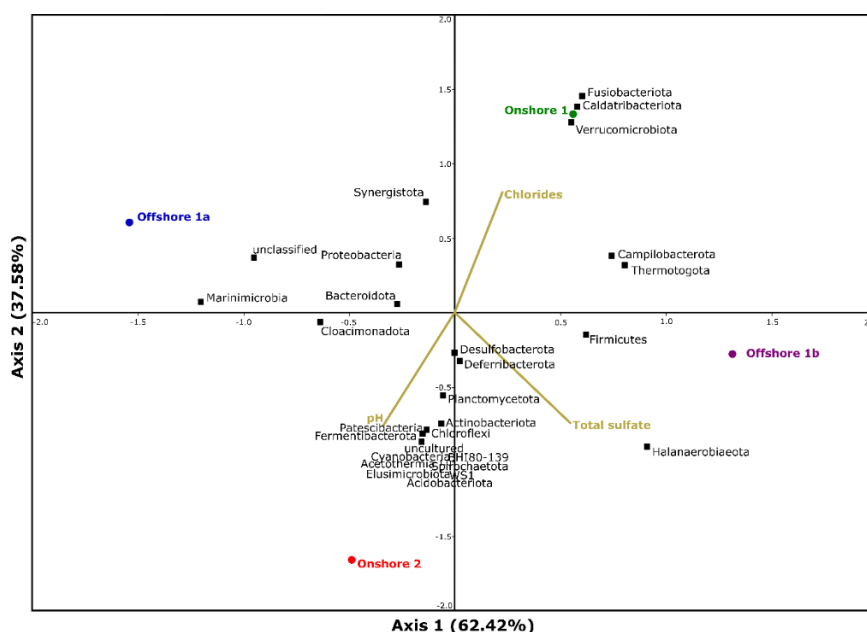


Figure 3. Ordination tri plot of canonical correspondence analysis (CCA) between study sites and abiotic factors and phyla.

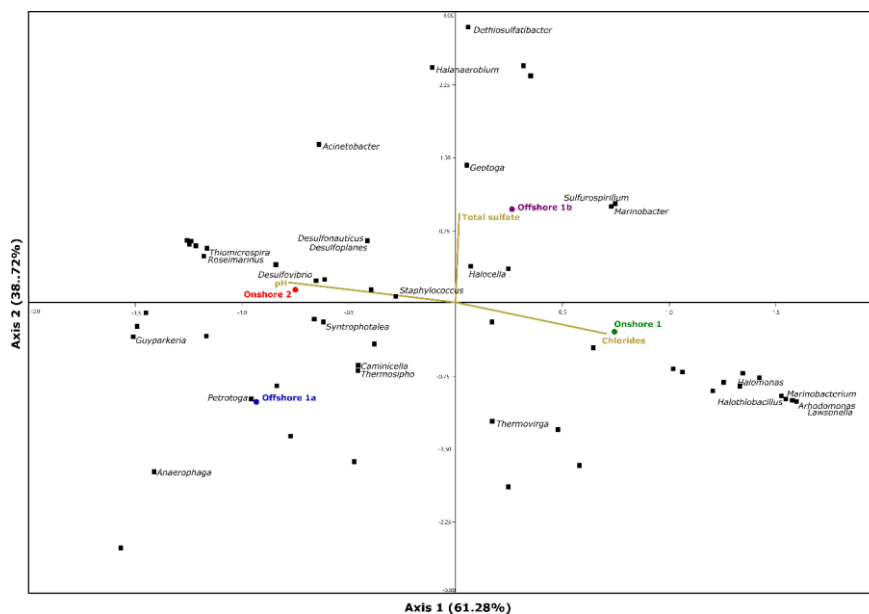


Figure 4. Ordination tri plot of canonical correspondence analysis (CCA) between study sites and abiotic factors and genera.

On the other hand, produced water is a complex matrix, where a small group of abiotic factors cannot reduce all other influences. In this case, factors not evaluated in this study may have contributed to the Onshore 1a microbial composition. Extreme conditions, such as pressure and temperature, and even the selective pressure caused by chemical agents applied in oil fields are examples of possible interfering abiotic factors.

5.2.3.4. Functional characterization of the microbiome from produced water

Through the taxonomic abundance of OTUs, the metabolic abundances were predicted. Despite a quite different microbiome taxonomy, the four samples showed remarkably similar metabolic activities (Figure 5A).

As expected, primary metabolism, for maintenance of bacterial life, was the most abundant in all samples; however, biosynthesis of secondary metabolites also demonstrated substantial relative abundance. Secondary metabolites are produced for survival under certain conditions, such as microbial competition for nutrients or space and protection against abiotic stress (SINGH et al., 2019; YANG et al., 2021). Secondary metabolites, such as pantothenate, fatty acids, prodigiosin, biotin, cofactors and vitamins, inosine monophosphate, among others were predicted by KEGG according to microbial composition data.

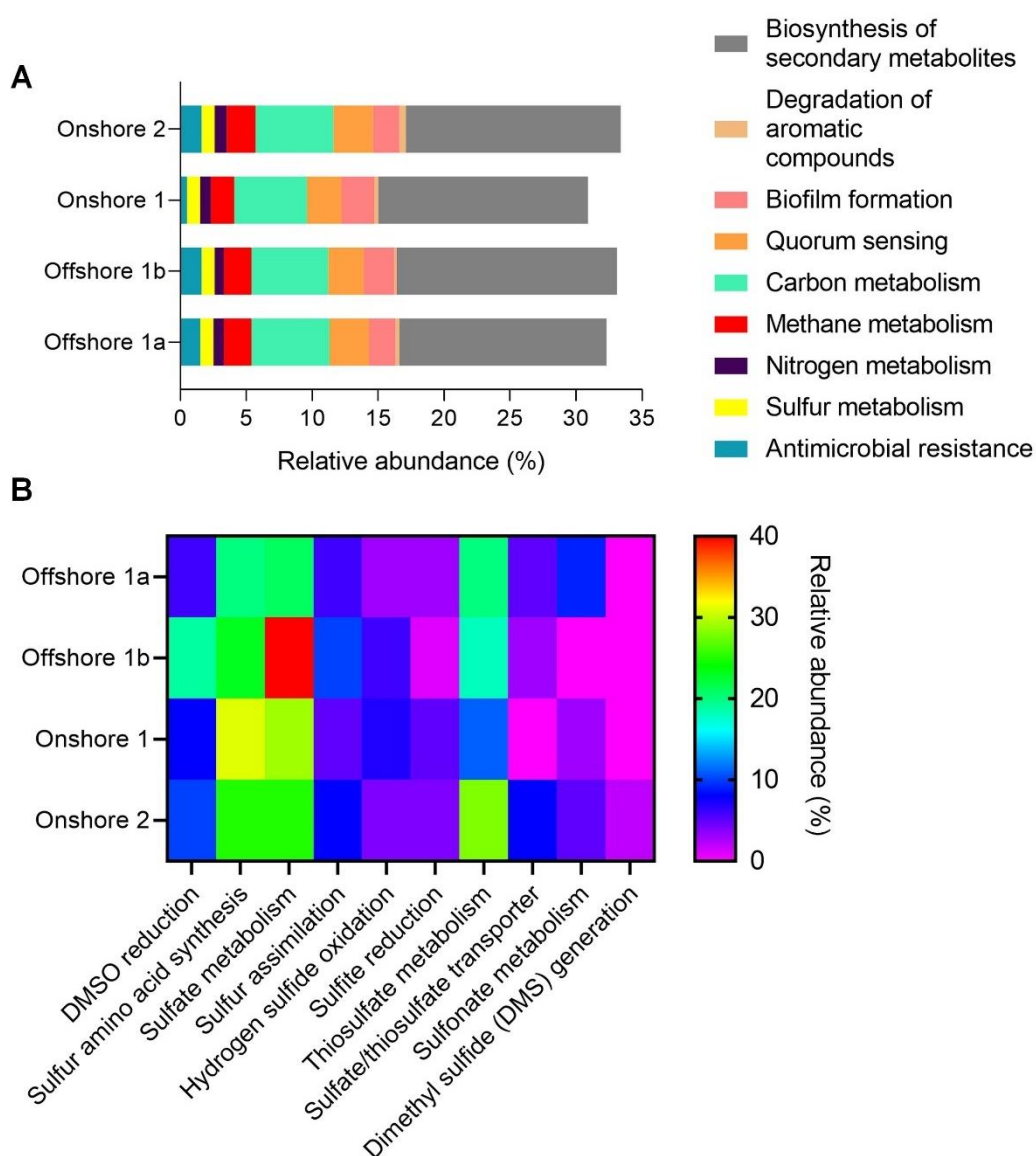


Figure 5. Predictions using KEGG Database of functional abundance orthologous classes (**A**) and genes involved in sulfur metabolism (**B**).

Other important metabolic activities found were quorum sensing, biofilm formation, carbon, sulfur, nitrogen and methane metabolism, antimicrobial resistance, and degradation of aromatic compounds. Quorum sensing and biofilm formation are related to population density control and response to stress and can also be associated with substrate limitation or other types of stress (PARSEK; GREENBERG, 2005; SIVAKUMAR et al., 2019). These metabolic activities have been described as a trigger for biofouling in oil fields, causing damage to membrane units, clogging pipes and harming systems and processes (MAH; O'TOOLE, 2001; VIKRAM; LIPUS; BIBBY, 2016).

Carbon metabolism is essential for microbial growth due to its activity as an electron donor for respiration, and it is incorporated into cells as biomass. Usually, volatile fatty acids (VFAs) are the most common carbon sources in produced water, but hydrocarbons, including aromatic compounds, have also been found (JOHNSON et al., 2017). Initial hydrocarbon degradation presents high energy barriers to be overcome due to the apolar C–H bond. *Pelobacter*, *Desulfovibrio* and other SRB are part of complex communities involved in anaerobic degradation of hydrocarbons under syntrophic conditions (RABUS et al., 2016).

Metabolism of sulfur and its derivatives has been frequently associated with negative impacts in oil fields and can increase biosouring in oil reservoirs (biosynthesis of H₂S) (VIKRAM; LIPUS; BIBBY, 2016; JOHNSON et al., 2017; PRAJAPAT et al., 2021). The main mechanism for H₂S generation is the dissimilatory sulfate-reduction pathway, where sulfate is converted to sulfite and then to sulfide by an irreversible reaction. Additional studies suggest two possible alternative biosouring mechanisms: 1) thiosulfate reduction, when the medium presents a low sulfate content, or the presence of sulfate-reducing prokaryotes, and 2) sulfide generation through hydrogen and formate metabolization, mostly by the *Desulfonauticus* genus (PICENO et al., 2014).

Figure 5B shows the main metabolic pathways involved in sulfur metabolism in the produced water samples evaluated in this study. The highest relative abundances were observed for sulfate metabolism, sulfur amino acid synthesis and thiosulfate metabolism, as expected. However, dimethyl sulfoxide (DMSO) reduction seems to be an important method for anaerobic respiration in extremophiles (THUME et al., 2018; MIRALLES-ROBLEDILLO et al., 2019).

Despite the low sulfate concentration of Offshore 1b (Table S1 – supplemental material), the sample demonstrated the highest abundance of genes involved in sulfate metabolism. This result was derived from the high abundance of the genus *Desulfoplanes* in the sample (Figure 3). Possibly, an unknown specific condition was promoting the growth of *Desulfoplanes* in Offshore 1b, for example, high concentrations of alternative substrates. In addition to sulfate, *Desulfoplanes* can metabolize fumarate, formate, lactate, and acetate (WATANABE; KOJIMA; FUKUI, 2015).

According to OTU abundance, metabolic activities related to antimicrobial resistance were present in all samples, with a relative abundance lower than 2% (regarding the total metabolic activities; data not shown). Analyzing the gene ontologies belonging to the observed OTUs, some similarities and differences can be observed among the samples (Table 1).

Table 1. Prediction by KEGG Orthology of the relative abundance of antimicrobial resistance genes in produced water samples.

Metabolic process	Predicted gene	Relative Abundance (%) ¹			
		Offshore 1a	Offshore 1b	Onshore 1	Onshore 2
Efflux mechanisms	<i>AcrA</i>	5.54	6.52	12.88	6.49
	<i>AcrB</i>	4.90	6.06	9.55	5.84
	<i>ToIC</i>	3.39	0.71	8.03	2.82
	<i>AdeA</i>	-	-	0.02	0.01
	<i>AdeB</i>	-	-	0.02	0.01
	<i>AdeC</i>	-	-	0.08	0.01
	<i>OprM</i>	-	-	0.27	0.73
Target modification	<i>mrcA</i>	7.20	8.81	12.48	7.67
	<i>mrdA</i>	7.07	8.85	11.44	7.58
	<i>ftsI</i>	4.10	5.97	8.64	5.86
Modification/degradation of antimicrobial compounds	<i>ALDH</i>	4.04	3.39	-	3.96
	<i>ampC</i>	-	-	0.11	0.03
	<i>ampG</i>	1.71	0.68	4.68	1.49
	<i>penB</i>	1.39	0.01	1.02	0.76
	<i>blaZ</i>	-	-	0.46	-

¹ Abundance relative to total antimicrobial resistance mechanisms.

Antimicrobial efflux mechanisms were present in the four samples and can include several types of efflux systems. The resistance-nodulation-division system (RND) operates as part of a tripartite system and is found ubiquitously in bacteria, archaea, and eukaryotes. RND pump ontologies, such as *AcrA/AcrB/ToIC*, *MexAB/OprM* and *AdeABC* systems, were widely found in microorganisms from produced water samples. These systems can extrude multiple antimicrobials using energy conversion from the proton motive force due to their broad substrate specificity (POS, 2009; YOON et al., 2016; AUDA; ALI SALMAN; ODAH, 2020). Vikram *et al.*, 2015 described efflux systems as the main resistance mechanism used by

Pseudomonas fluorescens biofilms against glutaraldehyde. A comparison of the response to biocides of glutaraldehyde- and PBS-exposed biofilms at the transcriptomic level revealed the induction of genes related to RND systems and ABC transporters (VIKRAM; BOMBERGER; BIBBY, 2015).

Mechanisms related to target modification identified in the microbiome of produced water samples are derived from penicillin-binding proteins (PBPs), which, in addition to their role in cell wall synthesis, precisely in peptidoglycan crosslinking, are membrane-associated macromolecules that play key roles in resistance mechanisms (MACHEBOEUF et al., 2006). These enzymes are targets of β -lactam antibiotics, but conformational modifications can lead to the nonrecognition of the active site by antibiotics and, consequently, to antimicrobial resistance. PBP ontologies found in the samples indicated higher abundances of the genes *mrcA*, *mrdA* and *ftsI*. Despite the cross-resistance between antibiotics and biocides being studied (CÂNDIDO et al., 2019), the role of PBP in resistance to biocides, specifically in oil fields, remains unclear.

The modification/degradation of antimicrobials by microorganisms can occur through the action of enzymes such as aldehyde dehydrogenase (ALDH), which catalyzes the oxidation of aldehydes, commonly present in biocides, to carboxylic acids. These enzymes are also involved in several other important metabolic processes, including glycerol production and ethanol oxidation (SINGH et al., 2013). ALDHs from different microorganisms show different substrate specificities but are able to degrade biocides such as glutaraldehyde and formaldehyde (JAUREGUIBEITIA et al., 2007; GÓMEZ-MANZO et al., 2010). For these reasons, microorganisms able to produce ALDH enzymes should present advantages in terms of intrinsic resistance against aldehyde-based biocides.

Although present in lower abundance in most samples, β -lactamases, uniquely responsible for β -lactam degradation and resistance, were also present. Genes codifying β -lactamase classes A, B, C and D were found, but those codifying classes C and D demonstrated the highest abundances in the microbiomes.

In general, the microbiome from produced water samples demonstrated a huge variety of pathways involved in primary and secondary metabolism. Studies have

shown that microorganisms found in oil fields carry out extremely complex “cross feeding” among them named anaerobic syntrophy (MCINERNEY; SIEBER; GUNSALUS, 2009; RABUS et al., 2016; ELUMALAI et al., 2019). Due to these microbial interactions and diverse microbiomes, oilfield microorganisms have an interdependent lifestyle, which must be deeply studied to fully understand their metabolic activities.

5.2.3.5. Biocidal resistance of SRB and APB consortia

SRB and APB consortia from produced water samples were previously enriched in specific media, except consortia from Offshore 1b and Onshore 1, which did not present cultivable SRB or APB or cultivable SRB, respectively. MICs of biocides commonly applied in produced water treatment (50% glutaraldehyde, 50% THPS, 50% DBNPA and 50% ADBAC; active contents were equalized to facilitate the analysis) were applied to the SRB and APB consortia.

Table 2 shows the MIC results, where the different behaviors of the consortia against the biocides can be observed. The SRB consortia demonstrated higher susceptibility to glutaraldehyde and THPS, but at different levels. Offshore 1a presented a lower MIC during glutaraldehyde exposure ($<25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), while Onshore 2 presented reduced susceptibility to glutaraldehyde and THPS (MIC = $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, for both molecules). In general, SRB consortia were less susceptible to DBNPA and presented resistance against ADBAC. SRB resistance to ADBAC and other quaternary ammonium compounds has also been reported in several studies (LEE et al., 2010; XUE; VOORDOUW, 2015; SENTHILMURUGAN et al., 2019) but needs further study.

Table 2. MIC of glutaraldehyde, THPS, DBNPA and ADBAC against APB and SRB consortia from produced water samples in Postgate E medium (for SRB) and Phenol Red Glucose Broth (for APB). +, positive growth; -, negative growth.

Biocide	Concentration (mg·L ⁻¹)	SRB		APB		
		Offshore 1a	Onshore 2	Offshore 1a	Onshore 1	Onshore 2
Positive control	0	+	+	+	+	+
Glutaraldehyde 50%	25	-	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+
	100	-	-	+	+	+
	250	-	-	+	+	+
	500	-	-	+	+	+
THPS 50%	25	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	-	+	+	+
	250	-	-	+	+	+
	500	-	-	+	+	+
DBNPA 50%	25	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+
	250	+	-	-	-	-
	500	+	-	-	-	-
ADBAC 50%	25	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	-
	250	+	+	+	+	-
	500	+	+	-	+	-

High levels of APB resistance were reported, and unlike for SRB, only DBNPA and ADBAC showed effectiveness at the tested concentrations. Glutaraldehyde and THPS required concentrations above 500 mg·L⁻¹ to exert bacteriostatic effects on the APB consortia.

The use of alternative biocides can reduce microbial resistance, changing the biocidal mechanisms to control microorganisms. Green molecules are becoming a new trend due to their lower environmental impact and renewable sources. Natural oils such as lemon (SOUZA et al., 2017), neem (PARTHIPAN et al., 2017), and clove oils (PURWASENA et al., 2020; PARTHIPAN et al., 2021) and plant extracts such as those of green tea (MD ZAIN; HAIRUL SALLEH; ABDULLAH, 2018) and garlic (MD ZAIN; HAIRUL SALLEH; ABDULLAH, 2018), amino acids (LI et al., 2016) and biosurfactants (PARTHIPAN *et al.*, 2018) have all been successfully evaluated against oilfield microorganisms and biofilms. Another way to broaden the effectiveness of water treatment is the use of synergistic molecules, especially those with different modes of action or cell targets.

For all tested waters, it is expected that the biocide treatment frequency can be reduced if treatments are combined with other mitigation strategies such as mechanical cleaning that can disturb the biofilms and thereby increase accessibility of biocides to the microorganisms. These results can be further validated by implementing the recommended treatment strategies in the field. For all tested waters, it is expected that the biocide treatment frequency can be reduced if treatments are combined with other mitigation strategies such as mechanical cleaning that can disturb the biofilms and thereby increase accessibility of biocides to the microorganisms. These results can be further validated by implementing the recommended treatment strategies in the field.

5.2.4. Conclusions

This study revealed the high diversity of extremophiles in the produced water microbiome, even in the samples collected from the same platform. Despite the diversity, SRB, APB and sulfur-reducing bacterial groups were found with high abundance in the four samples. Functional characterization of gene ontologies

predicted for the microbiomes demonstrated similar activities, mostly due to the similar nature of the samples. In terms of resistance, the SRB and APB consortia enriched from produced water samples demonstrated varied resistance levels to biocides commonly used in water treatment, indicating a specific taxonomic response to each biocide, and reinforcing the idea of the necessity of combined treatments (with more than one molecule) or new molecules to broaden treatment effectiveness. To confirm the findings found in this study, further evaluations to identify the bacterial composition of SRB and APB consortia need to be carried out in addition to further resistance studies.

5.2.5. Supplementary information

Table S1. Composition of produced water samples according to physical-chemical characteristics and microbial concentration.

Sample	Location	Collect point	Chlorides (mg·L ⁻¹)	Sulfate (mg·L ⁻¹)	pH	Cells/mL
Onshore 1	Bahia state	Water station entrance	84,000	2,342	5.8	8.5 × 10 ⁴
Onshore 2	Bahia state	Water station entrance	26,550	692	6.7	1.2 × 10 ⁵
Offshore 1a	Rio de Janeiro state	Production header A	38,150	3,314	6.6	2.2 × 10 ⁷
Offshore 1b	Rio de Janeiro state	Production header B	30,250	983	6.6	4.2 × 10 ⁷

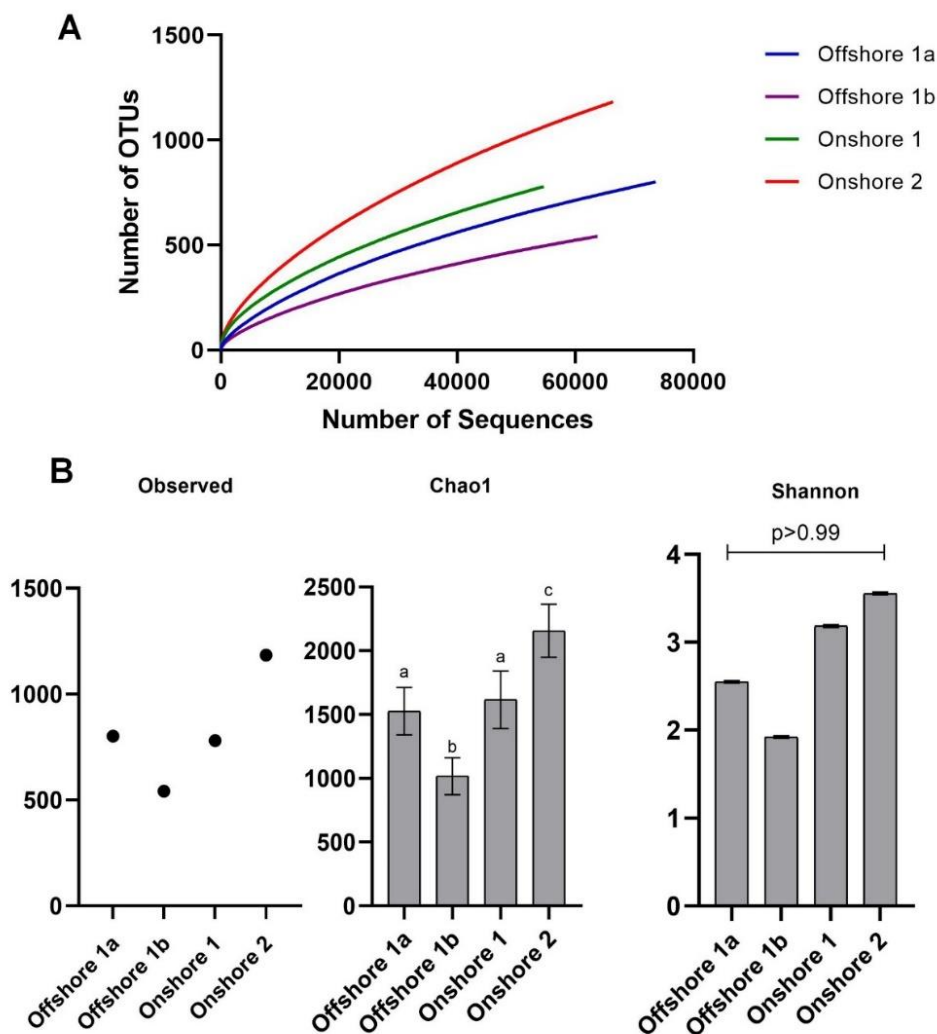


Figure S1. Bacterial abundance and diversity in the produced water samples. A) Refraction curves of the collection site by the number of sequences. Operational taxonomic units with a maximum distance of 3% for the 16S rRNA gene. B) Alpha diversity (observed richness, Chao1 and Shannon). Different letters represent significant changes between the groups.

5.2.6. References

- ABBAS, M. A. et al. Utilization of 1-Butylpyrrolidinium Chloride Ionic Liquid as an Eco-Friendly Corrosion Inhibitor and Biocide for Oilfield Equipment: Combined Weight Loss, Electrochemical and SEM Studies. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 2019.
- ABBAS, R. H.; HERNANDEZ, J. F.; AL ABBAS, F. M. *Holding Water — A Corrosion Management Program in a Vast Seawater Injection System* CORROSION 2020, 14 jun. 2020. .
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. e B. (ANP). *Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural*.
- AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN, K.; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil–water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. *Anaerobe*, v. 16, n. 1, p. 12–18, 2010.
- AL-GHOUTI, M. A. et al. *Produced water characteristics, treatment and reuse: A review* *Journal of Water Process Engineering*, 2019a. .
- AL-GHOUTI, M. A. et al. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *Journal of Water Process Engineering*, v. 28, p. 222–239, 2019b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214714418306858>>.
- AL-JANABI, Y. T. An overview of corrosion in oil and gas industry: upstream, midstream, and downstream sectors. *Corrosion Inhibitors in the Oil and Gas Industry*, p. 1–39, 2020.
- ALVES, J. I. et al. Long-chain fatty acids degradation by Desulfomonile species and proposal of “Candidatus Desulfomonile palmitatoxidans”. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 3227, 2020.
- AN, B. A.; KUNTE, H.-J.; KOERDT, A. *Microbiologically Influenced Corrosion by Halophilic (Salt-Loving) Nitrate and Sulfate-Reducing Microorganisms*, abr. 2021. .
- ANDREWS, S. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data* Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, , 2010. .
- ASTM D1141. *Standard practice for the preparation of substitute ocean water*. [s.l.] American Society for Testing and Materials International, 2013.
- AUDA, I. G.; ALI SALMAN, I. M.; ODAH, J. G. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Reports*, v. 20, p. 100666, 2020.
- BALCH, W. E.; WOLFE, R. S. New Approach to the Cultivation of Methanogenic Bacteria: 2-Mercaptoethanesulfonic Acid (HS-CoM)-Dependent Growth of Methanobacterium Ruminantium in a Pressureized Atmosphere. *Applied and environmental microbiology*, v. 32, n. 6, p. 781–791, dez. 1976.
- BARBERA, P. et al. EPA-ng: massively parallel evolutionary placement of genetic sequences. *Systematic biology*, v. 68, n. 2, p. 365–369, 2019.
- BARROS, A. C.; MELO, L. F.; PEREIRA, A. A Multi-Purpose Approach to the Mechanisms of Action of Two Biocides (Benzalkonium Chloride and Dibromonitripropionamide): Discussion of Pseudomonas fluorescens' Viability and Death. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 842414, 2022.
- BARTON, L. L.; FAUQUE, G. D. Sulfate-Reducing Prokaryotes: Changing Paradigms. In: *Sulfate-Reducing Bacteria and Archaea*. [s.l.] Springer, 2022. p. 1–55.
- BAS, S.; KRAMER, M.; STOPAR, D. Biofilm surface density determines biocide effectiveness. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2443, 2017.

BEDOYA, K. et al. Assessment of the microbial community and biocide resistance profile in production and injection waters from an Andean oil reservoir in Colombia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 157, p. 105137, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830520310684>>.

BOLYEN, E. et al. *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2* *Nature Biotechnology*, 2019. .

BONIFAY, V. et al. *Metabolomic and Metagenomic Analysis of Two Crude Oil Production Pipelines Experiencing Differential Rates of Corrosion* *Frontiers in Microbiology*, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00099>>.

BOOKER, A. E. et al. Deep-subsurface pressure stimulates metabolic plasticity in shale-colonizing *Halanaerobium* spp. *Applied and environmental microbiology*, v. 85, n. 12, p. e00018-19, 2019.

BORE, E. et al. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology*, v. 153, n. 4, p. 935–946, 2007.

BURGER, E. D. Synergism of anthraquinone with an oilfield biocide to inhibit sulfide generation from sulfate-reducing bacteria. In: CORROSION 2004, *Anais...OnePetro*, 2004.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAMPA, M. F. et al. Unconventional oil and gas energy systems: an unidentified hotspot of antimicrobial resistance? *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2392, 2019a.

CAMPA, M. F. et al. Surface water microbial community response to the biocide 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide, used in unconventional oil and gas extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019b.

CÂNDIDO, E. de S. et al. *Bacterial cross-resistance to anti-infective compounds. Is it a real problem?* *Current Opinion in Pharmacology*, 2019. .

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516–4522, 2011. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/108/Supplement_1/4516>.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D459–D471, 2014.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—a 2019 update. *Nucleic acids research*, v. 48, n. D1, p. D445–D453, 2020.

CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2003.

CHAPPIDI, S.; VILLA, E. C.; CANTAREL, B. L. Using Mothur to determine bacterial community composition and structure in 16S ribosomal RNA datasets. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 67, n. 1, p. e83, 2019.

CZECH, L.; STAMATAKIS, A. Scalable methods for analyzing and visualizing phylogenetic placement of metagenomic samples. *PLoS One*, v. 14, n. 5, p. e0217050, 2019.

DANIEL, L. et al. Predominance and Metabolic Potential of *Halanaerobium* spp. in Produced Water from Hydraulically Fractured Marcellus Shale Wells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 8, p. e02659-16, 21 dez. 2021. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.02659-16>>.

DAWUDA, A.-W.; TALEB-BERROUANE, M.; KHAN, F. A probabilistic model to estimate microbiologically influenced corrosion rate. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 148, p. 908–926, 2021.

DE MATOS, L. P. et al. Simultaneous removal of sulfate and arsenic using immobilized non-traditional SRB mixed culture and alternative low-cost carbon sources. *Chemical Engineering Journal*, v. 334, p. 1630–1641, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894717319472>>.

DICKHOUT, J. M. et al. *Produced water treatment by membranes: A review from a colloidal perspective* *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017. .

DOUGLAS, G. M. et al. PICRUST2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *bioRxiv*, 2019.

DOUGLAS, G. M. et al. PICRUST2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*, v. 38, n. 6, p. 685–688, 2020.

E., B. A. et al. Sulfide Generation by Dominant Halanaerobium Microorganisms in Hydraulically Fractured Shales. *mSphere*, v. 2, n. 4, p. e00257-17, 21 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00257-17>>.

EHMAN, D. L. Determination of parts-per-billion levels of hydrogen sulfide in air by potentiometric titration with a sulfide ion-selective electrode as an indicator. *Analytical Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 918–920, 1976.

EL-AZIZI, M.; FARAG, N.; KHARDORI, N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 47, p. 60–71, 2016.

ELUMALAI, P. et al. Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. *3 Biotech*, v. 9, n. 3, p. 79, 2019.

ELUMALAI, P. et al. Characterization of crude oil degrading bacterial communities and their impact on biofilm formation. *Environmental Pollution*, v. 286, p. 117556, 2021.

FAUQUE, G. D.; BARTON, L. L. Chapter 1 - Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In: POOLE, R. K. B. T.-A. IN M. P. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2012. 60p. 1–90.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 6, p. 354–360, 1 dez. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000284>>.

GÓMEZ-MANZO, S. et al. The Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) of *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a Quinohemeprotein containing PQQ, Cytochrome b and Cytochrome c. Molecular and Catalytic Properties. *Journal of bacteriology*, 2010.

GONZÁLEZ-BENÍTEZ, N. et al. Bacterial diversity in aqueous/sludge phases within diesel fuel storage tanks. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 12, p. 180, 2020.

GOVIL, T. et al. Chapter 35 - Taxonomical Diversity of Extremophiles in the Deep Biosphere. In: DAS, S.; DASH, H. R. B. T.-M. D. IN THE G. E. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2019. p. 631–656.

GRAY, N. D. et al. The quantitative significance of Syntrophaceae and

syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes. *Environmental Microbiology*, 2011.

GREENE, E. A. et al. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006.

GRIGORYAN, A. A. et al. Competitive oxidation of volatile fatty acids by sulfate-and nitrate-reducing bacteria from an oil field in Argentina. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 14, p. 4324–4335, 2008.

GUESS, W. L.; BRUCH, M. A review of available toxicity data on the topical antimicrobial, chloroxylenol. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, v. 5, n. 4, p. 233–262, 1986.

GUO, J. et al. Realizing a high-rate sulfidogenic reactor driven by sulfur-reducing bacteria with organic substrate dosage minimization and cost-effectiveness maximization. *Chemosphere*, 2019.

GUY RIEFLER, R. et al. Role of sulfur-reducing bacteria in a wetland system treating acid mine drainage. *Science of the Total Environment*, 2008.

HARIRCHI, S. et al. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. *Bioengineered*, v. 13, n. 3, p. 6521–6557, 2022.

HE, G.-X. et al. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 1, p. 262–265, 2004.

HIDAKA, K.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. The presence of nitrate-and sulfate-reducing bacteria contributes to ineffectiveness souring control by nitrate injection. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 129, p. 81–88, 2018.

HIDALGO, K. J. et al. *Genome-Resolved Meta-Analysis of the Microbiome in Oil Reservoirs Worldwide* *Microorganisms*, 2021. .

HONGZHONG, B.; XUSHENG, G.; CHENG, Y. SYNTHESIS AND APPLICATION OF TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SULFATE AND TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM CHLORIDE. 2005.

HUANG, L. et al. *Role of LptD in Resistance to Glutaraldehyde and Pathogenicity in Riemerella anatipestifer* *Frontiers in Microbiology*, 2019. . Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01443>>.

IBP. *Maiores produtores mundiais de petróleo em 2021*. Disponível em: <<https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/maiores-produtores-mundiais-de-petroleo-em-2020/>>. Acesso em: 23 mar. 2023.

IDREES, M. et al. Multimodal role of amino acids in microbial control and drug development. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 330, 2020.

ISMAIL, W. A. et al. Editorial: Petroleum Microbial Biotechnology: Challenges and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 833, 2017.

JAIN, D. K. Evaluation of the semisolid Postgate's B medium for enumerating sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 22, n. 1, p. 27–38, 1995.

JAUREGUIBEITIA, A. et al. Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007.

JENNEMAN, G. E.; DE LEON, K. B. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 169, p. 105385, 2022.

Jl, J.-H. et al. Methanogenic biodegradation of C13 and C14 n-alkanes

activated by addition to fumarate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 153, p. 104994, 2020.

JIA, R. et al. Laboratory testing of enhanced biocide mitigation of an oilfield biofilm and its microbiologically influenced corrosion of carbon steel in the presence of oilfield chemicals. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 125, p. 116–124, 2017a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830517308508>>.

JIA, R. et al. Mitigation of the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm using alkyldimethylbenzylammonium chloride enhanced by d-amino acids. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 117, p. 97–104, 2017b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516308162>>.

JIA, R. et al. *Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review* *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2019a. .

JIA, R. et al. A sea anemone-inspired small synthetic peptide at sub-ppm concentrations enhanced biofilm mitigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 139, p. 78–85, 2019b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830518307637>>.

JIANG, G. et al. Dosing free nitrous acid for sulfide control in sewers: results of field trials in Australia. *Water research*, v. 47, n. 13, p. 4331–4339, 2013.

JIANG, W. et al. A critical review of analytical methods for comprehensive characterization of produced water. *Water*, v. 13, n. 2, p. 183, 2021.

JIMÉNEZ, S. et al. *State of the art of produced water treatment* *Chemosphere*, 2018. .

JOHNSON, R. J. Combining Advanced Biocide Evaluation and Microbial Monitoring to Optimise Microbial Control. In: SPE International Conference on Oilfield Chemistry, *Anais...OnePetro*, 2017.

JOHNSON, R. J. et al. Reservoir Souring – Latest developments for application and mitigation. *Journal of Biotechnology*, 2017.

JONES, I. A.; JOSHI, L. T. Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2276, 2021.

JURELEVICIUS, D. et al. Long-term souring treatment using nitrate and biocides in high-temperature oil reservoirs. *Fuel*, v. 288, p. 119731, 2021.

KAHRILAS, G. A. et al. Biocides in Hydraulic Fracturing Fluids: A Critical Review of Their Usage, Mobility, Degradation, and Toxicity. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 1, p. 16–32, 6 jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es503724k>>.

KAMARISIMA; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. The utilization of aromatic hydrocarbon by nitrate- and sulfate-reducing bacteria in single and multiple nitrate injection for souring control. *Biochemical Engineering Journal*, v. 143, p. 75–80, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X18304273>>.

KANEHISA, M. et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 2016.

KANEHISA, M. Toward Understanding the Origin and Evolution of Cellular Organisms. *Protein science: a publication of the Protein Society*, v. 28, n. 11, p. 1947–1951, nov. 2019.

KANEHISA, M. et al. KEGG: Integrating Viruses and Cellular Organisms. *Nucleic acids research*, v. 49, n. D1, p. D545–D551, jan. 2021.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 1, p. 27–30, jan. 2000.

KANNAN, P. et al. A Review of Characterization and Quantification Tools for Microbiologically Influenced Corrosion in the Oil and Gas Industry: Current and Future Trends. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 57, n. 42, p. 13895–13922, out. 2018.

KARATZAS, K. A. G. et al. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 5, p. 1508–1516, 2008.

KARP, P. D.; CASPI, R. A survey of metabolic databases emphasizing the MetaCyc family. *Archives of toxicology*, v. 85, p. 1015–1033, 2011.

KEASLER, V. et al. Biocides overview and applications in petroleum microbiology. *Trends in oil and gas corrosion research and technologies*, p. 539–562, 2017.

KORENBLUM, E. et al. Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 3, p. 791–800, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2281-4>>.

KRAEMER, S. A.; RAMACHANDRAN, A.; PERRON, G. G. Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, v. 7, n. 6, p. 180, 2019.

KUSHKEVYCH, I. Isolation and Purification of Sulfate-Reducing Bacteria. In: *Microorganisms*. [s.l.] IntechOpen, 2019.

KVAREKVÅL, J.; MOLONEY, J. Sour corrosion. *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies*, p. 113–147, 2017.

LAHME, S. et al. Metabolites of an oil field sulfide-oxidizing, nitrate-reducing *Sulfurimonas* sp. cause severe corrosion. *Applied and environmental microbiology*, v. 85, n. 3, p. e01891-18, 2019.

LAHME, S. et al. Severe corrosion of carbon steel in oil field produced water can be linked to methanogenic archaea containing a special type of [NiFe] hydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, n. 3, p. e01819-20, 2020.

LEE, C. et al. Field applications for on-site DNA extraction and qPCR. In: CORROSION 2015, *Anais...OnePetro*, 2015.

LEE, M. H. P. et al. Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010.

LI, X.-X. et al. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 170–185, 2017a.

LI, X. X. et al. *Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs* *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2017b. .

LI, Y. et al. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 896, 2016.

LI, Y. et al. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: a review. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 34, n. 10, p. 1713–1718, 2018.

LIANG, B. et al. Different diversity and distribution of archaeal community in the aqueous and oil phases of production fluid from high-temperature petroleum reservoirs. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 841, 2018.

LIANG, R. et al. Roles of thermophilic thiosulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 89, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00089>>.

LIU, X. et al. A mixture of D-amino acids enhances the biocidal efficacy of CMIT/MIT against corrosive *Vibrio harveyi* biofilm. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.

LIU, Z. et al. Sulfate-reducing bacteria in anaerobic bioprocesses: basic properties of pure isolates, molecular quantification, and controlling strategies. *Environmental Technology Reviews*, v. 7, n. 1, p. 46–72, 2018.

LOUCA, S.; DOEBELI, M. Efficient comparative phylogenetics on large trees. *Bioinformatics*, v. 34, n. 6, p. 1053–1055, 2018.

LV, M. et al. Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X65 steel in seawater containing sulfate-reducing bacteria and iron-oxidizing bacteria. *Journal of Materials Research and Technology*, v. 8, n. 5, p. 4066–4078, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785419306386>>.

LV, M.; DU, M. A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 17, n. 3, p. 431–446, 2018.

MACHEBOEUF, P. et al. *Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes* FEMS Microbiology Reviews, 2006.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 77, n. 2, p. 103–116, 2000.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents* Trends in Microbiology, 2001. .

MAILLARD, J.-Y. Resistance of bacteria to biocides. *Microbiology spectrum*, v. 6, n. 2, p. 2–6, 2018.

MAILLARD, J. Y. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *Journal of Hospital Infection*, 2007.

MARCIALES, A. et al. *Mechanistic microbiologically influenced corrosion modeling—A review* Corrosion Science, 2019. .

MARSHALL, I. P. G. et al. Environmental filtering determines family-level structure of sulfate-reducing microbial communities in subsurface marine sediments. *The ISME journal*, v. 13, n. 8, p. 1920–1932, 2019.

MATA, J. A. et al. A Detailed Phenotypic Characterisation of the Type Strains of Halomonas Species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 3, p. 360–375, 2002.

MCINERNEY, M. J.; SIEBER, J. R.; GUNSALUS, R. P. *Syntrophy in anaerobic global carbon cycles* Current Opinion in Biotechnology, 2009. .

MCKENZIE, J.; HAMILTON, W. A. The assay of in-situ activities of sulphate-reducing bacteria in a laboratory marine corrosion model. *International biodeterioration & biodegradation*, v. 29, n. 3–4, p. 285–297, 1992.

MD ZAIN, W. S.; HAIRUL SALLEH, N. I.; ABDULLAH, A. Natural Biocides for Mitigation of Sulphate Reducing Bacteria. *International Journal of Corrosion*, v. 2018, p. 3567569, 2018.

MEADE, E.; SLATTERY, M. A.; GARVEY, M. Biocidal resistance in clinically relevant microbial species: a major public health risk. *Pathogens*, v. 10, n. 5, p. 598, 2021.

MELANDER, R. J.; BASAK, A. K.; MELANDER, C. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural product reports*, v. 37, n. 11, p. 1454–1477, 2020.

MERCHEL PIOVESAN PEREIRA, B. et al. *Tolerance to Glutaraldehyde in Escherichia coli Mediated by Overexpression of the Aldehyde Reductase YqhD by YqhC* *Frontiers in Microbiology*, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.680553>>.

MERCHEL PIOVESAN PEREIRA, B.; WANG, X.; TAGKOPOULOS, I. Short-and long-term transcriptomic responses of *Escherichia coli* to biocides: a systems analysis. *Applied and environmental microbiology*, v. 86, n. 14, p. e00708-20, 2020.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MIRALLES-ROBLEDILLO, J. M. et al. *DMSO Reductase Family: Phylogenetics and Applications of Extremophiles* *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. .

MORENTE, E. O. et al. Biocide tolerance in bacteria. *International journal of food microbiology*, v. 162, n. 1, p. 13–25, 2013.

MORIGAKI, M. K. et al. Salinidade em petróleo bruto: otimização de metodologia e proposta de um novo método para extração de sais em petróleo. *Química Nova*, v. 33, p. 607–612, 2010.

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

MYHR, S. et al. Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 3, p. 400–408, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-001-0881-8>>.

NASSER, B. et al. Characterization of microbiologically influenced corrosion by comprehensive metagenomic analysis of an inland oil field. *Gene*, v. 774, p. 145425, 2021.

NEFF, J.; LEE, K.; DEBLOIS, E. M. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects BT - Produced Water: Environmental Risks and Advances in Mitigation Technologies. In: LEE, K.; NEFF, J. (Ed.). New York, NY: Springer New York, 2011. p. 3–54.

OBŁĄK, E.; FUTOMA-KOŁOCH, B.; WIECZYŃSKA, A. Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 22, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02978-0>>.

OLLIVIER, B.; CAYOL, J. Fermentative, iron-reducing, and nitrate-reducing microorganisms. *Petroleum microbiology*, p. 71–88, 2005.

OREN, A. The Order Halanaerobiales, and the Families Halanaerobiaceae and Halobacteroidaceae. In: ROSENBERG, E. et al. (Ed.). *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 153–177.

PANNEKENS, M. et al. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *New Biotechnology*, v. 49, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678418316935>>.

PARKS, D. H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections

between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 27–33, 2005.

PARTHIPAN, P. et al. Neem extract as a green inhibitor for microbiologically influenced corrosion of carbon steel API 5LX in a hypersaline environments. *Journal of Molecular Liquids*, v. 240, p. 121–127, 2017.

PARTHIPAN, P. et al. Allium sativum (garlic extract) as a green corrosion inhibitor with biocidal properties for the control of MIC in carbon steel and stainless steel in oilfield environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 132, p. 66–73, 2018a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051730375X>>.

PARTHIPAN, P. et al. Glycolipid biosurfactant as an eco-friendly microbial inhibitor for the corrosion of carbon steel in vulnerable corrosive bacterial strains. *Journal of Molecular Liquids*, v. 261, p. 473–479, 2018b.

PARTHIPAN, P. et al. Evaluation of Syzygium aromaticum aqueous extract as an eco-friendly inhibitor for microbiologically influenced corrosion of carbon steel in oil reservoir environment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 7, p. 1441–1452, 2021.

PEREIRA, G. F.; PILZ-JUNIOR, H. L.; CORÇÃO, G. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

PETROBRAS. *Principais operações - Bacias*. Disponível em: <<https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/principais-operacoes/bacias/>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

PICENO, Y. M. et al. Temperature and injection water source influence microbial community structure in four Alaskan North Slope hydrocarbon reservoirs. *Frontiers in Microbiology*, 2014.

POGER, D.; MARK, A. E. Effect of triclosan and chloroxylenol on bacterial membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 123, n. 25, p. 5291–5301, 2019.

POS, K. M. *Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump* *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2009. .

POSTGATE, J. R. *The Sulphate-Reducing Bacteria*. 2nd. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984.

PRAJAPAT, G. et al. Application of Biotechnology in Oil and Gas Industries. In: *Environmental Microbiology and Biotechnology*. [s.l.] Springer, 2021. p. 113–133.

PROCÓPIO, L. The oil spill and the use of chemical surfactant reduce microbial corrosion on API 5L steel buried in saline soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 21, p. 26975–26989, 2021.

PURWASENA, I. A. et al. The Potential of Clove Essential Oil Microemulsion as an Alternative Biocide Against Pseudomonas aeruginosa Biofilm. *J. Pure Appl. Microbiol*, v. 14, n. 1, p. 261–269, 2020.

QIAN, Z. et al. *Recent advances in dissimilatory sulfate reduction: From metabolic study to application* *Water Research*, 2019. .

QIU, R. et al. Sulfate reduction and copper precipitation by a Citrobacter sp. isolated from a mining area. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, n. 2–3, p. 1310–1315, 2009.

RABUS, R. et al. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: From enzymatic reactions to the environment. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2016.

RAJBONGSHI, A.; GOGOI, S. B. A review on anaerobic microorganisms

isolated from oil reservoirs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 7, p. 1–19, 2021.

ROYCHOUDHURY, A. N. et al. Dissimilatory sulphate reduction in hypersaline coastal pans: an integrated microbiological and geochemical study. *Geobiology*, v. 11, n. 3, p. 224–233, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gbi.12027>>.

S., G. D. et al. Draft Genome Sequence of *Geotoga petraea* Strain HO-Geo1, Isolated from a Petroleum Reservoir in Russia. *Microbiology Resource Announcements*, v. 8, n. 29, p. e00706-19, ago. 2021.

SANTOS, J. C. dos et al. Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 151, p. 104966, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830519316191>>.

SAUER, K. et al. Neutral super-oxidised solutions are effective in killing *P. aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, v. 25, n. 1, p. 45–54, 2009.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHUG, A. R. et al. Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Veterinary Microbiology*, v. 248, p. 108791, 2020.

SENTHILMURUGAN, B. et al. Microbially induced corrosion in oilfield: microbial quantification and optimization of biocide application. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2019.

SHI, X. et al. Symbiosis of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in sewer systems. *Environment International*, v. 143, p. 105923, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041202031878X>>.

SHLIMON, A. G. et al. Microbial community composition in crude oils and asphalts from the Kurdistan Region of Iraq. *Geomicrobiology Journal*, v. 37, n. 7, p. 635–652, 2020.

SIERRA-GARCIA, I. N. et al. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales. *Extremophiles*, v. 21, n. 1, p. 211–229, 2017.

SINGH, B. P. et al. *Editorial: Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges* *Frontiers in Microbiology*, 2019. .

SINGH, S. et al. *Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/ electrophilic stress* *Free Radical Biology and Medicine*, 2013. .

SIVAKUMAR, K. et al. *Salinity-Mediated Increment in Sulfate Reduction, Biofilm Formation, and Quorum Sensing: A Potential Connection Between Quorum Sensing and Sulfate Reduction?* *Frontiers in Microbiology*, 2019. .

SKOVHUS, T. L.; WHITBY, C. *Oilfield Microbiology*. [s.l.] CRC Press, 2019.

SOLER, A. J. et al. Identification and Characterization of Planktonic and Sessile Consortium Associated with Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) In the Oil and Gas Industry. In: CORROSION 2021, *Anais...OnePetro*, 2021.

SONG, Z. et al. Whole metagenome of injected and produced fluids reveal the heterogenetic characteristics of the microbial community in a water-flooded oil reservoir. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 176, p. 1198–1207, 2019. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920410519301354>>.

SOUZA, P. M. et al. *Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria in Produced Water from the Petroleum Industry Using Essential Oils* *Molecules*, 2017. .

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STEWART, P. S.; GRAB, L.; DIEMER, J. A. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *Journal of Applied Microbiology*, v. 85, n. 3, p. 495–500, 1998.

SUGAI, Y.; OWAKI, Y.; SASAKI, K. Simulation Study on Reservoir Souring Induced by Injection of Reservoir Brine Containing Sulfate-Reducing Bacteria. *Sustainability*, v. 12, n. 11, p. 4603, 2020.

SUN, J. et al. Arsenite removal without thioarsenite formation in a sulfidogenic system driven by sulfur reducing bacteria under acidic conditions. *Water Research*, 2019.

TABATA, A. et al. Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 47, n. 7, p. 2093–2099, 2003.

THUME, K. et al. The metabolite dimethylsulfoxonium propionate extends the marine organosulfur cycle. *Nature*, v. 563, n. 7731, p. 412–415, 2018.

TIAN, Y.; XUE, S.; MA, Y. Comparative analysis of bacterial community and functional species in oil reservoirs with different in situ temperatures. *International Microbiology*, v. 23, n. 4, p. 557–563, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10123-020-00125-1>>.

UNSAL, T. et al. Assessment of 2, 2-Dibromo-3-Nitrilopropionamide Biocide Enhanced by D-Tyrosine against Zinc Corrosion by a Sulfate Reducing Bacterium. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 60, n. 10, p. 4009–4018, 2021.

VASCONCELLOS, S. P. et al. The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 1513–1518, 2011.

VIGNERON, A. et al. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle. *ISME Journal*, 2017.

VIGNERON, A. et al. *Syntrophic Hydrocarbon Degradation in a Decommissioned Off-Shore Subsea Oil Storage Structure* *Microorganisms*, 2021. .

VIKRAM, A.; BOMBERGER, J. M.; BIBBY, K. J. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015.

VIKRAM, A.; LIPUS, D.; BIBBY, K. Metatranscriptome analysis of active microbial communities in produced water samples from the Marcellus Shale. *Microbial Ecology*, 2016.

WADE, S. A. et al. The role of standards in biofilm research and industry innovation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 177, p. 105532, 2023. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830522001603>>.

WAITE, D. W. et al. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *deltaproteobacteria* and *oligoflexia*, and the phylum *thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 2020.

WANG, D. et al. Mitigating microbiologically influenced corrosion of an oilfield biofilm consortium on carbon steel in enriched hydrotest fluid using 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA) enhanced by a 14-mer peptide. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 57, p. 146–152, 2020.

WANG, D. et al. Mitigation of carbon steel biocorrosion using a green biocide enhanced by a nature-mimicking anti-biofilm peptide in a flow loop. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 9, n. 1, p. 67, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-022-00553-z>>.

WANG, H. et al. Distribution and diversity of bacterial communities and sulphate-reducing bacteria in a paddy soil irrigated with acid mine drainage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, n. 1, p. 196–206, 2016.

WANG, J. T. et al. Long-Term Feeding of Elemental Sulfur Alters Microbial Community Structure and Eliminates Mercury Methylation Potential in Sulfate-Reducing Bacteria Abundant Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*, 2018.

WANG, Y. et al. 16S rRNA Gene-Based Analysis of Fecal Microbiota from Preterm Infants with and without Necrotizing Enterocolitis. *The ISME journal*, v. 3, n. 8, p. 944–954, ago. 2009.

WANG, Y. et al. Corrosion of EH40 steel affected by *Halomonas titanicae* dependent on electron acceptors utilized. *Corrosion Science*, v. 182, p. 109263, 2021.

WATANABE, M.; KOJIMA, H.; FUKUI, M. Desulfoplanes Formicivorans Gen. Nov., Sp. Nov., a Novel Sulfate-Reducing Bacterium Isolated from a Blackish Meromictic Lake, and Emended Description of the Family Desulfomicrobiaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 65, n. Pt 6, p. 1902–1907, jun. 2015.

WHALEN, P. A.; TRACEY, D. R.; DUGUAY, J. Adenosine Triphosphate (ATP) measurement technology. *Microbiological Sensors for the Drinking Water Industry*. IWA, 2018.

WILLIAMS, T. M.; MCGINLEY, H. R. Deactivation of industrial water treatment biocides. In: CORROSION 2010, *Anais...OnePetro*, 2010.

WILLIAMS, T. M.; SCHULTZ, C. M. Effect of environmental parameters on the stability and performance of oil and gas biocides. In: SPE International Symposium on Oilfield Chemistry, *Anais...OnePetro*, 2015.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. *Bioelectrochemistry*, 2016.

XU, L. et al. Inadequate dosing of THPS treatment increases microbially influenced corrosion of pipeline steel by inducing biofilm growth of *Desulfovibrio hontreensis* SY-21. *Bioelectrochemistry*, p. 108048, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156753942100311X>>.

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

YANG, Z. et al. Biostimulation of sulfate-reducing bacteria used for treatment of hydrometallurgical waste by secondary metabolites of urea decomposition by *Ochrobactrum* sp. POC9: From genome to microbiome analysis. *Chemosphere*, v. 282, p. 131064, 2021.

YE, Y.; DOAK, T. G. A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes. *PLoS computational*

biology, v. 5, n. 8, p. e1000465, 2009.

YILMAZ, P. et al. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D643–D648, 2014.

YOON, E. J. et al. Contribution of the ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 2016.

ZLOTKIN, A. *Dispersion and detachment of cell aggregates* Google Patents, , 15 mar. 2016. .

ZOUCH, H. et al. Microbial diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment cultures associated with anaerobic biotransformation of coastal stockpiled phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1583, 2017.

5.3. ARTIGO 3

Aumento da formação de biofilmes após a exposição de consórcios bacterianos a biocidas

Gabriela Feix Pereira ^{1, 2*}, Taiah Rajeh Rosin ², Bibiana Braga ², Harry Pilz Junior ¹, Gertrudes Corção¹

¹ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.,

*E-mail: gabriela.pereira@dorketal.com

² Dorf Ketal Research and Development Center, Rua da Pedreira 559, Nova Santa Rita, RS, 92480-000, Brazil.

RESUMO

A diversidade da população bacteriana em campos de petróleo depende das condições físico-químicas da água produzida. No entanto, alguns grupos bacterianos são considerados intrínsecos aos campos de petróleo, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS), e o controle de biofilmes heterogêneos de BRS em superfícies de tanques e dutos é um desafio. Para explorar esta questão, três consórcios de BRS cultivados a partir de amostras de água produzida foram usados neste estudo, suas composições taxonômicas foram avaliadas, bem como suas respostas à exposição a diferentes biocidas. Análises de concentração inibitória mínima (CIM) foram correlacionadas com vias relacionadas à resistência a biocidas previstas nos consórcios. Os consórcios foram expostos aos biocidas sulfato de tetraquis(hidroximetil)fosfônio (THPS), glutaraldeído, cloroxilenol (PCMX) e à mistura comercial DEFENDER OG 327B, e a inibição e erradicação dos biofilmes foram avaliadas. Os três consórcios apresentaram diferentes composições bacterianas, mas a presença de bactérias produtoras de ácido (BPA) associadas às BRS foi amplamente identificada. A perda de diversidade nos consórcios em relação à água produzida demonstrou a dificuldade de crescimento das BRS em condições de laboratório. A exposição de BRS planctônicas e sésseis a biocidas gerou respostas diferentes de acordo com a concentração do biocida e o consórcio testado. A única tendência foi identificada durante a exposição ao THPS, especialmente na concentração mais alta ($2\times\text{MIC}$), que aumentou 2,62, 1,97 e 2,46 vezes a formação de biofilme por CON1, CON2 e CON3, respectivamente, em comparação com um biofilme sem qualquer exposição a biocidas. Com base nesses achados, este estudo demonstra a variabilidade na resposta de biofilmes aos biocidas de acordo com a origem dos consórcios. Além disso, os resultados mostraram que não há correlação direta entre o aumento da concentração do biocida e a eficiência na inibição e/ou erradicação dos biofilmes.

Palavras-chave: biocida, biofilmes, bactérias redutoras de sulfato, água produzida, petróleo

5.3.1. Introdução

Os campos de petróleo podem ser considerados ambientes extremos, propensos ao desenvolvimento de grupos bacterianos que dependem de condições anóxicas e de alta salinidade (PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021). Esse microbioma anaeróbico é responsável por importantes problemas na área de petróleo, sendo as bactérias redutoras de sulfato (BRS) um dos grupos associados a esses problemas mais estudados (NASSER et al., 2021). BRS são conhecidas por gerar grandes quantidades de H₂S durante o metabolismo de redução de sulfato através de vias de respiração anaeróbia (XU; LI; GU, 2016), podendo diminuir a qualidade do óleo, aumentar a biocorrosão e outros problemas relacionados à saúde ocupacional dos operadores em campo (NASSER e outros, 2021).

BRS podem formar biofilmes multicamadas em simbiose com bactérias produtoras de ácido (BPA) (XU; LI; GU, 2016), arqueias metanogênicas (SHI et al., 2020) e possivelmente outros grupos ainda não estudados. A presença desses biofilmes heterogêneos pode reduzir a eficiência dos biocidas utilizados no controle microbiano devido à dificuldade de atingir as camadas mais profundas (JENNEMAN; DE LEON, 2022). No entanto, a dinâmica de resposta dos biofilmes aos biocidas ainda não é completamente compreendida. Um estudo demonstrou o aumento da formação de biofilme após a exposição ao sulfato de tetraquis(hidroximetil)fosfônio (THPS) por *Desulfovibrio hontreensis* (XU et al., 2022), indicando que essa correlação entre a exposição ao biocida e o controle do biofilme pode não ser linear.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a existência de correlação entre concentração de biocida e controle de biofilmes em consórcios heterogêneos de BRS originados de amostras de água produzida. Foram avaliados biocidas utilizados na indústria de óleo e gás (THPS e glutaraldeído) e outras alternativas (cloroxilenol (PCMX) e a mistura comercial DEFENDER OG 327B).

5.3.2. Materiais e Métodos

5.3.2.1. Meio de cultura

O meio Postgate B modificado (POSTGATE, 1984; MCKENZIE; HAMILTON, 1992) (KH_2PO_4 , $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; NH_4Cl , $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Na_2SO_4 , $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; lactato de sódio, $7,0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$; extrato de levedura, $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ácido ascórbico, $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi utilizado para o crescimento dos consórcios. O pH foi ajustado para 7,6 com solução de NaOH. Solução de resazurina (0,025% p/v) $4,0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ foi adicionada como indicador de oxigênio. O meio foi purgado com N_2 (1 h por L) para reduzir o teor de oxigênio. O meio foi dividido em frascos de 30 mL, lacrados com tampas metálicas e esterilizados (15 min, 121°C). Antes do uso, foram adicionados 300 μL de solução de tioglicolato de sódio 124 g/L previamente filtrada em membrana de 0,22 μm para ajuste do potencial redox.

5.3.2.2. Enriquecimento dos consórcios de BRS

Três consórcios (CON1, CON2 e CON3) foram obtidos a partir de três diferentes amostras de água produzida coletadas em campos de petróleo brasileiros. CON1 e CON2 foram obtidas de água produzida de campos *offshore* ($22^\circ 32' 48.6''\text{S}$ $40^\circ 04' 02.6''\text{W}$ e $12^\circ 40' 04''\text{S}$ $38^\circ 33' 03''\text{W}$, respectivamente). CON3 foi cultivado a partir de água produzida de um campo *onshore* ($22^\circ 34' 54.2''\text{S}$ $40^\circ 19' 46.2''\text{W}$). CON1 e CON3 foram utilizados pela primeira vez em um estudo anterior (PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021). Uma alíquota de 10% (v/v) de cada amostra foi adicionada a frascos selados contendo meio de cultura Postgate B modificado, incubados a 35°C por 21 dias e transferidos semanalmente (10% (v/v)), para novos frascos estéreis, também contendo meio Postgate B modificado, para o enriquecimento.

5.3.2.3. Análises taxonômicas e predição funcional

5.3.2.3.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os três consórcios foram enviados para a empresa Neopropecta Microbiome (Santa Catarina, Brasil) para extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA e posterior sequenciamento do amplicon. A extração de DNA e a preparação da biblioteca seguiram um protocolo proprietário. Basicamente, o DNA foi extraído

manualmente usando esferas magnéticas com um protocolo desenvolvido internamente. O DNA total obtido por cada extração foi quantificado usando o fluorômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A região V3/V4 do gene 16S rRNA foi amplificada com os primers 341F (5' – CCTACGGGGRSGCAGCAG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (WANG et al., 2009; CAPORASO et al., 2011). As bibliotecas de amplicons foram sequenciadas no MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA), usando kits V3. As sequências brutas foram avaliadas quanto à sua qualidade no software FastQC (versão 0.11.8) (ANDREWS, 2010). As sequências foram depositadas no banco de dados NCBI SRA e estão acessíveis sob BioProject ID PRJNA913889.

A análise das sequências foi realizada usando o pipeline Mothur (1.46.1) (SCHLOSS et al., 2009). As sequências foram alinhadas e classificadas de acordo com sua taxonomia utilizando o banco de dados SILVA versão 138.1 (YILMAZ et al., 2014). A α -diversidade foi avaliada por meio dos índices de Simpson e Shannon através do número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Para verificar possíveis diferenças estruturais nas comunidades bacterianas, uma ANOVA two-way e um teste de Tukey subsequente foram usados entre os índices. A plotagem do perfil taxonômico foi construída em R, usando os pacotes "reshape2", "tidyverse" e "RColorBrewer", usando dados de abundância relativa, para fins de comparação (CHAPPIDI; VILLA; CANTAREL, 2019).

5.3.2.3.2. Predição funcional

As análises foram realizadas por meio do pipeline QIIME 2 2019.10 (BOLYEN et al., 2019). As sequências fastq geradas foram filtradas por qualidade através do plugin q2-demux e DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). A tabela contendo as sequências variáveis (ASVs) foi usada para inferir as vias metabólicas através do pipeline PiCRUST2 (YE; DOAK, 2009; LOUCA; DOEBELI, 2018; BARBERA et al., 2019; CZECH; STAMATAKIS, 2019; DOUGLAS et al., 2020). As rotas foram comparadas com o banco de dados MetaCyc (KARP; CASPI, 2011; CASPI et al., 2014, 2020) onde foi possível estabelecer o perfil de cada rota metabólica em diferentes níveis. Para analisar as rotas separadamente foi utilizado o software STAMP versão 2.1.3 (PARKS et al., 2014). Diferenças significativas no perfil

funcional entre os três consórcios foram analisadas por meio de ANOVA two-way ($p > 0,999$).

5.3.2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos biocidas

Quatro biocidas foram escolhidos para avaliar a resposta dos consórcios: sulfato de tetraquis(hidroxi metil)fosfônio (THPS; CAS 55566-30-8), glutaraldeído (CAS 111-30-8), cloroxilenol (PCMX; CAS 88-04-0) e a mistura comercial DEFENDER OG 327B (mistura comercial fornecida pela Dorf Ketal Brasil Ltda.). O teor de ativo (m/m) dos biocidas foi igualado de acordo com a concentração nos produtos para permitir comparações entre eles. Água destilada foi utilizada como solvente de diluição.

A CIM dos dois biocidas utilizados em indústrias de petróleo (THPS e glutaraldeído) e dos dois biocidas alternativos (PCMX e DEFENDER OG 327B) foi avaliada para cada consórcio. Primeiramente, um pré-inóculo de 10% (v/v) de cada consórcio foi adicionado a tubos contendo meio Postgate B modificado. Os tubos foram incubados por 24 h a 35°C. Assim, 1% (v/v) de inóculo e diferentes concentrações dos biocidas foram adicionados a placas de microtitulação de 96 poços contendo 200 µL do mesmo meio de cultura, conforme metodologia descrita por Schug et al. 2020. Para a validação do teste foi utilizado um controle positivo de cada consórcio, sem presença de biocida, e foram realizadas triplicatas. As placas de microtitulação foram incubadas em jarra de anaerobiose com gerador (Anaerobac, Probac, Brasil) por 72 h a 35°C, e o crescimento foi indicado por um precipitado preto observado no fundo do poço.

5.3.2.5. Formação e quantificação de biofilmes

Os biofilmes foram formados em placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano estéreis de 96 poços, com base na metodologia descrita em outro trabalho (STEPANOVIĆ et al., 2007). Resumidamente, 20 µL de pré-inóculo (consórcios incubados por 24 h a 35°C; descrito no item 2.4.) foram adicionados a 180 µL de meio Postgate B modificado em cada poço. As placas de microtitulação foram incubadas em jarra de anaerobiose com gerador (Anaerobac, Probac, Brasil) por 5 dias a 35°C.

Após o crescimento dos biofilmes, as placas de microtitulação foram lavadas com solução salina estéril (0,85% (m/v) NaCl) para remover as células não aderidas. Os biofilmes foram fixados com metanol 99% por 15 min. Após a fixação, 200 µL de solução de cristal violeta (2% (v/v)) foi adicionado aos poços por 5 min. O excesso de cristal violeta foi removido com água destilada. Finalmente, os biofilmes foram dissolvidos em 200 µL de etanol 95%, e a quantificação foi realizada em um espectrofotômetro com leitor de placas de microtitulação (Anthos Zenyth 200rt, Biochrom Ltd.) usando 570 nm de comprimento de onda.

5.3.2.5.1. Inibição da formação de biofilmes

A inibição da formação de biofilmes foi avaliada usando as concentrações 0,5xCIM, CIM e 2xCIM. O protocolo de formação e quantificação de biofilmes descrito no item 2.5. foi seguido. Para esta avaliação, os biocidas foram adicionados aos poços previamente à formação do biofilme. As placas de microtitulação foram mantidas a 35°C por 5 dias em jarra de anaerobiose com gerador (Anaerobac, Probac, Brasil). As condições foram avaliadas em octuplicata e a inibição foi calculada através da comparação da absorbância dos controles positivos (biofilmes sem exposição aos biocidas) com os biofilmes formados durante a exposição aos biocidas. Um controle negativo (somente meio de cultura) foi utilizado para a validação do teste.

5.3.2.5.2. Erradicação de biofilmes previamente formados

A eficácia dos biocidas na erradicação de biofilmes formados durante 5 dias foi avaliada. A formação e quantificação dos biofilmes foi realizada conforme item 2.5. Após a formação do biofilme, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina estéril (0,85% (p/v) NaCl). Os biocidas (CIM e 2xCIM) foram adicionados aos poços contendo o biofilme e uma matriz de água do mar sintética descrita na norma ASTM D1141. Os biocidas permaneceram em contato com os biofilmes por 24 h a 35°C. As avaliações foram realizadas em octuplicata. Em seguida, os biofilmes foram lavados e avaliados conforme descrito no item 2.5. Para calcular a erradicação, cada condição foi comparada com o respectivo controle positivo (biofilmes que não foram expostos a biocidas). Controles negativos (água do mar sintética e meio de cultura) foram usados para validação do teste.

5.3.3. Resultados

5.3.3.1. Taxonomia e predição funcional

Após o processamento dos dados, para os três consórcios sequenciados, foram utilizadas 709.397 sequências, distribuídas em 5.127 unidades taxonômicas operacionais (OTU) com distância máxima de 3% para o gene 16S rRNA. As análises de alfa diversidade demonstraram diferenças significativas nos índices de Shannon ($F = 1546$, $p < 0,0001$) e Simpson ($F = 4624$, $p < 0,0001$) em todas as amostras (Figura 1).

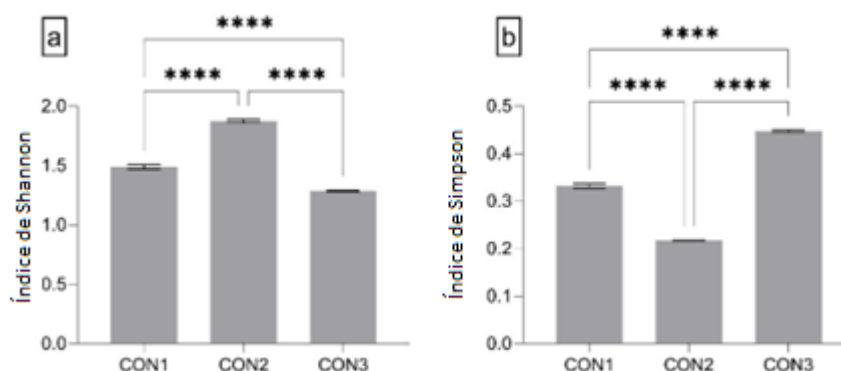


Figura 1. Análises de alfa diversidade (Shannon e Simpson) entre os consórcios (**** representa $p < 0,0001$).

Em relação à composição taxonômica, CON1 mostrou que o filo Proteobacteria foi o mais abundante (75,84%), seguido por Desulfobacterota (13,98%) e Firmicutes (5,93%). Em CON2, Proteobacteria também foi a mais abundante (64,04%), mas Firmicutes (19,64%) demonstrou maior abundância que Desulfobacterota (5,86%). Em CON3, a dinâmica de abundância em nível de filo foi alterada, sendo Firmicutes (28,55%) e Desulfobacterota (27,96%) os mais representativos, e Proteobacteria foi menor em relação aos outros dois consórcios (15,08%). Notavelmente, houve um aumento do filo Bacteroidota (10,83%) em CON3 (Figura 2A).

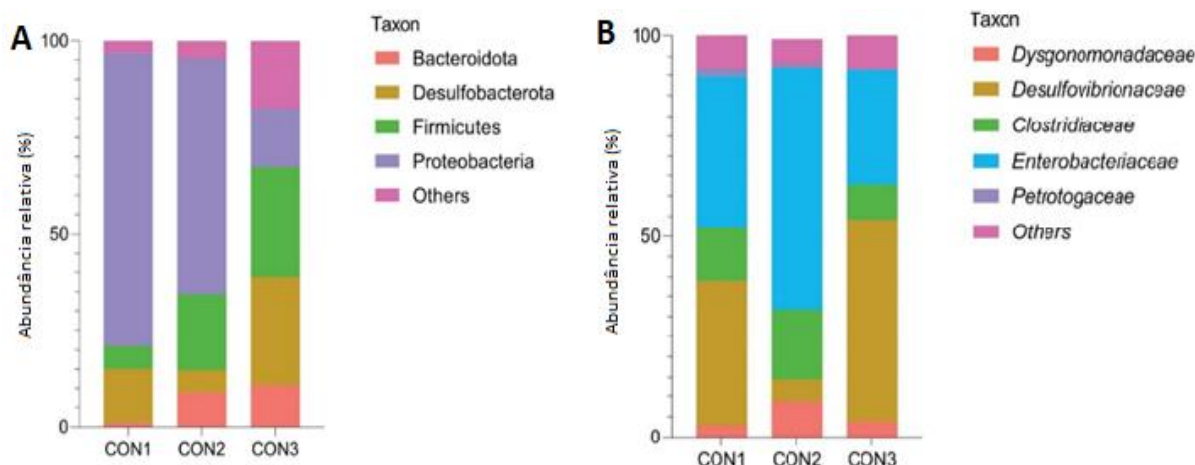


Figura 2. Abundância relativa em nível de filo (A) e nível de família (B) nos consórcios.

Em nível de família (Figura 2B), *Enterobacteriaceae* foi a mais abundante em CON1 (37,59%), seguida por *Desulfovibrionaceae* (36,13%) e *Clostridiaceae* (13,13%). Em CON2 a família mais abundante foi *Enterobacteriaceae* (60,12%) e *Clostridiaceae* (17,19%), com *Dysgonomonadaceae* aparecendo em 8,70% e *Desulfovibrionaceae* em 5,81%. Para CON3, *Desulfovibrionaceae* demonstrou uma abundância de 50,32% e *Enterobacteriaceae* de 28,59%.

A predição funcional usando PICRUST2 e comparando com o banco de dados MetaCyc revelou 332 vias metabólicas para os três consórcios analisados. Para facilitar a visualização, as vias relacionadas à biossíntese, degradação/ utilização/ assimilação, geração de precursores metabólicos e energéticos, modificação de macromoléculas e resistência antimicrobiana foram agrupadas de acordo com a abundância relativa de sequências.

A análise Two-way ANOVA não mostrou diferenças significativas para as vias de biossíntese entre os consórcios analisados ($p > 0,999$). As vias de biossíntese de transportadores, cofatores e vitaminas, aminoácidos e nucleosídeos e nucleotídeos demonstraram a maior abundância relativa de sequências. Para as vias de degradação, não foram observadas diferenças significativas entre as categorias ($p > 0,999$). As vias de degradação mais abundantes para os três consórcios foram relacionadas a carboidratos e metabólitos secundários.

Considerando que não houve diferenças significativas quando as vias metabólicas foram agrupadas por categorias, as vias que apresentaram diferenças significativas e outras vias que importantes para este estudo foram analisadas (Figura 4). Vias relacionadas à fermentação, metabolismo do enxofre, resistência a antibióticos e degradação de aldeídos foram selecionadas. Para essas vias selecionadas, as maiores abundâncias foram encontradas em CON2. A abundância das vias preditas está relacionada com a quantidade de informações disponíveis no banco de dados para cada OTU, e microrganismos ambientais como BRS apresentam consideravelmente menos estudos do que enterobactérias, por exemplo.

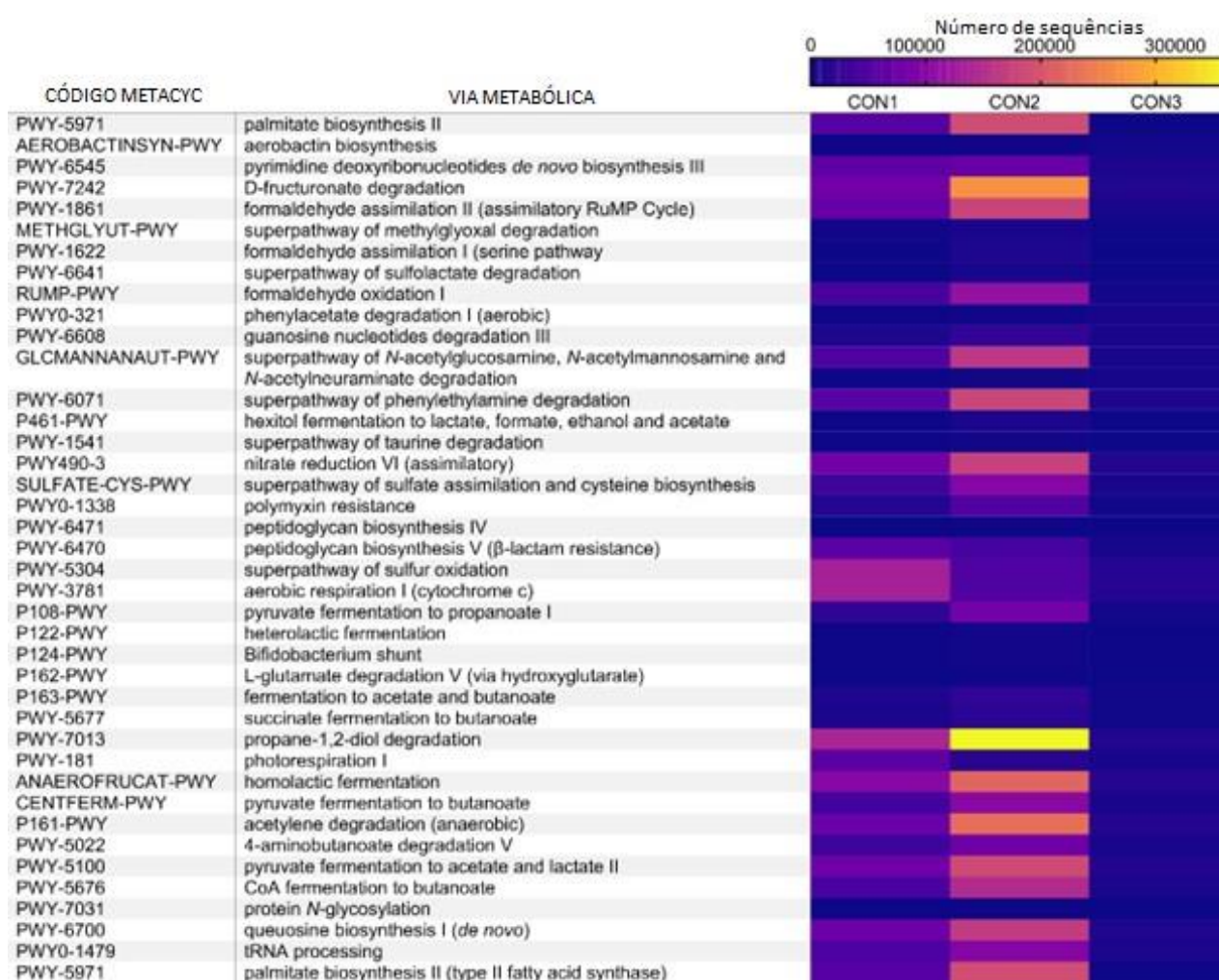


Figura 4. Predição de vias metabólicas relacionadas à fermentação, metabolismo do enxofre, resistência a antibióticos e degradação de aldeídos com diferença significativa nos consórcios.

5.3.3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos biocidas

Os resultados de CIM do THPS, Glutaraldeído, PCMX e DEFENDER OG 327B de cada consórcio foram apresentados na Tabela 1. Em geral, os resultados foram variáveis, mas o glutaraldeído apresentou a menor CIM em CON1 e CON2, e o THPS apresentou o maior CIM em todos os consórcios testados.

Tabela 1. CIM dos biocidas nos três consórcios originados de amostras de água produzida.

Consórcio	Biocida	CIM (mg-L ⁻¹)
CON1	THPS	100
	Glutaraldeído	10
	PCMX	50
	DEFENDER OG 327B	50
CON2	THPS	90
	Glutaraldeído	20
	PCMX	30
	DEFENDER OG 327B	50
CON3	THPS	90
	Glutaraldeído	10
	PCMX	5
	DEFENDER OG 327B	60

5.3.3.3. Inibição da formação e erradicação de biofilmes

A inibição da formação de biofilmes após a exposição ao THPS, glutaraldeído, PCMX ou DEFENDER OG 327B pode ser observada na Figura 5. O nível de inibição variou de acordo com o consórcio analisado, o biocida e sua concentração utilizada.

Uma correlação inesperada entre o aumento da formação de biofilmes e o aumento da concentração de THPS foi observada nos três consórcios testados (Figura 5A). O THPS foi o único biocida testado que apresentou essa correlação nos três consórcios.

Embora o glutaraldeído seja um biocida comumente utilizado em campos de petróleo, entre os consórcios analisados, apenas CON3 foi previamente exposto a

esse biocida. Provavelmente devido a esse histórico, quando exposto à maior concentração de glutaraldeído esse consórcio apresentou resposta semelhante ao THPS (Figura 5B), de aumento da formação de biofilmes.

O PCMX foi o biocida com melhor resposta na inibição de biofilmes. Apesar da variação dos resultados de acordo com a concentração, não houve indução da formação de biofilmes em nenhuma dosagem. Considerando estes resultados, o PCMX pode ser classificado como um biocida inibidor de biofilme (Figura 5C).

DEFENDER OG 327B (Figura 5D), desencadeou respostas diversas, dependendo do consórcio. O biofilme CON1 apresentou resistência ao DEFENDER OG 327B, independente da concentração utilizada. A formação de biofilmes do CON2 foi induzida por concentrações acima da CIM. A formação de biofilmes pelo CON3 foi inibida nas três concentrações testadas.

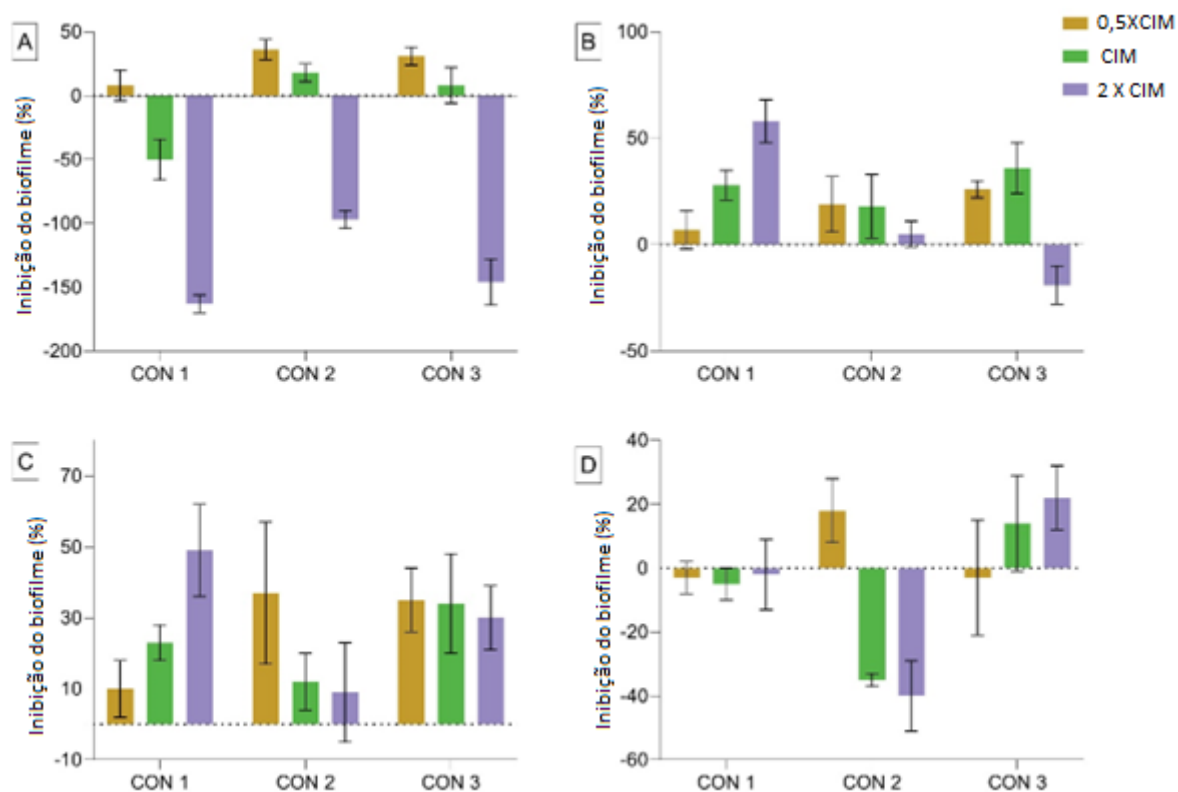


Figura 5. Inibição de biofilmes pelos consórcios CON1, CON2 e CON3 através da exposição ao THPS (A), glutaraldeído (B), PCMX (C) e DEFENDER OG 327B (D).

A erradicação de biofilmes de 5 dias foi demonstrada na Figura 6. Todos os biocidas testados demonstraram algum nível de erradicação, mas o THPS apresentou os melhores resultados em 2xMIC. Provavelmente o caráter ácido do THPS, sintetizado pela reação química do gás fosfina com formaldeído aquoso na presença de ácido sulfúrico (HONGZHONG; XUSHENG; CHENG, 2005), tenha contribuído para esses resultados.

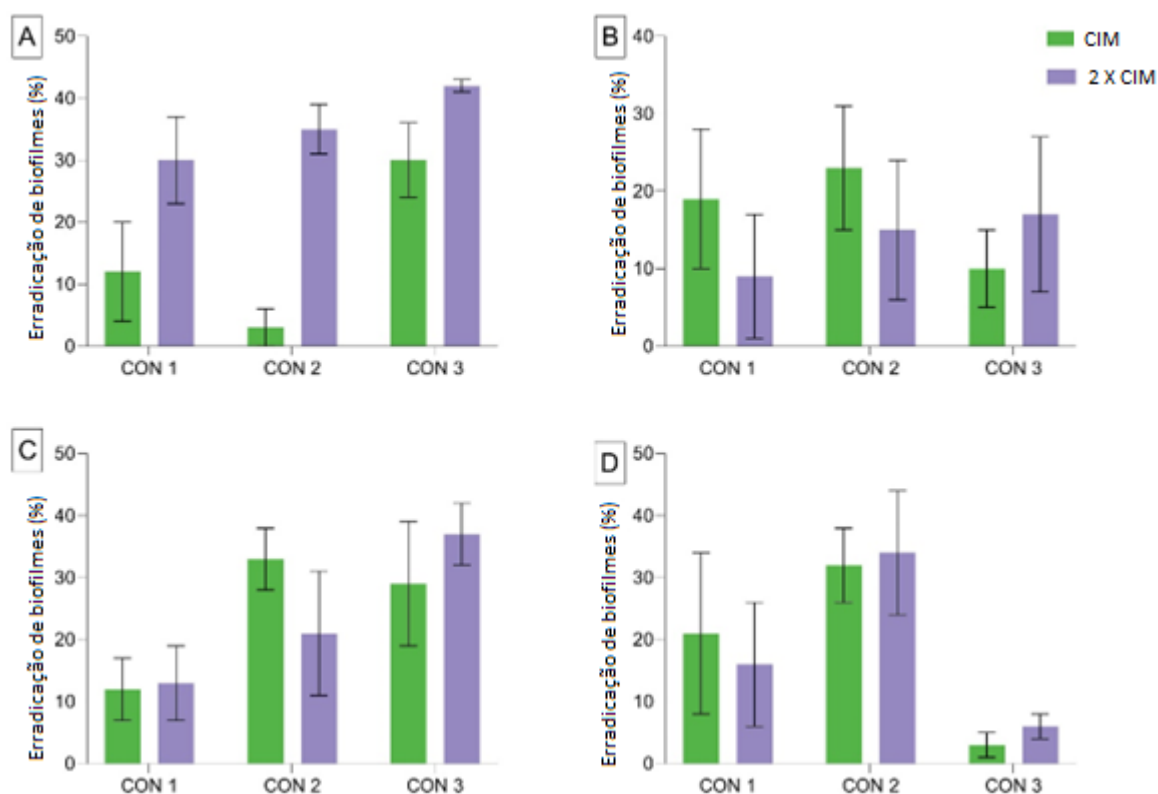


Figura 6. Erradicação de biofilmes de 5 dias pela exposição por 24 h ao THPS (A), glutaraldeído (B), PCMX (C) e DEFENDER OG 327B (D).

5.3.4. Discussão

Observando a composição taxonômica a nível de filo, CON1 e CON2 (provenientes de campos *offshore*) compartilharam mais semelhanças do que CON3 (de um campo *onshore*). A nível de família, apesar da composição mineral específica do meio Postgate B modificado, uma diversidade considerável foi identificada nos três consórcios. Os membros *Enterobacteriaceae* e *Clostridiaceae* podem ser classificados como bactérias produtoras de ácido (BPA). *Enterobacteriaceae* é conhecida por estabelecer fortes interações simbióticas com BRS (KUSHKEVYCH,

2019), tornando seu isolamento ainda mais difícil. A presença de *Enterobacteriaceae* não é comum em água produzida bruta, mas representantes dessa família foram identificados em campos de petróleo somente após o processamento e armazenamento da água produzida (SONG et al., 2019). A presença dessa família está fortemente associada às atividades antrópicas, mas sua presença na água produzida pode ser explicada pela mistura com outros dejetos aquosos em tanques, como águas pluviais e resíduos de limpeza de plataformas. Outras famílias como *Dysgonomonadeceae* e *Clostridiaceae* também demonstraram abundância significativa nos consórcios. *Dysgonomonadeceae* não é uma família comum, mas também foi mencionada em um estudo que analisou uma amostra de óleo coletada de um campo petrolífero iraquiano (SHLIMON et al., 2020). Neste estudo, as famílias *Dysgonomonadeceae* e *Clostridiaceae* foram descritas como dominantes e possivelmente demonstrando algum tipo de relação

Curiosamente, quando o perfil taxonômico das amostras de água produzida que geraram os consórcios foi previamente avaliado (Pereira, Pilz-Junior e Corção 2021), *Desulfovibrionaceae* não foi a família de BRS mais abundante em *Offshore* 1A (CON1) e, principalmente em *Onshore* 2 (CON3), onde essa família era quase indetectável. Os resultados atuais demonstraram diferenças nos perfis microbianos quando comparadas as amostras de água produzida e seus respectivos consórcios. A família *Desulfoplanaceae* foi a mais abundante nas amostras de água produzida (PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021), mas poucos estudos foram encontrados relatando seu crescimento em laboratório (WATANABE; KOJIMA; FUKUI, 2015; ZOUCH et al., 2017). Esses resultados trazem à tona a discussão levantada por WADE et al., 2023, relacionada à representatividade do uso de métodos dependentes de cultura para avaliação de problemas microbiológicos em campos de petróleo, uma vez que grande parte das bactérias presentes em água produzida não são capazes de se desenvolver em meio de cultura.

Na tentativa de isolar as BRS presentes nos consórcios, foi utilizada a metodologia descrita por Kushkevych, 2019. Na_2SO_3 (7,5 g·L⁻¹) foi adicionado ao meio Postgate B modificado como um inibidor de crescimento de gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, incluindo também *Bacteroides*, *Pseudomonas* e *Clostridium*. Cinco rodadas de isolamento foram realizadas; no entanto, o isolamento das BRS não foi atingido (dados não mostrados).

A caracterização funcional dos consórcios demonstrou abundância significativa de vias relacionadas à fermentação e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) (ANAEROFrucat-PWY, PWY-7013, PWY-5100, PWY-5676, entre outras). Em geral, CON2 apresentou maior abundância de vias relacionadas a essas funções, seguido por CON1 e CON3. A presença destas vias metabólicas pode estar relacionada à abundância de *Enterobacteriaceae* (HARIRCHI et al., 2022). Por outro lado, a abundância de vias relacionadas ao metabolismo do enxofre (PWY-5304, SULFATE-CYS-PWY e SO4ASSIM-PWY) não foi influenciada pela abundância da família Desulfovibrionaceae. Uma explicação é a seleção, pelo meio Postgate B modificado, de membros *Enterobacteriaceae* capazes de metabolizar derivados de enxofre, embora tenham sido encontrados um número limitado de estudos sobre redução de sulfato por membros dessa família (QIU et al., 2009; DE MATOS et al., 2018).

O THPS é o biocida mais aplicado nos campos de petróleo brasileiros (KORENBLUM et al., 2010). Sabe-se que o THPS inibe o crescimento de bactérias planctônicas, mas o efeito sobre células sésseis é menos discutido. Já foi demonstrada a redução de células planctônicas usando THPS (CIM 75 ppm) seguida por um aumento na produção de biofilme por *Desulfovibrio hontreensis* SY-21 (XU et al., 2022). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que a biocorrosão aumentou 65% quando as células foram expostas a 65 ppm de THPS.

Neste estudo, a mesma tendência de aumento na formação de biofilmes induzida THPS relatada anteriormente foi identificada nos três consórcios analisados (Figura 5). Uma hipótese é a ativação dos mecanismos de resistência presentes em bactérias pré-selecionadas durante a exposição a biocidas no campo de petróleo. Esses mecanismos podem estar relacionados à resposta fenotípicas de exposição ao THPS, que ocorrem como consequência de mudanças temporárias na expressão gênica, como a indução de reguladores de biofilme (MERCHEL PIOVESAN PEREIRA; WANG; TAGKOPOULOS, 2020). Uma investigação aprofundada precisa ser conduzida para esclarecer os mecanismos que impulsionam a formação de biofilmes induzida pela exposição ao THPS.

O PCMX é amplamente utilizado na área de saúde e cosméticos, por apresentar menor toxicidade que outros biocidas, principalmente para humanos

(GUESS; BRUCH, 1986). Essa característica também pode ser explorada no tratamento da água produzida, para reduzir os problemas de exposição ocupacional, críticos para os biocidas. Este estudo revelou resultados promissores do PCMX na inibição de biofilmes, que podem estar relacionados ao modo de ação do PCMX. O PCMX atua principalmente na desestabilização da membrana celular, diminuindo a fluidez da membrana, aumentando sua rigidez e causando ruptura (POGER; MARK, 2019). Um modo de ação semelhante é encontrado em biocidas líticos, conhecidos por seus efeitos em biofilmes. Porém, antes da aplicação efetiva na água produzida, o PCMX necessita de melhorias químicas devido a sua baixa solubilidade em água (330 mg/L aproximadamente), que pode gerar problemas relacionados a sólidos em suspensão, e até entupimento de linhas.

Já o produto comercial DEFENDER OG 327B foi desenvolvido para aplicação em água produzida. Apesar da composição sinérgica mencionada do DEFENDER OG 327B (segredo industrial), os resultados demonstraram baixa atividade de inibição e erradicação de biofilmes. A baixa eficiência contra biofilmes pode não ser estendida a células planctônicas, uma vez que os resultados de CIM demonstraram o efeito deste produto em células planctônicas, e este aspecto não foi avaliado em profundidade neste estudo. O tratamento à base de DEFENDER OG 327B requer um produto antibiofilme para preencher as lacunas.

5.3.5. Conclusão

Este estudo demonstrou que a diversidade de BRS encontrada em água produzida não é mantida durante o processo de enriquecimento em meio de cultura. Por outro lado, mesmo no meio mineral Postgate B modificado, as famílias de BPA *Enterobacteriaceae* e *Clostridaceae* foram encontradas em abundância. Esses achados reforçam a ideia de que existe uma forte relação sintrófica entre os grupos BRS e BPA.

Em alguns casos, a exposição dos consórcios bacterianos a biocidas utilizados em campos de petróleo induziu a formação de biofilmes. Essa tendência de aumento da formação de biofilmes foi observada principalmente durante o uso de THPS, mesmo em concentrações acima da CIM. De maneira geral, os resultados demonstram que não houve aumento da inibição de biofilmes atrelado ao aumento

da concentração do biocida. Foram observadas variações na eficiência de acordo com o biocida utilizado, sua concentração e o consórcio bacteriano, mostrando a necessidade de considerar esses aspectos durante o planejamento de tratamentos biocidas em campos de petróleo.

5.3.6. Referências

- Al-Ghouti, M.A., Al-Kaabi, M.A., Ashfaq, M.Y., Da'na, D.A., 2019. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *J. Water Process Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.02.001>
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- ASTM D1141, 2013. Standard practice for the preparation of substitute ocean water. American Society for Testing and Materials International.
- Barbera, P., Kozlov, A.M., Czech, L., Morel, B., Darriba, D., Flouri, T., Stamatakis, A., 2019. EPA-ng: massively parallel evolutionary placement of genetic sequences. *Syst. Biol.* 68, 365–369.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Lofffield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A. V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Priesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooff, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C.A., Holland, T.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Kubo, A., 2014. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res.* 42, D459–D471.
- Caspi, R., Billington, R., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P.E., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P., Karp, P.D., 2020. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—a 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 48, D445–D453.
- Chappidi, S., Villa, E.C., Cantarel, B.L., 2019. Using Mothur to determine bacterial community composition and structure in 16S ribosomal RNA datasets. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 67, e83.

- Czech, L., Stamatakis, A., 2019. Scalable methods for analyzing and visualizing phylogenetic placement of metagenomic samples. *PLoS One* 14, e0217050.
- de Matos, L.P., Costa, P.F., Moreira, M., Gomes, P.C.S., de Queiroz Silva, S., Gurgel, L.V.A., Teixeira, M.C., 2018. Simultaneous removal of sulfate and arsenic using immobilized non-traditional SRB mixed culture and alternative low-cost carbon sources. *Chem. Eng. J.* 334, 1630–1641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.035>
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38, 685–688.
- Guess, W.L., Bruch, M., 1986. A review of available toxicity data on the topical antimicrobial, chloroxylenol. *J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol.* 5, 233–262.
- Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojoumi, S.A., Parchami, Milad, Parchami, Mohsen, Varjani, S., Khanal, S.K., Wong, J., Awasthi, M.K., 2022. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. *Bioengineered* 13, 6521–6557.
- Hongzhong, B., Xusheng, G., Cheng, Y., 2005. SYNTHESIS AND APPLICATION OF TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SULFATE AND TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM CHLORIDE.
- Jenneman, G.E., De León, K.B., 2022. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 169, 105385.
- Jia, R., Yang, D., Abd Rahman, H. Bin, Gu, T., 2017. Laboratory testing of enhanced biocide mitigation of an oilfield biofilm and its microbiologically influenced corrosion of carbon steel in the presence of oilfield chemicals. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 125, 116–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.006>
- Karp, P.D., Caspi, R., 2011. A survey of metabolic databases emphasizing the MetaCyc family. *Arch. Toxicol.* 85, 1015–1033.
- Korenblum, E., Valoni, É., Penna, M., Seldin, L., 2010. Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 791–800. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2281-4>
- Kushkevych, I., 2019. Isolation and Purification of Sulfate-Reducing Bacteria, in: *Microorganisms*. IntechOpen.
- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2596-1>
- Liang, B., Zhang, K., Wang, L.-Y., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Gu, J.-D., Mu, B.-Z., 2018. Different diversity and distribution of archaeal community in the aqueous and oil phases of production fluid from high-temperature petroleum reservoirs. *Front. Microbiol.* 9, 841.
- Louca, S., Doebeli, M., 2018. Efficient comparative phylogenetics on large trees. *Bioinformatics* 34, 1053–1055.
- McKenzie, J., Hamilton, W.A., 1992. The assay of in-situ activities of sulphate-reducing bacteria in a laboratory marine corrosion model. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 29, 285–297.
- Merchel Piovesan Pereira, B., Wang, X., Tagkopoulos, I., 2020. Short-and long-term transcriptomic responses of *Escherichia coli* to biocides: a systems analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00708-20.

- Nasser, B., Saito, Y., Alarawi, M., Al-Humam, A.A., Mineta, K., Gojobori, T., 2021. Characterization of microbiologically influenced corrosion by comprehensive metagenomic analysis of an inland oil field. *Gene* 774, 145425.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124.
- Pereira, G.F., Pilz-Junior, H.L., Corção, G., 2021. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. *Sci. Rep.* 11, 1–12.
- Poger, D., Mark, A.E., 2019. Effect of triclosan and chloroxylenol on bacterial membranes. *J. Phys. Chem. B* 123, 5291–5301.
- Postgate, J.R., 1984. *The Sulphate-Reducing Bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Qiu, R., Zhao, B., Liu, J., Huang, X., Li, Q., Brewer, E., Wang, S., Shi, N., 2009. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. *J. Hazard. Mater.* 164, 1310–1315.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
- Schug, A.R., Bartel, A., Scholtzek, A.D., Meurer, M., Brombach, J., Hensel, V., Fanning, S., Schwarz, S., Feßler, A.T., 2020. Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Vet. Microbiol.* 248, 108791. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108791>
- Shi, X., Gao, G., Tian, J., Wang, X.C., Jin, X., Jin, P., 2020. Symbiosis of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in sewer systems. *Environ. Int.* 143, 105923. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105923>
- Shlimon, A.G., Mansurbeg, H., Othman, R.S., Gittel, A., Aitken, C.M., Head, I.M., Finster, K.W., Kjeldsen, K.U., 2020. Microbial community composition in crude oils and asphalts from the Kurdistan Region of Iraq. *Geomicrobiol. J.* 37, 635–652.
- Song, Z., Chen, S., Zhao, F., Zhu, W., 2019. Whole metagenome of injected and produced fluids reveal the heterogenetic characteristics of the microbial community in a water-flooded oil reservoir. *J. Pet. Sci. Eng.* 176, 1198–1207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.02.008>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., BONAVENTURA, G.D.I., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115, 891–899.
- Wade, S.A., Webb, J.S., Eckert, R.B., Jenneman, G.E., Rice, S.A., Skovhus, T.L., Sturman, P., Kotu, S.P., Richardson, M., Goeres, D.M., 2023. The role of standards in biofilm research and industry innovation. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 177, 105532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105532>
- Wang, Y., Hoenig, J.D., Malin, K.J., Qamar, S., Petrof, E.O., Sun, J., Antonopoulos, D.A., Chang, E.B., Claud, E.C., 2009. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J.* 3, 944–954. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.37>
- Watanabe, M., Kojima, H., Fukui, M., 2015. *Desulfoplanes formicivorans* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a blackish meromictic lake, and emended description of the family Desulfomicrobiaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1902–1907. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000197>

- Xu, D., Li, Y., Gu, T., 2016. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. *Bioelectrochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.03.003>
- Xu, L., Guan, F., Ma, Y., Zhang, R., Zhang, Y., Zhai, X., Dong, X., Wang, Y., Duan, J., 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* 108048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108048>
- Ye, Y., Doak, T.G., 2009. A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000465.
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42, D643–D648.
- Zouch, H., Karray, F., Armougom, F., Chifflet, S., Hirschler-Réa, A., Kharrat, H., Kamoun, L., Ben Hania, W., Ollivier, B., Sayadi, S., 2017. Microbial diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment cultures associated with anaerobic biotransformation of coastal stockpiled phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Front. Microbiol.* 8, 1583.

6. DISCUSSÃO GERAL

Esta tese foi redigida no formato de artigos, conforme modelo proposto pelo PPGMAA. A sequência de artigos apresentada foi definida conforme os objetivos apresentados para o trabalho. Neste item, são discutidos os principais achados de cada artigo e a relação com o objetivo principal.

O artigo 1 (*“Improving the microbial control in oil fields from biocide selection to monitoring tools: a review”*) foi escrito com o objetivo de consolidar os dados mais recentes disponíveis em literatura envolvendo aplicação de biocidas na indústria de petróleo. O artigo foi submetido para o periódico internacional *Petroleum Science & Technology*, bastante acessado por indústrias da área. O artigo teve como principais focos a explanação sobre o impacto da aplicação de biocidas no aumento da resistência bacteriana abordando modos de ação de cada biocida e a discussão sobre estratégias e ferramentas a serem utilizadas para aumentar a eficiência dos tratamentos em campo. Diferente dos demais artigos de revisão sobre a aplicação de biocidas na indústria de petróleo, esta revisão demonstrou a importância das etapas de definição clara do objetivo e alvos microbianos do tratamento, seleção dos biocidas adequados em cada caso e monitoramento através de indicadores de performance (KPI). Esse conjunto de etapas buscam reduzir o impacto gerado pelas variáveis físicas, químicas e microbiológicas no resultado do tratamento.

Tratamentos padrão com moléculas e concentrações que não variam de acordo com o cenário são amplamente utilizados na indústria de petróleo (CAMPA *et al.*, 2019). Com isso, na tentativa de aumentar a eficiência do tratamento, muitas vezes sobredosagens de biocidas intrinsecamente tóxicos são aplicadas na água produzida. Além da questão envolvendo o impacto ambiental desse volume excedente de biocida no meio-ambiente, questões de saúde ocupacional dos operadores da plataforma também preocupam. O impacto na população bacteriana também é uma incógnita. Carecem estudos relacionados ao comportamento da população bacteriana da água produzida à sobredosagens de biocidas, uma vez que esta população é variável e apresenta diferentes níveis de suscetibilidade (KEASLER *et al.*, 2017; PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021). Sobredosagens de biocidas inadequados podem acabar selecionando uma população bacteriana ainda mais resistente e/ou induzindo à fenótipos de resistência, como a produção de biofilmes,

gerando um problema secundário. O mesmo ocorre com a aplicação de subdosagens. Muitas vezes, concentrações insuficientes do biocida para um efetivo controle populacional acabam sendo gatilhos para o aumento da resistência bacteriana.

A fim de reduzir essa problemática, o artigo abordou a necessidade de o planejamento do tratamento estar alinhado ao objetivo e da utilização de ferramentas adequadas para o monitoramento. Sabe-se que é necessária a atualização de normas e a criação de protocolos modernos relacionados a avaliação de biocidas utilizados na indústria do petróleo (WADE et al., 2023). As práticas difundidas na indústria utilizam, em sua maioria, apenas técnicas dependentes de cultura como diluição seriada e Número Mais Provável (NMP), porém essas técnicas não são suficientes para uma avaliação aprofundada dos microrganismos ou para a seleção das moléculas. Técnicas moleculares para a análise da composição da população microbiana, especialmente de bactérias, como o sequenciamento de 16S rRNA e quantificação de microrganismos específicos através de RTPCR podem ser utilizadas a fim de englobar nas análises aqueles microrganismos não-cultiváveis que podem desempenhar papéis chave nos problemas a serem solucionados em campo. O alto custo de implantação associado a técnicas moleculares é um desafio, porém, ainda assim, são um recurso a ser explorado em casos de histórico de resistência microbiana a tratamentos previamente utilizados. Além disso, o custo inicial associado a implantação destas técnicas, pode ser reduzido quando observados os efeitos promissores na redução de custos associados à corrosão, tratamentos de efluentes e outras questões.

Juntamente aos aspectos práticos de seleção e monitoramento de biocidas, este artigo trouxe informações sobre os mecanismos de resistência a biocidas dos principais alvos bacterianos na indústria de petróleo, BRS e BPA. Nesses microrganismos, bombas de efluxo e formação de biofilmes são os mecanismos de resistência mais fortemente associados a exposição ao THPS, ADBAC e glutaraldeído (VIKRAM; BOMBERGER; BIBBY, 2015; EL-AZIZI; FARAG; KHANDORI, 2016; MAILLARD, 2018; XU et al., 2022). Entretanto, este é um tema que necessita de estudos mais aprofundados, já que maior parte dos estudos abordando resistência bacteriana a essas moléculas foi realizada com

microrganismos da área da saúde. A resistência de microrganismos ambientais a essas moléculas é menos explorada.

Com base nas informações coletadas no artigo 1, os experimentos do artigo 2 foram planejados, buscando-se responder às seguintes questões: 1) quais as diferenças na composição microbiana da água produzida de plataformas *onshore* e *offshore* brasileiras; 2) qual a influência de determinados fatores abióticos na composição microbiana; e, por último, 3) quais os níveis de resistência de BRS e BPA presentes nessas amostras aos biocidas comumente utilizados para tratamento de água produzida. O artigo 2 intitulado “*The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields*” foi publicado no periódico internacional *Scientific Reports*.

Para o estudo foram utilizadas quatro amostras de água produzida, duas coletadas em diferentes poços da mesma plataforma *offshore* e as outras duas coletadas em diferentes plataformas *onshore*. Foi possível observar uma grande variação na composição microbiana das amostras. Com isso, buscou-se uma correlação entre a composição microbiana e os fatores abióticos teor de cloretos (salinidade), pH e teor de sulfato. Tanto as BRS, quanto as BPA presentes nas amostras Offshore 1b, Onshore 1 e Onshore 2 demonstraram correlação com os fatores pH e teor de sulfato. Na amostra Onshore 2 não houve correlação com nenhum dos fatores analisados. É importante salientar que, apesar da conhecida importância destes fatores abióticos para o desenvolvimento microbiano, a água produzida é uma matriz complexa onde outros fatores não abordados neste estudo podem estar influenciando majoritariamente a composição da amostra. Curiosamente, dentre os três fatores abióticos analisados, a salinidade obteve a menor influência. Estudos anteriores demonstraram que a salinidade da água produzida pode variar de 0 – 270.000 mg·L⁻¹ de Cl⁻ (JIMÉNEZ et al., 2018; AL-GHOUTI et al., 2019b) e esse fator é um dos direcionadores da composição microbiana. Teoricamente, quanto maior a salinidade, menor a diversidade, contudo nestes resultados, outros fatores se sobrepuseram à influência da salinidade.

Consórcios de BRS e BPA foram enriquecidos a partir das amostras de água produzida. Não houve crescimento em meio de cultura de BRS e BPA originadas da amostra Offshore 1b, e BRS da amostra Onshore 1, demonstrando a

alta abundância de bactérias não-cultiváveis. Os consórcios de BRS obtidos demonstraram diferenças de suscetibilidade aos biocidas, sendo ADBAC o biocida que apresentou a maior CIM ($> 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), não sendo indicado isoladamente para tratamento de BRS em campos de petróleo. Sabe-se que combinações de outros biocidas com ADBAC são sinérgicas (GREENE et al., 2006), mas não foram avaliadas neste estudo. THPS, o biocida mais utilizado pela indústria de petróleo no Brasil, obteve variação de CIM entre os consórcios. Os consórcios de BPA, por sua vez, demonstraram maior resistência no geral aos biocidas testados. Quando considera-se que ambos os grupos bacterianos estão presentes na água produzida e interagem simtróficamente (XU; LI; GU, 2016; DAWUDA; TALEB-BERROUANE; KHAN, 2021), principalmente através de biofilmes, a questão da resistência aos biocidas torna-se ainda mais preocupante.

O artigo 3, nomeado “*Enhanced biofilm formation after exposure to biocides by heterogeneous consortia containing sulfate-reducing bacteria*”, foi submetido ao periódico internacional *International Biodeterioration & Biodegradation*. O artigo buscou responder às seguintes questões: 1) a composição de BRS encontrada na água produzida se mantém nos consórcios; 2) qual o comportamento dos biofilmes formados por consórcios de BRS provenientes de diferentes amostras de água produzida às variações na concentração de biocidas. Os consórcios obtidos no artigo 2 (Offshore 1A (CON1) e Onshore 2 (CON3)), foram utilizados e, para enriquecer o estudo, também foi avaliado um consórcio adicional (CON2) proveniente de uma amostra de água produzida coletada em um campo de petróleo diferente dos demais. Em relação aos biocidas, optou-se por avaliar o THPS por tratar-se do biocida mais aplicado no Brasil (KORENBUM et al., 2010), o glutaraldeído, biocida mais aplicado no mundo (KAHRILAS et al., 2015), e duas alternativas, uma combinação de biocidas comercial (DEFENDER OG 327B) e um biocida sem registro de aplicação nesta área (PCMX).

Após a análise taxonômica dos consórcios em meio de cultura, observou-se a presença de diversas famílias, além das pertencentes ao grupo das BRS. Entre essas famílias, destacaram-se *Enterobacteriaceae* e *Clostridiaceae*, que são integrantes do grande grupo das BPA. A interação entre BRS e BPA já foi relatada anteriormente (XU; LI; GU, 2016; DAWUDA; TALEB-BERROUANE; KHAN, 2021), mas a predominância do grupo de BPA frente a BRS em meio de mineral Postgate

B modificado levanta duas hipóteses. A primeira hipótese reforça a ideia da relação da relação sintrófica entre os dois grupos, onde, devido à baixa disponibilidade de nutrientes no meio, as BPA utilizaram o lactato como fonte de carbono e as BRS utilizaram subprodutos de metabolismo produzidos por BPA como fonte de energia. A segunda hipótese é de que as condições de laboratório, incluindo a composição do meio de cultura, não foram adequadas para permitir a predominância das BRS, cujo desenvolvimento é mais fastidioso em relação às BPA.

Nos três consórcios analisados, dois dos quais tiveram a composição da água produzida apresentada no artigo 2 (CON1 e CON3), somente uma família de BRS foi identificada, *Desulfovibrionaceae*. Por outro lado, nas amostras de água produzida correspondentes, foram identificadas ao menos três famílias de BRS: *Desulfoplaneaceae*, *Desulfohalobiaceae* e *Desulfovibrionaceae*. Essa redução na diversidade de BRS em meio de cultura demonstra a importância da associação de ferramentas moleculares na definição de tratamentos biocida.

Os três consórcios foram expostos aos biocidas a fim de avaliar a inibição e erradicação de biofilmes em diferentes concentrações baseadas na CIM. Em ambas as avaliações, diferentes comportamentos foram observados de acordo com o consórcio, o biocida utilizado e sua concentração. Esta variação de resultados remete novamente à importância da avaliação caso a caso antes do estabelecimento de um tratamento biocida.

Curiosamente, em todos os consórcios analisados, as sobredosagens de THPS (2xCIM) induziram ao aumento na formação de biofilmes. Como o THPS é um biocida amplamente utilizado em campos de petróleo brasileiros, existe a possibilidade de as bactérias presentes nos consórcios já terem sido submetidas à pressão seletiva referente à exposição ao biocida em campo, pré-selecionando a população mais resistente. A CIM encontrada para o THPS vai de encontro com essa suposição, pois foi a mais alta dentre os biocidas testados em todos os consórcios. A tendência de aumento da formação de biofilme pela exposição ao THPS por uma cepa isolada de BRS já foi relatada anteriormente (XU et al., 2022), entretanto o comportamento de consórcios heterogêneos contendo BRS a essa molécula é uma novidade. A avaliação de consórcios neste caso é importante, pois se aproxima mais

da realidade do campo do que a análise de bactérias isoladas, principalmente quando a dinâmica de interações entre os grupos bacterianos é considerada.

7. CONCLUSÃO

Através do artigo 1 foi possível demonstrar as lacunas existentes durante o planejamento e execução de tratamentos com biocidas por parte da indústria de petróleo. As metodologias baseadas em cultura são as mais utilizadas para seleção e monitoramento de biocidas, porém pode-se demonstrar que necessitam de complementação com outros métodos que não dependem do crescimento de bactérias, como os métodos moleculares. Além disso, sugeriu-se a implementação de dois ou mais KPI alinhados com o objetivo do tratamento para acompanhar a eficiência em campo. Observou-se também a menor disponibilidade de dados associados a aplicação de biocidas em campos de petróleo comparado a outras áreas, como indústria de alimentos e saúde.

O artigo 2 demonstrou a grande variação na composição microbiana da água produzida de campos de petróleo brasileiros, variando mesmo em poços de petróleo vizinhos. A presença quase indetectável de archaea nas amostras de água produzida analisadas demonstrou a predominância absoluta de bactérias. Dentre as amostras analisadas, observou-se a maior diversidade bacteriana na água produzida de campos *onshore*, mas maiores estudos são necessários para comprovar este achado.

Em relação aos fatores abióticos, a influência dos fatores pH e teor de sulfato na diversidade bacteriana se sobrepôs a salinidade. Outros fatores abióticos não analisados neste estudo também podem impactar na composição bacteriana das amostras, como temperatura e a presença de produtos químicos utilizados durante a extração de petróleo, como inibidores de corrosão e sequestrantes de H₂S. Entretanto, os grupos BRS e BPA estavam abundantemente presentes em todas as amostras analisadas, concluindo-se que são intrínsecos a este ambiente.

Em relação aos biocidas, a CIM variou de acordo com a composição dos consórcios. No geral, as BPA demonstraram um maior nível de resistência aos biocidas comparado às BRS. Esses resultados demonstram a necessidade de avaliação das características da água produzida e a sua relação com a concentração de biocida a ser utilizada em campo.

No artigo 3, quando comparadas a composição bacteriana da água produzida e seu respectivo consórcio de BRS notou-se uma importante perda de diversidade. Essa perda de diversidade pode estar associada à incapacidade de reproduzir as condições encontradas em campo no laboratório, selecionando assim as bactérias menos fastidiosas.

Em relação ao efeito dos biocidas em biofilmes contendo BRS, houve variação nos resultados dependendo do consórcio e da concentração utilizada. Pode-se comprovar que na maioria dos casos não existe um ganho de eficiência com o aumento indiscriminado da concentração de biocida. Ao contrário, no caso do THPS, por exemplo, existe um estímulo ao aumento da formação de biofilmes relacionado ao aumento da concentração. Além disso, o impacto ambiental causado pelo aumento indiscriminado da concentração de biocidas na água produzida e as questões de saúde ocupacional dos colaboradores expostos a estes produtos corrobora com a ideia de que cada tratamento deve ser planejado e executado de forma individualizada.

Este estudo demonstrou a necessidade de um olhar mais aprofundado sob a aplicação de biocidas em campos de petróleo, considerando as características físico-químicas e microbiológicas da água produzida. Estudos futuros relacionados aos mecanismos de resistência de BRS e BPA aos biocidas, especialmente ao THPS, e análises moleculares do efeito dos biocidas sobre esses grupos bacterianos são importantes e podem contribuir para o desenvolvimento de tratamentos com menor impacto ambiental e na saúde ocupacional.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, M. A. et al. Utilization of 1-Butylpyrrolidinium Chloride Ionic Liquid as an Eco-Friendly Corrosion Inhibitor and Biocide for Oilfield Equipment: Combined Weight Loss, Electrochemical and SEM Studies. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 2019.

ABBAS, R. H.; HERNANDEZ, J. F.; AL ABBAS, F. M. *Holding Water — A Corrosion Management Program in a Vast Seawater Injection System* CORROSION 2020, 14 jun. 2020. .

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. e B. (ANP). *Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural*.

AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN, K.; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil–water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. *Anaerobe*, v. 16, n. 1, p. 12–18, 2010.

AL-GHOUTI, M. A. et al. *Produced water characteristics, treatment and reuse: A review* *Journal of Water Process Engineering*, 2019a. .

AL-GHOUTI, M. A. et al. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *Journal of Water Process Engineering*, v. 28, p. 222–239, 2019b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214714418306858>>.

AL-JANABI, Y. T. An overview of corrosion in oil and gas industry: upstream, midstream, and downstream sectors. *Corrosion Inhibitors in the Oil and Gas Industry*, p. 1–39, 2020.

ALVES, J. I. et al. Long-chain fatty acids degradation by Desulfomonile species and proposal of “Candidatus Desulfomonile palmitatoxidans”. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 3227, 2020.

AN, B. A.; KUNTE, H.-J.; KOERDT, A. *Microbiologically Influenced Corrosion by Halophilic (Salt-Loving) Nitrate and Sulfate-Reducing Microorganisms*, abr. 2021. .

ANDREWS, S. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data* Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, , 2010. .

ASTM D1141. *Standard practice for the preparation of substitute ocean water*. [s.l.] American Society for Testing and Materials International, 2013.

AUDA, I. G.; ALI SALMAN, I. M.; ODAH, J. G. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Reports*, v. 20, p. 100666, 2020.

BALCH, W. E.; WOLFE, R. S. New Approach to the Cultivation of Methanogenic Bacteria: 2-Mercaptoethanesulfonic Acid (HS-CoM)-Dependent Growth of *Methanobacterium Ruminantium* in a Pressureized Atmosphere. *Applied and environmental microbiology*, v. 32, n. 6, p. 781–791, dez. 1976.

BARBERA, P. et al. EPA-ng: massively parallel evolutionary placement of genetic sequences. *Systematic biology*, v. 68, n. 2, p. 365–369, 2019.

BARROS, A. C.; MELO, L. F.; PEREIRA, A. A Multi-Purpose Approach to the Mechanisms of Action of Two Biocides (Benzalkonium Chloride and Dibromonitripropionamide): Discussion of *Pseudomonas fluorescens*' Viability and Death. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 842414, 2022.

BARTON, L. L.; FAUQUE, G. D. Sulfate-Reducing Prokaryotes: Changing Paradigms. In: *Sulfate-Reducing Bacteria and Archaea*. [s.l.] Springer, 2022. p. 1–55.

BAS, S.; KRAMER, M.; STOPAR, D. Biofilm surface density determines biocide effectiveness. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2443, 2017.

BEDOYA, K. et al. Assessment of the microbial community and biocide resistance profile in production and injection waters from an Andean oil reservoir in Colombia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 157, p. 105137, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830520310684>>.

BOLYEN, E. et al. *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2* *Nature Biotechnology*, 2019. .

BONIFAY, V. et al. *Metabolomic and Metagenomic Analysis of Two Crude Oil Production Pipelines Experiencing Differential Rates of Corrosion* *Frontiers in Microbiology* , 2017. . Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00099>>.

BOOKER, A. E. et al. Deep-subsurface pressure stimulates metabolic plasticity in shale-colonizing *Halanaerobium* spp. *Applied and environmental microbiology*, v. 85, n. 12, p. e00018-19, 2019.

BORE, E. et al. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology*, v. 153, n. 4, p. 935–946, 2007.

BURGER, E. D. Synergism of anthraquinone with an oilfield biocide to

inhibit sulfide generation from sulfate-reducing bacteria. In: CORROSION 2004, *Anais...OnePetro*, 2004.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAMPA, M. F. et al. Unconventional oil and gas energy systems: an unidentified hotspot of antimicrobial resistance? *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2392, 2019a.

CAMPA, M. F. et al. Surface water microbial community response to the biocide 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide, used in unconventional oil and gas extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019b.

CÂNDIDO, E. de S. et al. *Bacterial cross-resistance to anti-infective compounds. Is it a real problem?* *Current Opinion in Pharmacology*, 2019. .

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516–4522, 2011. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/108/Supplement_1/4516>.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D459–D471, 2014.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes-a 2019 update. *Nucleic acids research*, v. 48, n. D1, p. D445–D453, 2020.

CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2003.

CHAPPIDI, S.; VILLA, E. C.; CANTAREL, B. L. Using Mothur to determine bacterial community composition and structure in 16S ribosomal RNA datasets. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 67, n. 1, p. e83, 2019.

CZECH, L.; STAMATAKIS, A. Scalable methods for analyzing and visualizing phylogenetic placement of metagenomic samples. *PLoS One*, v. 14, n. 5, p. e0217050, 2019.

DANIEL, L. et al. Predominance and Metabolic Potential of Halanaerobium spp. in Produced Water from Hydraulically Fractured Marcellus Shale Wells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 8, p. e02659-16, 21 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.02659-16>>.

DAWUDA, A.-W.; TALEB-BERROUANE, M.; KHAN, F. A probabilistic

model to estimate microbiologically influenced corrosion rate. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 148, p. 908–926, 2021.

DE MATOS, L. P. et al. Simultaneous removal of sulfate and arsenic using immobilized non-traditional SRB mixed culture and alternative low-cost carbon sources. *Chemical Engineering Journal*, v. 334, p. 1630–1641, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894717319472>>.

DICKHOUT, J. M. et al. *Produced water treatment by membranes: A review from a colloidal perspective* *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017. .

DOUGLAS, G. M. et al. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *bioRxiv*, 2019.

DOUGLAS, G. M. et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*, v. 38, n. 6, p. 685–688, 2020.

E., B. A. et al. Sulfide Generation by Dominant Halanaerobium Microorganisms in Hydraulically Fractured Shales. *mSphere*, v. 2, n. 4, p. e00257-17, 21 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00257-17>>.

EHMAN, D. L. Determination of parts-per-billion levels of hydrogen sulfide in air by potentiometric titration with a sulfide ion-selective electrode as an indicator. *Analytical Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 918–920, 1976.

EL-AZIZI, M.; FARAG, N.; KHardORI, N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 47, p. 60–71, 2016.

ELUMALAI, P. et al. Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. *3 Biotech*, v. 9, n. 3, p. 79, 2019.

ELUMALAI, P. et al. Characterization of crude oil degrading bacterial communities and their impact on biofilm formation. *Environmental Pollution*, v. 286, p. 117556, 2021.

FAUQUE, G. D.; BARTON, L. L. Chapter 1 - Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In: POOLE, R. K. B. T.-A. IN M. P. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2012. 60p. 1–90.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite

against sulfate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 6, p. 354–360, 1 dez. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000284>>.

GÓMEZ-MANZO, S. et al. The Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) of *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a Quinohemeprotein containing PQQ, Cytochrome b and Cytochrome c. Molecular and Catalytic Properties. *Journal of bacteriology*, 2010.

GONZÁLEZ-BENÍTEZ, N. et al. Bacterial diversity in aqueous/sludge phases within diesel fuel storage tanks. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 12, p. 180, 2020.

GOVIL, T. et al. Chapter 35 - Taxonomical Diversity of Extremophiles in the Deep Biosphere. In: DAS, S.; DASH, H. R. B. T.-M. D. IN THE G. E. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2019. p. 631–656.

GRAY, N. D. et al. The quantitative significance of Syntrophaceae and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes. *Environmental Microbiology*, 2011.

GREENE, E. A. et al. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006.

GRIGORYAN, A. A. et al. Competitive oxidation of volatile fatty acids by sulfate-and nitrate-reducing bacteria from an oil field in Argentina. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 14, p. 4324–4335, 2008.

GUESS, W. L.; BRUCH, M. A review of available toxicity data on the topical antimicrobial, chloroxylenol. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, v. 5, n. 4, p. 233–262, 1986.

GUO, J. et al. Realizing a high-rate sulfidogenic reactor driven by sulfur-reducing bacteria with organic substrate dosage minimization and cost-effectiveness maximization. *Chemosphere*, 2019.

GUY RIEFLER, R. et al. Role of sulfur-reducing bacteria in a wetland system treating acid mine drainage. *Science of the Total Environment*, 2008.

HAMMES, F. et al. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water research*, v. 44, n. 13, p. 3915–3923, 2010.

HARIRCHI, S. et al. Microbiological insights into anaerobic digestion for

biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. *Bioengineered*, v. 13, n. 3, p. 6521–6557, 2022.

HE, G.-X. et al. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 1, p. 262–265, 2004.

HIDAKA, K.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. The presence of nitrate-and sulfate-reducing bacteria contributes to ineffectiveness souring control by nitrate injection. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 129, p. 81–88, 2018.

HIDALGO, K. J. et al. *Genome-Resolved Meta-Analysis of the Microbiome in Oil Reservoirs Worldwide* *Microorganisms*, 2021. .

HONGZHONG, B.; XUSHENG, G.; CHENG, Y. SYNTHESIS AND APPLICATION OF TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SULFATE AND TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM CHLORIDE. 2005.

HUANG, L. et al. *Role of LptD in Resistance to Glutaraldehyde and Pathogenicity in Riemerella anatipestifer* *Frontiers in Microbiology*, 2019. .
Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01443>>.

IBP. *Maiores produtores mundiais de petróleo em 2021*. Disponível em: <<https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/maiores-produtores-mundiais-de-petroleo-em-2020/>>. Acesso em: 23 mar. 2023.

IDREES, M. et al. Multimodal role of amino acids in microbial control and drug development. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 330, 2020.

ISMAIL, W. A. et al. Editorial: Petroleum Microbial Biotechnology: Challenges and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 833, 2017.

JAIN, D. K. Evaluation of the semisolid Postgate's B medium for enumerating sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 22, n. 1, p. 27–38, 1995.

JAUREGUIBEITIA, A. et al. Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007.

JENNEMAN, G. E.; DE LEON, K. B. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 169, p. 105385, 2022.

Jl, J.-H. et al. Methanogenic biodegradation of C13 and C14 n-alkanes activated by addition to fumarate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.

153, p. 104994, 2020.

JIA, R. et al. Laboratory testing of enhanced biocide mitigation of an oilfield biofilm and its microbiologically influenced corrosion of carbon steel in the presence of oilfield chemicals. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 125, p. 116–124, 2017a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830517308508>>.

JIA, R. et al. Mitigation of the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm using alkyldimethylbenzylammonium chloride enhanced by d-amino acids. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 117, p. 97–104, 2017b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516308162>>.

JIA, R. et al. *Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review* *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2019a. .

JIA, R. et al. A sea anemone-inspired small synthetic peptide at sub-ppm concentrations enhanced biofilm mitigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 139, p. 78–85, 2019b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830518307637>>.

JIANG, G. et al. Dosing free nitrous acid for sulfide control in sewers: results of field trials in Australia. *Water research*, v. 47, n. 13, p. 4331–4339, 2013.

JIANG, W. et al. A critical review of analytical methods for comprehensive characterization of produced water. *Water*, v. 13, n. 2, p. 183, 2021.

JIMÉNEZ, S. et al. *State of the art of produced water treatment* *Chemosphere*, 2018. .

JOHNSON, R. J. Combining Advanced Biocide Evaluation and Microbial Monitoring to Optimise Microbial Control. In: SPE International Conference on Oilfield Chemistry, *Anais...OnePetro*, 2017.

JOHNSON, R. J. et al. Reservoir Souring – Latest developments for application and mitigation. *Journal of Biotechnology*, 2017.

JONES, I. A.; JOSHI, L. T. Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2276, 2021.

JURELEVICIUS, D. et al. Long-term souring treatment using nitrate and biocides in high-temperature oil reservoirs. *Fuel*, v. 288, p. 119731, 2021.

KAHRILAS, G. A. et al. Biocides in Hydraulic Fracturing Fluids: A Critical Review of Their Usage, Mobility, Degradation, and Toxicity. *Environmental Science*

& *Technology*, v. 49, n. 1, p. 16–32, 6 jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es503724k>>.

KAMARISIMA; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. The utilization of aromatic hydrocarbon by nitrate- and sulfate-reducing bacteria in single and multiple nitrate injection for souring control. *Biochemical Engineering Journal*, v. 143, p. 75–80, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X18304273>>.

KANEHISA, M. et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 2016.

KANEHISA, M. Toward Understanding the Origin and Evolution of Cellular Organisms. *Protein science: a publication of the Protein Society*, v. 28, n. 11, p. 1947–1951, nov. 2019.

KANEHISA, M. et al. KEGG: Integrating Viruses and Cellular Organisms. *Nucleic acids research*, v. 49, n. D1, p. D545–D551, jan. 2021.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 1, p. 27–30, jan. 2000.

KANNAN, P. et al. A Review of Characterization and Quantification Tools for Microbiologically Influenced Corrosion in the Oil and Gas Industry: Current and Future Trends. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 57, n. 42, p. 13895–13922, out. 2018.

KARATZAS, K. A. G. et al. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 5, p. 1508–1516, 2008.

KARP, P. D.; CASPI, R. A survey of metabolic databases emphasizing the MetaCyc family. *Archives of toxicology*, v. 85, p. 1015–1033, 2011.

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

KEASLER, V. et al. Biocides overview and applications in petroleum microbiology. *Trends in oil and gas corrosion research and technologies*, p. 539–562, 2017.

KORENBLUM, E. et al. Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 3,

p. 791–800, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2281-4>>.

KRAEMER, S. A.; RAMACHANDRAN, A.; PERRON, G. G. Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, v. 7, n. 6, p. 180, 2019.

KUSHKEVYCH, I. Isolation and Purification of Sulfate-Reducing Bacteria. In: *Microorganisms*. [s.l.] IntechOpen, 2019.

KVAREKVÅL, J.; MOLONEY, J. Sour corrosion. *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies*, p. 113–147, 2017.

LAHME, S. et al. Metabolites of an oil field sulfide-oxidizing, nitrate-reducing *Sulfurimonas* sp. cause severe corrosion. *Applied and environmental microbiology*, v. 85, n. 3, p. e01891-18, 2019.

LAHME, S. et al. Severe corrosion of carbon steel in oil field produced water can be linked to methanogenic archaea containing a special type of [NiFe] hydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, n. 3, p. e01819-20, 2020.

LEE, C. et al. Field applications for on-site DNA extraction and qPCR. In: CORROSION 2015, *Anais...OnePetro*, 2015.

LEE, M. H. P. et al. Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010.

LI, X.-X. et al. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 170–185, 2017a.

LI, X. X. et al. *Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs* *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2017b. .

LI, Y. et al. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 896, 2016.

LI, Y. et al. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: a review. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 34, n. 10, p. 1713–1718, 2018.

LIANG, B. et al. Different diversity and distribution of archaeal community in the aqueous and oil phases of production fluid from high-temperature petroleum reservoirs. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 841, 2018.

LIANG, R. et al. Roles of thermophilic thiosulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 89, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00089>>.

LIU, X. et al. A mixture of D-amino acids enhances the biocidal efficacy of CMIT/MIT against corrosive *Vibrio harveyi* biofilm. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.

LIU, Z. et al. Sulfate-reducing bacteria in anaerobic bioprocesses: basic properties of pure isolates, molecular quantification, and controlling strategies. *Environmental Technology Reviews*, v. 7, n. 1, p. 46–72, 2018.

LOUCA, S.; DOEBELI, M. Efficient comparative phylogenetics on large trees. *Bioinformatics*, v. 34, n. 6, p. 1053–1055, 2018.

LV, M. et al. Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X65 steel in seawater containing sulfate-reducing bacteria and iron-oxidizing bacteria. *Journal of Materials Research and Technology*, v. 8, n. 5, p. 4066–4078, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785419306386>>.

LV, M.; DU, M. A review: microbiologically influenced corrosion and the effect of cathodic polarization on typical bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 17, n. 3, p. 431–446, 2018.

MACHEBOEUF, P. et al. *Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes* *FEMS Microbiology Reviews*, 2006.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 77, n. 2, p. 103–116, 2000.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents* *Trends in Microbiology*, 2001. .

MAILLARD, J.-Y. Resistance of bacteria to biocides. *Microbiology spectrum*, v. 6, n. 2, p. 2–6, 2018.

MAILLARD, J. Y. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *Journal of Hospital Infection*, 2007.

MARCIALES, A. et al. *Mechanistic microbiologically influenced corrosion modeling—A review* *Corrosion Science*, 2019. .

MARSHALL, I. P. G. et al. Environmental filtering determines family-level

structure of sulfate-reducing microbial communities in subsurface marine sediments. *The ISME journal*, v. 13, n. 8, p. 1920–1932, 2019.

MATA, J. A. et al. A Detailed Phenotypic Characterisation of the Type Strains of Halomonas Species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 3, p. 360–375, 2002.

MCGINLEY, H. R.; VAN DER KRAAN, G. M. Benchmarking of biocidal chemistries for the control of corrosion biofilms. In: SPE International Conference & Workshop on Oilfield Corrosion, *Anais...OnePetro*, 2012.

MCINERNEY, M. J.; SIEBER, J. R.; GUNSALUS, R. P. *Syntrophy in anaerobic global carbon cycles* *Current Opinion in Biotechnology*, 2009. .

MCKENZIE, J.; HAMILTON, W. A. The assay of in-situ activities of sulphate-reducing bacteria in a laboratory marine corrosion model. *International biodeterioration & biodegradation*, v. 29, n. 3–4, p. 285–297, 1992.

MD ZAIN, W. S.; HAIRUL SALLEH, N. I.; ABDULLAH, A. Natural Biocides for Mitigation of Sulphate Reducing Bacteria. *International Journal of Corrosion*, v. 2018, p. 3567569, 2018.

MEADE, E.; SLATTERY, M. A.; GARVEY, M. Biocidal resistance in clinically relevant microbial species: a major public health risk. *Pathogens*, v. 10, n. 5, p. 598, 2021.

MELANDER, R. J.; BASAK, A. K.; MELANDER, C. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural product reports*, v. 37, n. 11, p. 1454–1477, 2020.

MERCHEL PIOVESAN PEREIRA, B. et al. *Tolerance to Glutaraldehyde in Escherichia coli Mediated by Overexpression of the Aldehyde Reductase YqhD by YqhC* *Frontiers in Microbiology* , 2021. . Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.680553>>.

MERCHEL PIOVESAN PEREIRA, B.; WANG, X.; TAGKOPOULOS, I. Short-and long-term transcriptomic responses of Escherichia coli to biocides: a systems analysis. *Applied and environmental microbiology*, v. 86, n. 14, p. e00708-20, 2020.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MIRALLES-ROBLEDILLO, J. M. et al. *DMSO Reductase Family:*

Phylogenetics and Applications of Extremophiles *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. .

MORENTE, E. O. et al. Biocide tolerance in bacteria. *International journal of food microbiology*, v. 162, n. 1, p. 13–25, 2013.

MORIGAKI, M. K. et al. Salinidade em petróleo bruto: otimização de metodologia e proposta de um novo método para extração de sais em petróleo. *Química Nova*, v. 33, p. 607–612, 2010.

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

MYHR, S. et al. Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 3, p. 400–408, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-001-0881-8>>.

NASSER, B. et al. Characterization of microbiologically influenced corrosion by comprehensive metagenomic analysis of an inland oil field. *Gene*, v. 774, p. 145425, 2021.

NEFF, J.; LEE, K.; DEBLOIS, E. M. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects BT - Produced Water: Environmental Risks and Advances in Mitigation Technologies. In: LEE, K.; NEFF, J. (Ed.). New York, NY: Springer New York, 2011. p. 3–54.

OBŁĄK, E.; FUTOMA-KOŁOCH, B.; WIECZYŃSKA, A. Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 22, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02978-0>>.

OLLIVIER, B.; CAYOL, J. Fermentative, iron-reducing, and nitrate-reducing microorganisms. *Petroleum microbiology*, p. 71–88, 2005.

OREN, A. The Order Halanaerobiales, and the Families Halanaerobiaceae and Halobacteroidaceae. In: ROSENBERG, E. et al. (Ed.). *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 153–177.

PANNEKENS, M. et al. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *New Biotechnology*, v. 49, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678418316935>>.

PARKS, D. H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 27–33, 2005.

PARTHIPAN, P. et al. Neem extract as a green inhibitor for microbiologically influenced corrosion of carbon steel API 5LX in a hypersaline environments. *Journal of Molecular Liquids*, v. 240, p. 121–127, 2017.

PARTHIPAN, P. et al. Allium sativum (garlic extract) as a green corrosion inhibitor with biocidal properties for the control of MIC in carbon steel and stainless steel in oilfield environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 132, p. 66–73, 2018a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051730375X>>.

PARTHIPAN, P. et al. Glycolipid biosurfactant as an eco-friendly microbial inhibitor for the corrosion of carbon steel in vulnerable corrosive bacterial strains. *Journal of Molecular Liquids*, v. 261, p. 473–479, 2018b.

PARTHIPAN, P. et al. Evaluation of *Syzygium aromaticum* aqueous extract as an eco-friendly inhibitor for microbiologically influenced corrosion of carbon steel in oil reservoir environment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 7, p. 1441–1452, 2021.

PEREIRA, G. F.; PILZ-JUNIOR, H. L.; CORÇÃO, G. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

PETROBRAS. *Principais operações - Bacias*. Disponível em: <<https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/principais-operacoes/bacias/>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

PICENO, Y. M. et al. Temperature and injection water source influence microbial community structure in four Alaskan North Slope hydrocarbon reservoirs. *Frontiers in Microbiology*, 2014.

POGER, D.; MARK, A. E. Effect of triclosan and chloroxylenol on bacterial membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 123, n. 25, p. 5291–5301, 2019.

POS, K. M. *Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump* *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2009. .

POSTGATE, J. R. *The Sulphate-Reducing Bacteria*. 2nd. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984.

PRAJAPAT, G. et al. Application of Biotechnology in Oil and Gas

Industries. In: *Environmental Microbiology and Biotechnology*. [s.l.] Springer, 2021. p. 113–133.

PROCÓPIO, L. The oil spill and the use of chemical surfactant reduce microbial corrosion on API 5L steel buried in saline soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 21, p. 26975–26989, 2021.

PURWASENA, I. A. et al. The Potential of Clove Essential Oil Microemulsion as an Alternative Biocide Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *J. Pure Appl. Microbiol*, v. 14, n. 1, p. 261–269, 2020.

QIAN, Z. et al. *Recent advances in dissimilatory sulfate reduction: From metabolic study to application* *Water Research*, 2019. .

QIU, R. et al. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, n. 2–3, p. 1310–1315, 2009.

RABUS, R. et al. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: From enzymatic reactions to the environment. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2016.

RAJBONGSHI, A.; GOGOI, S. B. A review on anaerobic microorganisms isolated from oil reservoirs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 7, p. 1–19, 2021.

ROYCHOUDHURY, A. N. et al. Dissimilatory sulphate reduction in hypersaline coastal pans: an integrated microbiological and geochemical study. *Geobiology*, v. 11, n. 3, p. 224–233, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gbi.12027>>.

S., G. D. et al. Draft Genome Sequence of *Geotoga petraea* Strain HO-Geo1, Isolated from a Petroleum Reservoir in Russia. *Microbiology Resource Announcements*, v. 8, n. 29, p. e00706-19, ago. 2021.

SANTOS, J. C. dos et al. Diversity of sulfate-reducing prokaryotes in petroleum production water and oil samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 151, p. 104966, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830519316191>>.

SAUER, K. et al. Neutral super-oxidised solutions are effective in killing *P. aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, v. 25, n. 1, p. 45–54, 2009.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial

communities. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHUG, A. R. et al. Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Veterinary Microbiology*, v. 248, p. 108791, 2020.

SENTHILMURUGAN, B. et al. Microbially induced corrosion in oilfield: microbial quantification and optimization of biocide application. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2019.

SHI, X. et al. Symbiosis of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in sewer systems. *Environment International*, v. 143, p. 105923, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041202031878X>>.

SHLIMON, A. G. et al. Microbial community composition in crude oils and asphalts from the Kurdistan Region of Iraq. *Geomicrobiology Journal*, v. 37, n. 7, p. 635–652, 2020.

SIERRA-GARCIA, I. N. et al. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales. *Extremophiles*, v. 21, n. 1, p. 211–229, 2017.

SINGH, B. P. et al. *Editorial: Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges* *Frontiers in Microbiology*, 2019. .

SINGH, S. et al. *Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/ electrophilic stress* *Free Radical Biology and Medicine*, 2013. .

SIVAKUMAR, K. et al. *Salinity-Mediated Increment in Sulfate Reduction, Biofilm Formation, and Quorum Sensing: A Potential Connection Between Quorum Sensing and Sulfate Reduction?* *Frontiers in Microbiology*, 2019. .

SKOVHUS, T. L.; WHITBY, C. *Oilfield Microbiology*. [s.l.] CRC Press, 2019.

SOLER, A. J. et al. Identification and Characterization of Planktonic and Sessile Consortium Associated with Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) In the Oil and Gas Industry. In: *CORROSION 2021, Anais...OnePetro*, 2021.

SONG, Z. et al. Whole metagenome of injected and produced fluids reveal the heterogenetic characteristics of the microbial community in a water-flooded oil reservoir. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 176, p. 1198–1207, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920410519301354>>.

SOUZA, P. M. et al. *Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria in Produced Water from the Petroleum Industry Using Essential OilsMolecules*, 2017. .

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STEWART, P. S.; GRAB, L.; DIEMER, J. A. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *Journal of Applied Microbiology*, v. 85, n. 3, p. 495–500, 1998.

SUGAI, Y.; OWAKI, Y.; SASAKI, K. Simulation Study on Reservoir Souring Induced by Injection of Reservoir Brine Containing Sulfate-Reducing Bacteria. *Sustainability*, v. 12, n. 11, p. 4603, 2020.

SUN, J. et al. Arsenite removal without thioarsenite formation in a sulfidogenic system driven by sulfur reducing bacteria under acidic conditions. *Water Research*, 2019.

TABATA, A. et al. Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 47, n. 7, p. 2093–2099, 2003.

THUME, K. et al. The metabolite dimethylsulfoxonium propionate extends the marine organosulfur cycle. *Nature*, v. 563, n. 7731, p. 412–415, 2018.

TIAN, Y.; XUE, S.; MA, Y. Comparative analysis of bacterial community and functional species in oil reservoirs with different in situ temperatures. *International Microbiology*, v. 23, n. 4, p. 557–563, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10123-020-00125-1>>.

UNSAL, T. et al. Assessment of 2, 2-Dibromo-3-Nitrilopropionamide Biocide Enhanced by D-Tyrosine against Zinc Corrosion by a Sulfate Reducing Bacterium. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 60, n. 10, p. 4009–4018, 2021.

VASCONCELLOS, S. P. et al. The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 1513–1518, 2011.

VIGNERON, A. et al. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle. *ISME Journal*, 2017.

VIGNERON, A. et al. *Syntrophic Hydrocarbon Degradation in a Decommissioned Off-Shore Subsea Oil Storage Structure Microorganisms*, 2021. .

VIKRAM, A.; BOMBERGER, J. M.; BIBBY, K. J. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015.

VIKRAM, A.; LIPUS, D.; BIBBY, K. Metatranscriptome analysis of active microbial communities in produced water samples from the Marcellus Shale. *Microbial Ecology*, 2016.

WADE, S. A. et al. The role of standards in biofilm research and industry innovation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 177, p. 105532, 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830522001603>>.

WAITE, D. W. et al. Proposal to reclassify the proteobacterial classes deltaproteobacteria and oligoflexia, and the phylum thermodesulfobacteria into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020.

WANG, D. et al. Mitigating microbiologically influenced corrosion of an oilfield biofilm consortium on carbon steel in enriched hydrotest fluid using 2,2-dibromo-3-nitropropionamide (DBNPA) enhanced by a 14-mer peptide. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 57, p. 146–152, 2020.

WANG, D. et al. Mitigation of carbon steel biocorrosion using a green biocide enhanced by a nature-mimicking anti-biofilm peptide in a flow loop. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 9, n. 1, p. 67, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-022-00553-z>>.

WANG, H. et al. Distribution and diversity of bacterial communities and sulphate-reducing bacteria in a paddy soil irrigated with acid mine drainage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, n. 1, p. 196–206, 2016.

WANG, J. T. et al. Long-Term Feeding of Elemental Sulfur Alters Microbial Community Structure and Eliminates Mercury Methylation Potential in Sulfate-Reducing Bacteria Abundant Activated Sludge. *Environmental Science and Technology*, 2018.

WANG, Y. et al. 16S rRNA Gene-Based Analysis of Fecal Microbiota from Preterm Infants with and without Necrotizing Enterocolitis. *The ISME journal*, v. 3, n. 8, p. 944–954, ago. 2009.

WANG, Y. et al. Corrosion of EH40 steel affected by *Halomonas titanicae* dependent on electron acceptors utilized. *Corrosion Science*, v. 182, p. 109263, 2021.

WATANABE, M.; KOJIMA, H.; FUKUI, M. Desulfoplanes Formicivorans Gen. Nov., Sp. Nov., a Novel Sulfate-Reducing Bacterium Isolated from a Blackish Meromictic Lake, and Emended Description of the Family Desulfomicrobiaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 65, n. Pt 6, p. 1902–1907, jun. 2015.

WHALEN, P. A.; TRACEY, D. R.; DUGUAY, J. Adenosine Triphosphate (ATP) measurement technology. *Microbiological Sensors for the Drinking Water Industry*. IWA, 2018.

WILLIAMS, T. M.; MCGINLEY, H. R. Deactivation of industrial water treatment biocides. In: CORROSION 2010, *Anais...OnePetro*, 2010.

WILLIAMS, T. M.; SCHULTZ, C. M. Effect of environmental parameters on the stability and performance of oil and gas biocides. In: SPE International Symposium on Oilfield Chemistry, *Anais...OnePetro*, 2015.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. *Bioelectrochemistry*, 2016.

XU, L. et al. Inadequate dosing of THPS treatment increases microbially influenced corrosion of pipeline steel by inducing biofilm growth of *Desulfovibrio hontreensis* SY-21. *Bioelectrochemistry*, p. 108048, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156753942100311X>>.

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

YANG, Z. et al. Biostimulation of sulfate-reducing bacteria used for treatment of hydrometallurgical waste by secondary metabolites of urea decomposition by *Ochrobactrum* sp. POC9: From genome to microbiome analysis. *Chemosphere*, v. 282, p. 131064, 2021.

YE, Y.; DOAK, T. G. A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes. *PLoS computational biology*, v. 5, n. 8, p. e1000465, 2009.

YILMAZ, P. et al. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D643–D648, 2014.

YOON, E. J. et al. Contribution of the ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 2016.

ZLOTKIN, A. *Dispersion and detachment of cell aggregates* Google Patents, , 15 mar. 2016. .

ZOUCH, H. et al. Microbial diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment cultures associated with anaerobic biotransformation of coastal stockpiled phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1583, 2017.