

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

THAÍS DIEHL

**EFEITOS DE BIOCIDAS COMERCIAIS SOBRE BIOFILMES DE BACTÉRIAS  
HALOTOLERANTES ISOLADAS DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO**

Porto Alegre

2023

THAÍS DIEHL

**EFEITOS DE BIOCIDAS COMERCIAIS SOBRE BIOFILMES DE BACTÉRIAS  
HALOTOLERANTES ISOLADAS DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO**

Dissertação 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 mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

Porto Alegre  
2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Diehl, Thaís  
EFEITOS DE BIOCIDAS COMERCIAIS SOBRE BIOFILMES DE  
BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ISOLADAS DE ÁGUA PRODUZIDA  
DE PETRÓLEO / Thaís Diehl. -- 2023.  
78 f.  
Orientadora: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- 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. Biofilme. 2. Água produzida. 3. Halotolerantes.  
4. Biocidas. 5. Resistência Bacteriana. I. Corção,  
Gertrudes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a minha família, principalmente aos meus pais, Susana e Itair, por todo o suporte, amor incondicional, escuta e por sempre celebrar cada vitória minha.

Agradeço a minha irmã, Thamara, que mesmo estando longe sempre se manteve presente.

Ao meu amor, Gustavo, por todo o companheirismo, confiança, ajuda e incentivo a não desistir durante todos esses anos.

À minha orientadora Prof. Dr. Gertrudes Corção, que tão generosamente me aceitou em seu grupo de pesquisa, estando sempre disposta a me orientar e compartilhar o seu conhecimento. Agradeço imensamente pela paciência e oportunidade de aprendizado.

Aos colegas de bancada e laboratório, em especial a amiga Camila Neugebauer Mello por ter tornado esse percurso mais leve mesmo naqueles momentos mais difíceis e cansativos.

Agradeço a todos os professores e técnicas do PPGMAA pelo conhecimento compartilhado e disposição de auxílio, em especial a Prof. Dr<sup>a</sup>. Fátima Menezes Bento, Prof. Dr<sup>a</sup>. Mercedes Passos Geimba e as técnicas Giovana Finger, Ana Carolina e Márcia Regina. Estendo meus agradecimentos a Dr<sup>a</sup>. Gabriela Pereira, representante da Empresa Dorf Ketal, pelo fornecimento de amostras e conselhos no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus queridos amigos e a todos que, de alguma forma, contribuíram e se preocuparam com este trabalho, expresso minha profunda gratidão.

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

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro o qual permitiu o desenvolvimento dessa pesquisa.

# EFEITOS DE BIOCIDAS COMERCIAIS SOBRE BIOFILMES DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ISOLADAS DE ÁGUA PRODUZIDA DE PETRÓLEO

Autor: Thaís Diehl

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

## RESUMO

A água produzida (AP) na indústria de petróleo possui características típicas associadas às respectivas condições de armazenamento que possibilitam um ambiente favorável para o crescimento microbiano descontrolado. Bactérias halofílicas são frequentes nesse efluente e podem estar envolvidas na deterioração de equipamentos e na formação complexa de aglomerados microbianos (biofilme). Para tentar diminuir os danos causados pela presença de microrganismos, a indústria petrolífera utiliza métodos químicos e/ou físicos de controle em AP, sendo o uso de biocidas o mais frequente. Todavia, o emprego de biocidas costuma ocorrer sem monitoramento adequado, podendo estimular mecanismos de adaptação e resistência bacteriana. Considerando que o estilo de vida na forma de biofilme pode proporcionar às bactérias um aumento na resistência a antimicrobianos, em comparação às células de vida livre, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme por bactérias halofílicas isoladas de amostras de água produzida *offshore* na indústria petrolífera, assim como investigar o perfil de suscetibilidade dessas bactérias aos biocidas Glutaraldeído, sulfeto tetrakis (hidroximetil) fosfônio (THPS), 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA), cloreto de alquildimetilbenzilamônio (ADBAC), Bronopol e 3,3'-methylene bis (5-methyl oxazolidine) (MBO), bem como, comparar a eficácia desses biocidas em resposta aos biofilmes formados. Para o isolamento bacteriano, utilizou-se o meio de cultura Caldo Marinho e a identificação realizada por *MALDI-TOF*. A capacidade de formação de biofilmes e análise de respostas aos biocidas foram avaliadas por crescimento em microplacas de poliestireno associado à análise da concentração inibitória mínima (MIC) por microdiluição em caldo. Este estudo revelou um predomínio de bactérias halotolerantes, as quais demonstraram uma elevada capacidade de aderência em microplacas. Além disso, constatou-se a presença de espécies halotolerantes envolvidas na biocorrosão do aço carbono. A exposição aos biocidas revelou respostas distintas em relação à MBIC (Concentração inibitória mínima de biofilme), tanto entre as diferentes espécies isoladas quanto nos consórcios das amostras analisadas. Em geral, os biocidas Bronopol e ADBAC mostraram uma eficiência superior na eliminação dos isolados em forma de biofilme, comparados aos demais biocidas investigados. Foi observado um significativo aumento na MBIC sobre a MIC, refletindo a ampla tolerância dos isolados aos biocidas. As variações encontradas na MBIC entre as amostras destacam a necessidade de abordagens de monitoramento específicas.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (78 p.), dezembro, 2023.

# EFFECTS OF COMMERCIAL BIOCIDES ON HALOTOLERANT BACTERIA BIOFILMS ISOLATED FROM OIL PRODUCED WATER

Author: Thaís Diehl

Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

## ABSTRACT

The water produced (PW) in the oil industry has typical characteristics associated with its storage conditions that provide a favorable environment for uncontrolled microbial growth. Halophilic bacteria are frequent in this effluent and can be involved in the deterioration of equipment and the complex formation of microbial agglomerates (biofilm). In an attempt to reduce the damage caused by the presence of microorganisms, the oil industry uses chemical and/or physical control methods in PW, the most common of which is the use of biocides. However, the use of biocides often occurs without adequate monitoring and can encourage bacterial adaptation and resistance mechanisms. Considering that the biofilm lifestyle can provide bacteria with increased resistance to antimicrobials compared to cells that are free-living, the main objective of this work was to evaluate the biofilm-forming capacity of halophilic bacteria isolated from offshore produced water samples in the oil industry, and to investigate the susceptibility profile of these bacteria to the biocides Glutaraldehyde, tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS), 2,2-Dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA), alkyl dimethyl benzyl ammonium chlorides (ADBAC) Bronopol and and 3,3'-methylene bis[5-methyloxazolidine] (MBO), as well as to compare the effectiveness of these biocides in response to the biofilms formed. For the isolation bacterial, the Marine Broth culture medium was used and identification was carried out by *MALDI-TOF*. The ability to form biofilms and analysis of responses to biocides were evaluated by growth on polystyrene microplates associated with analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution in broth. The present study revealed a predominance of halotolerant bacteria, which showed a high ability to adhere to microplates. In addition, the presence of halotolerant species involved in the biocorrosion of carbon steel was found. Exposure to the biocides revealed different responses in relation to minimum inhibitory biofilm concentration (MBIC), both among the different species isolated and in the consortia of samples analyzed. In general, the biocides Bronopol and ADBAC showed superior efficiency in eliminating isolates in biofilm form, compared to the other biocides investigated. A significant increase in MBIC over MIC was observed, reflecting the broad tolerance of the isolates to the biocides. The substantial variations found in MBIC between samples highlight the need for customized monitoring strategies.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (78 p.), december, 2023.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Indústria Petrolífera</b>	<b>4</b>
<b>3.2</b>	<b>Água Produzida de Petróleo</b>	<b>5</b>
3.2.1	Definição, características e disposição	5
3.2.2	Diversidade microbiana em água produzida	7
3.2.2.1	<i>Halófilos e Halotolerantes</i>	18
<b>3.3</b>	<b>Problemas de origem microbiológica na Indústria Petrolífera</b>	<b>10</b>
3.3.1	Bactérias Redutoras de Sulfato e Bactérias Produtoras de Ácidos	11
3.3.2	Corrosão Influenciada Microbiologicamente (CIM)	12
<b>3.4</b>	<b>Biofilme</b>	<b>13</b>
3.4.1	Definição	13
3.4.2	Substância poliméricas extracelulares e seus constituintes	15
3.4.3	Etapas de formação do biofilme	17
3.4.4	Sistema de comunicação do Biofilme – <i>Quorum sensing</i>	19
3.4.5	Biofilme em Água Produzida de Petróleo	20
<b>3.5</b>	<b>Controle de microrganismos em campos de petróleo</b>	<b>21</b>
3.5.1	Biocidas	22
<b>3.6</b>	<b>Resistência Bacteriana a Biocidas</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Local de realização do estudo</b>	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Amostras de água produzida e biocidas utilizados</b>	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Caracterização físico-química e biológica da água produzida</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Isolamento e cultivo de bactérias halofílicas</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Identificação e preservação dos isolados</b>	<b>28</b>
<b>4.6</b>	<b>Caracterização das cepas bacterianas</b>	<b>29</b>
4.6.1	Avaliação da tolerância em NaCl	29
4.6.2	Capacidade de formação de biofilme	30
4.6.3	Capacidade de produção de ácido	31

4.6.4	Corrosão influenciada microbiologicamente em cupons de aço carbono.....	31
4.7	Determinação da viabilidade de células planctônicas na presença de biocidas .....	33
4.8	Determinação da viabilidade de células sésseis na presença de biocidas .....	34
5	RESULTADOS .....	35
5.1	Identificação dos Isolados .....	35
5.2	Análise da Máxima Tolerância à NaCl .....	36
5.3	Formação de Biofilme.....	36
5.4	Produção de Ácidos.....	36
5.5	Corrosão influenciada microbiologicamente.....	37
5.6	Concentração Inibitória Mínima frente aos biocidas .....	37
5.7	Concentração inibitória mínima do biofilme e a concentração mínima de erradicação do biofilme.....	39
6	DISCUSSÃO .....	41
7	CONCLUSÃO.....	46
8	REFERÊNCIAS .....	47
	APÊNDICE A .....	62
	APÊNDICE B .....	63
	APÊNDICE C .....	64
	APÊNDICE D .....	65
	ANEXO A .....	66



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação dos microrganismos de acordo com sua resposta ao sal. ...9	9
<b>Tabela 2</b> - Dados das amostras de água produzida utilizadas no estudo.....27	27
<b>Tabela 3</b> - Avaliação da corrosividade.....33	33
<b>Tabela 4</b> - Taxa de corrosão observada em cupons de aço carbono 1020 quando submetidos ao teste de imersão durante 7 dias em caldo TSB contendo os isolados. .....37	37
<b>Tabela 5</b> - Quantidade de isolados das Amostras A e B em sua respectiva concentração inibitória mínima frente aos biocidas THPS, Glutaraldeído (GLUT), ADBAC, MBO, Bronopol (BNP) e DBNPA.....38	38
<b>Tabela 6</b> - MIC de maior frequência nos isolados conforme espécie e a MIC obtida pelo consórcio da Amostra A.....39	39
<b>Tabela 7</b> - MIC de maior frequência nos isolados conforme espécie e a MIC obtida pelo consórcio da Amostra B.....39	39
<b>Tabela 8</b> - MBIC e MBEC dos biocidas de maior frequência nos isolados testados conforme espécie da Amostra A e MBIC e MBEC obtida pelo consórcio A. ....40	40
<b>Tabela 9</b> - MBIC e MBEC dos biocidas de maior frequência nos isolados testados conforme espécie da Amostra B e MBIC e MBEC obtida pelo consórcio B. ....40	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema da produção e gerenciamento de fluidos em campos offshore. .6	
<b>Figura 2</b> - Representação biofilme. a: Representação clássica de biofilme aderido em uma superfície sólida abiótica. b: Agregados não ligados na superfície biótica - revestidos por um muco/fluido..... 14	
<b>Figura 3</b> - Microscopia Confocal de Varredura a Laser de um biofilme ambiental. a: complexidade e heterogeneidade da matriz do biofilme; b: volume de distribuição de células bacterianas; c: auto fluorescência de clorofila a, indicando algas; d: volume maciço de glicoconjugados específicos de lectina contendo fucose; e: volume de polissacarídeos, como celulose..... 16	
<b>Figura 4</b> - Modelo clássico de cinco etapas de desenvolvimento de biofilme em superfícies. .... 18	
<b>Figura 5</b> - Estrutura molecular dos biocidas. .... 23	
<b>Figura 6</b> - Disposição dos cupons analisados em caldo TSB para verificação da taxa de biorrocção por isolado representante das espécies analisadas no presente estudo..... 32	
<b>Figura 7</b> - Identificação dos isolados nas amostras A e B em água produzida offshore de petróleo. .... 35	
<b>Figura 8</b> - Observação da máxima tolerância em NaCl dos isolados. Da esquerda para a direita: Controle negativo, controle positivo, 0,1M, 0,5M, 1M, 2M e 2,6M. .... 36	
<b>Figura 9</b> - Crescimento dos isolados em CVF. D Da esquerda para a direita: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> , <i>Achromobacter insolitus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas balearica</i> , <i>Bacillus cereus</i> e controle negativo. .... 37	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADBAC	Cloreto de alquildimetilbenzilamônio/ Cloreto de Benzalcônio
AHLs	Acil-homoserina lactona
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
AP	Água Produzida
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BNP	Bronopol
BPA	Bactérias Produtoras de Ácido
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CAe	Condições aeróbias
CAn	Condições anaeróbias
CAQs	Compostos de amônio quaternário
CHCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
CIM	Corrosão Influenciada Microbiologicamente
CVF	Caldo Vermelho Fenol
DBNPA	2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida
DENB	<i>Dey Engley Neutralizing Broth</i>
DOc	Densidade óptica ponto de corte
DOi	Densidade óptica dos isolados
DOn	Densidade óptica do controle negativo
Dsr	Enzima sulfito redutase
eDNA	<i>extracellular DNA</i>
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares (do inglês, <i>Extracellular Polymeric Substances</i> )
GLUT	Glutaraldeído
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly</i>
MBEC	Concentração Inibitória Mínima de Erradicação do Biofilme (do inglês, <i>Minimum Biofilm Eradication Concentratio</i> )

MBIC	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (do inglês, <i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i> )
MBO	3,3'-methylene bis (5-methyl oxazolidine)
MIC	Concentração Inibitória Mínima (do inglês, <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
O&G	Óleo e Gás
OTUs	Unidades Taxonômicas Operacionais (do inglês, <i>Operational Taxonomic Units</i> )
QS	<i>Quorum sensing</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PPGMAA	Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente
THPS	Sulfeto tetrakis (hidroximetil) fosfônio
TOG	Teor de Óleo e Graxa
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TTC	Trifenil Tetrazolio 2,3,5 Cloreto
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1 INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda global por petróleo e gás, a produção de água produzida em campos petrolíferos tem aumentado significativamente. No entanto, as condições naturais encontradas nesse efluente agregado às circunstâncias típicas de armazenamento possibilitam condições para o crescimento microbiano descontrolado e seus respectivos metabólitos. Bactérias halofílicas, em condições aeróbias e anaeróbias, são frequentes em água produzida de petróleo e podem contribuir para a formação complexa de aglomerados microbianos (biofilmes). Além disso, podem estar associadas à geração de ácidos e problemas de biocorrosão, representando, assim, um grande desafio para a indústria petrolífera (ZHANG *et al.*, 2017; PANNEKEN *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2020; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021; VOGEL & BELTRAME, 2022; KADNIKOV *et al.*, 2023).

O uso de biocidas é geralmente a abordagem mais comum para evitar e prevenir a proliferação de microrganismos no setor de petróleo (ZULKIFLIANI, 2017; SHI *et al.*, 2023). Todavia, é comum a utilização de concentrações-padrão sem atentar para as propriedades físico-químicas existentes na água produzida e para a vulnerabilidade ou resistência do seu microbioma (MAILLARD, 2018; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021). Essa aplicação frequente de biocidas sem um controle específico pode acabar favorecendo o aumento da pressão seletiva e o desenvolvimento de microrganismos adaptados, dificultando ainda mais o seu monitoramento.

Nesse aspecto, é importante considerar a complexidade envolvida na estrutura de biofilmes microbianos, os quais costumam demonstrar maior resistência às dosagens de biocidas em comparação à eliminação de organismos planctônicos, ou seja, de vida livre, devido ao seu ambiente protetor (FLEMMING & WINGENDER, 2010; SAUER *et al.*, 2022; ALI *et al.*, 2023). Assim, para um controle efetivo, é relevante conhecer as características particulares de cada espécie desse microbioma e realizar estudos focados na capacidade de formação de biofilmes dos microrganismos presentes na água produzida de petróleo, bem como na determinação da MIC, MBIC e a concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC) em resposta à diferentes biocidas; THPS, DBNPA, Glutaraldeído, ADBAC, Bronopol e MBO.

Dessa forma, esse trabalho visa identificar e caracterizar as espécies halofílicas, envolvidas em água produzida de petróleo, demonstrando as diferentes respostas obtidas por células planctônicas e em forma de biofilmes na presença de biocidas. Tais abordagens podem fornecer percepções valiosas sobre como os biocidas afetam os biofilmes, contribuindo para a eficiência das estratégias de controle e manutenção da integridade dos ativos na indústria petrolífera.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar os efeitos de biocidas comerciais sobre a capacidade de formação de biofilmes por bactérias halofílicas isoladas de água produzida de petróleo.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1 Isolar e identificar bactérias halofílicas de amostras de água produzida em condições aeróbias e anaeróbias;
- 2.2.2 Determinar a máxima tolerância em NaCl dos isolados;
- 2.2.3 Avaliar a capacidade de produção de ácido e a biocorrosão gerada em cupons de aço carbono;
- 2.2.4 Avaliar a capacidade de formação de biofilme dos isolados;
- 2.2.5 Dimensionar e comparar a atividade inibitória mínima dos biocidas comerciais nas bactérias isoladas e nos consórcios das amostras;
- 2.2.6 Dimensionar e comparar a atividade inibitória mínima dos biocidas comerciais em biofilmes dos isolados e nos consórcios das amostras.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Indústria Petrolífera

O setor energético de petróleo possui atualmente papel significativo na economia produtiva mundial. Embora muitos investimentos tenham sido realizados em busca de novas fontes de energia, incluindo as renováveis, ainda se espera um crescimento na demanda global de petróleo no médio e longo prazo (OPEP, 2022). Espera-se que até 2035 sejam produzidos 109,5 milhões de barris por dia (mb/d), chegando ao patamar de 109,8 mb/d em 2045 (OPEP, 2022). Essa grande produtividade de petróleo pode ser explicada desde o seu destaque como gerador de energia até a aplicabilidade de seus derivados na confecção de diversos bens de consumo usados diariamente (ALMADA & PARENTE, 2013).

No Brasil, o aperfeiçoamento em refino, geração e comercialização de energia está presente, principalmente, desde a descoberta do Pré-sal. A exploração do Pré-sal possibilitou ao mercado de perfuração brasileiro estar entre os maiores fabricantes mundiais, sendo hoje, considerado o 9º maior produtor de petróleo e gás do mundo (IBP, 2023). Tais dados sustentam-se a partir de duas localidades determinantes de exploração; as bacias em terra (*onshore*) e em mar (*offshore*).

As reservas em campos *offshore*, são responsáveis pela maior parte da produção brasileira de petróleo, proporcionando ao território nacional experiência e competência na exploração e produção em águas profundas e ultraprofundas (PETROBRAS, 2023a). Entre o litoral de Vitória (ES) a Arraial do Cabo (RJ) e Florianópolis (SC) a Cabo Frio (RJ) estão localizadas as Bacias de Campos e Santos, respectivamente, principais geradoras marítimas nacionais. Ademais, as bacias sedimentares terrestres estão concentradas, em maioria, no nordeste do país. Apesar do maior número de poços dispostos em terra, a produção *onshore* corresponde apenas a 5% da geração total brasileira (ANP, 2023).

Ainda que a atividade petrolífera possibilite contínuo desenvolvimento econômico para a matriz energética brasileira e internacional, sua exploração e geração causam consideráveis impactos ao meio ambiente (LIU *et al.*, 2021; MOHD NOOR, 2021). Estes impactos dependem da etapa do processo, dimensão e complexidade do projeto, natureza do ambiente e das técnicas de mitigação e controle



utilizadas. Assim, podem ocorrer abalos aquáticos, atmosféricos e até mesmo emergências potenciais (IBRAHIM, 2023).

## 3.2 Água Produzida de Petróleo

### 3.2.1 Definição, características e disposição

Água produzida também denominada água de produção, é a principal fonte de resíduos associada às operações de petróleo e gás (AL-GHOUT *et al.*, 2019; KHORRAM *et al.*, 2023). Apenas em 2022, seu descarte no ambiente representou cerca de 76.873 megalitros, 59% do volume gerado (PETROBRAS, 2022). A AP possui alto potencial poluidor em razão da sua formação química e é considerada complexa em tratamento (JIMÉNEZ *et al.*, 2018).

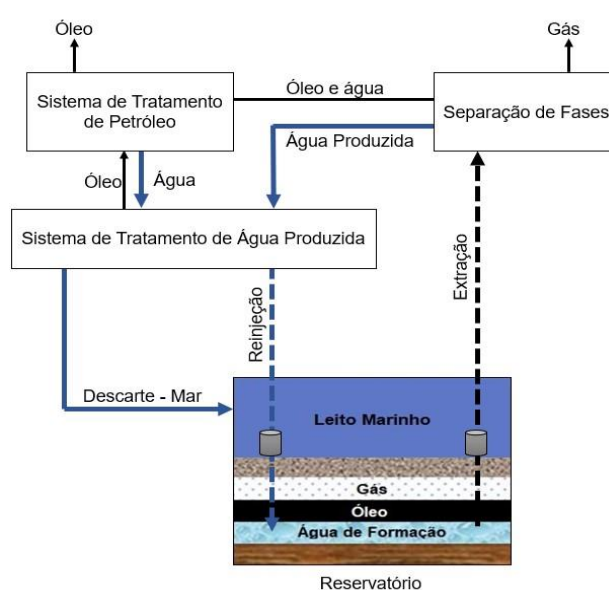
É trazida da formação rochosa à superfície juntamente com óleo e gás e é composta por água naturalmente presente no reservatório (água de formação), como também pela água que é injetada para manter a pressão e facilitar a recuperação do petróleo (HOLLANDA *et al.*, 2021), conforme demonstrado na Figura 1, dependendo, ainda assim, em constituição, da localização e idade do campo. Entre as fontes utilizadas como água de injeção *offshore* estão a água do mar e a AP tratada, já na produção *onshore* pode-se encontrar água doce subterrâneas ou superficiais e água do mar (DUDEK *et al.*, 2020).

Em virtude do processo industrial, diferentes contaminantes, como compostos suspensos e dissolvidos, de natureza orgânica e inorgânica, também podem estar incorporados na sua composição, tal como, traços de óleo cru e carbono residual (JIMÉNEZ *et al.*, 2018; PANNEKENS *et al.*, 2019; DUDEK *et al.*, 2020; AL-KAABI *et al.*, 2021). Além disso, microrganismos da fonte são encontrados nesse efluente (DUDEK *et al.*, 2020). Dessa forma, a qualidade da AP depende das propriedades e da geoquímica da formação produtora, tipo de hidrocarboneto gerado, dos métodos de extração e aditivos químicos utilizados, assim como, o seu fluxo também pode oscilar conforme o tempo, visto que o volume de AP muda durante a vida útil do reservatório. Em poços mais antigos, de menor pressão, geralmente é injetado gás ou água para facilitar a recuperação do petróleo (KHATIB & VERBEEK,

2003; KAUR *et al.*, 2009; GUERRA, DAHM & DUNDORF, 2011; ASSUNÇÃO, ALMEIDA & VIEIRA, 2020; DUDEK *et al.*, 2020).

Em comparação com o volume de óleo gerado, o fluxo de AP, na década de 2000, correspondia a cerca de três barris de água produzida para um barril de petróleo (3:1), na escala global (KHATIB & VERBEEK, 2003; KHORRAM *et al.*, 2023). Em 2018, estimou-se um valor próximo de 4:1, variando conforme a origem do campo (ECHCHELH, HESS & SAKRABANI, 2018). Esse fluxo tende a aumentar ainda mais com a intensificação da exploração e o amadurecimento dos poços (KHATIB & VERBEEK, 2003; KAUR *et al.*, 2009; AL-GHOUTI *et al.*, 2019; ABDEL-SHAIFY, MANSOUR & EL-TOONY, 2020; ASSUNÇÃO, ALMEIDA & VIEIRA, 2020).

Após a elevação dos constituintes para a área de processamento, na superfície, seja ela marítima ou em terra, ocorre a separação dos fluidos envolvidos (fases gasosas, oleosas e aquosas), por intermédio da gravidade e densidades distintas (PINTOR *et al.*, 2016; SOBOLCIAK *et al.*, 2020). Posto isso, óleo e gás separam-se do complexo resíduo de AP e seguem para tratamentos específicos, a fim de obter um produto estável, com os padrões mínimos exigidos, para viabilizar seu transporte às refinarias e permitir o direcionamento de seus derivados ao mercado consumidor. O efluente líquido por sua vez é encaminhado para o sistema de tratamento de água produzida com o propósito de ser descartado no ambiente ou reinjetado no poço (ECHCHELH, HESS & SAKRABANI, 2018; BEYER *et al.*, 2020).



**Figura 1** - Esquema da produção e gerenciamento de fluidos em campos offshore. Adaptado de JIMÉNEZ *et al.*, 2018 e OJO *et al.*, 2022.

Conforme a Resolução nº 430/2011 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) (BRASIL, 2011), efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente em corpos receptores desde que obedeçam às condições e padrões previstos em lei, desta forma, o tratamento de água produzida deve atender aos parâmetros de qualidade e descarte definidos em legislação ambiental. Atualmente, o gerenciamento brasileiro de AP *offshore* cumpre o disposto na resolução CONAMA nº 393/2007 (BRASIL, 2007), a qual dispõe sobre o descarte contínuo de água produzida em plataformas marítimas. Essa resolução limita o Teor de Óleos e Graxas (TOG) diário e mensal em água produzida, sendo esses respectivamente 42 mg/L e 29 mg/L e, adicionalmente proíbe o despojo de AP em raio inferior a dez quilômetros de unidades de conservação e a cinco quilômetros de áreas ecologicamente sensíveis. Ademais, a resolução solicita monitoramento semestral de presença e concentração de compostos orgânicos e inorgânicos, radioisótopos e salinidade da água. Apesar de uma legislação, em parte, rigorosa, a carga total de óleos e graxas em água produzida descartada no ano anterior foi de aproximadamente 1,3 mil toneladas (PETROBRAS, 2022).

Alternativamente, a indústria petrolífera realiza a reinjeção de água produzida no poço para recuperação secundária de petróleo. Essa técnica possibilita o controle da pressão do reservatório, tal como tende a auxiliar no direcionamento do fluxo de petróleo para a superfície, resultando, conseqüentemente, em um recurso mais útil e vantajoso equiparado ao descarte (JIMÉNEZ *et al.*, 2018; ABDEL-SHAFY, MANSOUR & EL-TOONY, 2020; BEYER *et al.*, 2020). A água reinjetada necessita de tratamento prévio para atender as demandas operacionais e ambientais de modo a evitar entupimento de poros no poço e falhas do sistema (ZHENG *et al.*, 2016). Para isso, a concentração de óleo e resíduos sólidos deve ser compatível com o reservatório (LI & LEE, 2009). As especificações gerais solicitam que o teor de sólidos seja menor que  $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e TOG menor que  $42\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , além disso, em reservatórios de baixa permeabilidade é necessário filtragem de partículas maiores que  $3\mu\text{m}$  (BADER, 2007; JUDD *et al.*, 2014; JIMÉNEZ *et al.*, 2018). Ainda, deve ser realizado um controle microbiológico na água a ser reinjetada.

### 3.2.2 Diversidade microbiana em água produzida

Durante o percurso para os respectivos corpos receptores, a água produzida pode ser estocada em tanques de armazenamento, seja para o fim de garantir que o volume descartado/reinjetado alcance os limites máximos permitidos ou devido a quantidades excessivas de água produzida (TORRES *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017; PETROBRAS, 2023b). Em geral, as condições naturais encontradas em tanques de armazenamento agregado às condições típicas da água produzida (temperatura, pH, teor de NaCl e oxigênio e concentração de sulfeto e sulfato) propiciam o crescimento microbiano descontrolado, viabilizando oportunidade de nichos, principalmente, para bactérias e arqueias, aeróbias e anaeróbias, como redutoras de sulfato e nitrato, oxidantes de ferro e manganês, halófilas e halotolerantes, fermentadoras, acetogênicas e metanogênicas, assim como fungos (ATAGANA, 1996; MAGOT, OLLIVIER & PATEL, 2000; BIRKELAND, 2004; ZHANG *et al.*, 2017; PANNEKEN *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2020). Nesse caso, a detecção de microrganismos em amostras de água produzida pode não ser somente nativa do reservatório, ou seja, habitante natural do reservatório antes do início da exploração de petróleo (DAHLE *et al.*, 2008).

A maioria das amostras de água produzida fornecidas para análises laboratoriais são obtidas de tanques de armazenamentos, separadores, flotores e hidrociclones (sistemas de tratamento), por exemplo (ZHANG *et al.*, 2017), logo, microrganismos também podem ser introduzidos no processo de produção através de perfurações, operações em poços e tubulações (MAGOT, OLLIVIER & PATEL, 2000). A maioria das bactérias aeróbicas que compõem a comunidade microbiana da indústria de óleo e gás (O&G) geralmente são introduzidas durante tais processos de perfurações ou através da água de injeção (AN *et al.*, 2013; BRIGGS *et al.*, 2019). Destaca-se ainda uma maior diversidade de comunidades microbianas em tanques de armazenamento em relação àquelas presente em separadores (ZHANG *et al.*, 2017).

Ademais, a temperatura é um dos impulsionadores da diversidade microbiana, visto que a abundância e a riqueza tendem a alterar após a extração dos fluidos do reservatório. Foram constatadas diferenças notáveis em amostras de água de reservatórios de altas e médias temperaturas, observando-se o dobro de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) em locais do reservatório com altas temperaturas (65-80°C) em relação àqueles de temperatura medianas (36°C), no

entanto, em ambientes com condições atmosféricas médias houve uma maior diversidade bacteriana em gênero e espécie (TIAN, XUE & YANLING; 2020). Desse modo, a concentração microbiana presente em campos produtores de O&G pode ser numerosa e heterogênea.

### 3.2.2.1 Halófilos e Halotolerantes

A água produzida de petróleo é considerada hipersalina (quatro vezes maior que a água do mar), tornando-se um ambiente favorável para o desenvolvimento de bactérias halofílicas e halotolerantes (VIEIRA, CAMMAROTA, & CAMPORESE, 2003; BELYAKOVA *et al.*, 2006; CRISPIM *et al.*, 2019; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021; VOGEL & BELTRAME, 2022). Esses microrganismos estão adaptados à vida em elevadas concentrações de sal e à alta pressão osmótica de seu ambiente, em razão de adaptações celulares e enzimáticas específicas (GUPTA *et al.*, 2015). O acúmulo de íons  $K^+$  e  $Cl^-$  ou a sintetização de solutos compatíveis, aminas e álcoois, no interior da célula são duas importantes estratégias adaptativas para regular o equilíbrio osmótico interno (OREN, 2013).

Halófilos apresentam um crescimento ótimo em meios de 0,5 - 2 M de sal e podem crescer em até 5,9 M de sal, isto é, requerem altas concentrações de sal para seu desenvolvimento. Por outro lado, organismos halotolerantes, não precisam necessariamente do sal para o seu crescimento, mas podem tolerar níveis moderados e elevados, sendo mais versáteis em termos de tolerância (OREN, 2006; EDIBEIB, WAHAB & HUYOPET, 2016). A classificação mais aceita, de acordo com a dependência e tolerância ao sal, está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** - Classificação dos microrganismos de acordo com sua resposta ao sal.

Categorias	Propriedades	Exemplos
Não halófilo	Cresce melhor em meios contendo menos de 0,2M de sal	A maioria das bactérias de água doce
Ligeiramente halófilo	Cresce melhor em meios contendo 0,2–0,5M de sal	<i>Halomonas zhaodongensi</i>
Halófilo moderado	Cresce melhor em meios contendo 0,5M–2,5M de sal	<i>Halobacillus sediminis</i>
Halófilo extremo limitrofe	Cresce melhor em meios contendo 2,5–4,0M de sal	<i>Desulfovibrio retbaense</i>
Halófilo extremo	Cresce melhor em meios contendo 4,0–5,9M de sal	<i>Halobacterium salinarum</i>
Halotolerante	Não halófilo que pode tolerar sal, se é viável sal acima de 2,5 M; é considerado extremamente halotolerante	<i>Staphylococcus aureus</i>

Adaptado de OREN, 2006 e EDIBEIB, WAHAB & HUYOPET, 2016.

Microrganismos com capacidade de desenvolvimento em alta salinidade estão amplamente distribuídos entre todos os três domínios da vida, ou seja, Archaea, Bacteria e Eukarya, podendo ter tanto capacidades aeróbias quanto anaeróbias (OREN, 2006; EDIBEIB, WAHAB & HUYOPET, 2016). Em água produzida, demonstrou-se a presença dos gêneros halófilos *Halomonas*, *Guyparkeria*, *Desulfovermiculus*, e em maior abundância, *Halanaerobium* (filo Halanaerobiaeota) (PEREIRA *et al.*, 2020; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021; KADNIKOV *et al.*, 2023). Organismos halófilos e halotolerantes, incluindo esses citados acima, possuem uma ampla diversidade metabólica, por exemplo, a redução dissimilatória de sulfato pode ocorrer até altas concentrações de sal. Ademais, acredita-se que a alta tolerância ao sal esteja relacionada com a temperatura do ambiente, visto que há casos descritos em que tanto a tolerância quanto a necessidade de sal foram aumentadas em temperaturas elevadas (OREN, 2006).

### 3.3 Problemas de origem microbiológica na Indústria Petrolífera

As interações sinérgicas de diferentes grupos microbianos e os respectivos metabólitos gerados em sistemas de armazenamento/tratamento de água produzida podem acarretar complicações consideráveis para a indústria de O&G (DOS SANTOS *et al.*, 2022). Estudos atuais relacionam a presença de microrganismos à produção de ácidos - como o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), problemas de biocorrosão e à formação complexa de aglomerados microbianos (biofilme) (ELUMALAI *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2022). Esses transtornos podem acarretar grandes prejuízos em equipamentos e instalações de produção, assim como, alterações na geoquímica do reservatório, mediante introduções excessivas de sulfato e oxigênio via reinjeção de água produzida no poço (YOUSSEF, ELSHAHED, MCINERNEYET, 2009; PICENO *et al.*, 2014; VIGNERON *et al.*, 2016).

A abundância de ácidos na indústria de O&G pode comprometer o valor agregado ao petróleo através do aumento do teor de enxofre em sua composição, bem como, contribuir para a corrosão localizada em tubulações. Além disso, H<sub>2</sub>S é um gás tóxico e, portanto, pode comprometer a saúde de trabalhadores locais (ECKFORD & FEDORAK, 2002; PEREIRA, 2023). Nesse contexto, destacam-se alguns

procariotos envolvidos na geração de ácido em água produzida de petróleo; as bactérias redutoras de sulfato e bactérias produtoras de ácidos.

### 3.3.1 Bactérias Redutoras de Sulfato e Bactérias Produtoras de Ácidos

Os maiores responsáveis pela geração biológica de H<sub>2</sub>S em fluidos petrolíferos são bactérias redutoras de sulfato (BRS), as quais estão parcialmente classificadas nos filos Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospira e Thermodesulfobacterium (VARJANI & GNANSOUNOU, 2017). Dependendo da natureza do reservatório, relata-se a identificação de diversos grupos de BRS; psicrófilos, mesófilos, termófilos, halófilas e barófilas (MAGOT, OLLIVIER & PATEL, 2000; TAKAI *et al.*, 2004; BELYAKOVA *et al.*, 2006; DAVIDOVA *et al.*, 2012; TORBAGHAN & TORGHABEH, 2019; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021). O mesófilo *Desulfovibrio* é comumente encontrado, reduzindo sulfato, em água produzida de petróleo. Destaca-se ainda, em água de formação, a BRS *Desulfovermiculus halophilus*; gram negativa halófila estritamente anaeróbica com faixa de crescimento de 25-47°C e concentração ótima de NaCl entre 80 a 100 g/L (BELYAKOVA *et al.*, 2006). A redução de sulfato, também é relatada, em minoria, em arqueias dos grupos Crenarchaeota e Euryarchaeota (VARJANI & GNANSOUNOU, 2017).

As BRS possuem capacidade de utilizar os ânions sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) como aceptores finais de elétrons para geração de energia metabólica durante a dissimilação energética, para tal possuem a enzima sulfito redutase (Dsr), que é codificada no operon *dsrAB* e intervém na etapa final de redução do sulfato, catalisando a redução do sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) formado em sulfeto (H<sub>2</sub>S), o qual é liberado como produto final da via dissimilatória (GHOSH & BAGCHI, 2015; MOSQUERA, IVEY & CHEVRIER, 2023). Além disso, procariotos redutores de sulfato podem capturar o H<sub>2</sub>S presente no ambiente, decorrente da rota dissimilatória e, incorporar enxofre em suas moléculas, através da via assimilatória, para uso no seu crescimento e síntese celular.

Bactérias produtoras de ácido (BPA) também estão amplamente distribuídas na indústria de petróleo. A geração destes ácidos ocorre principalmente durante o processo de fermentação anaeróbia, sendo que açúcares, proteínas e hidrocarbonetos atuam como doadores de elétrons para este grupo (VARJANI &

GNANSOUNOU, 2017). Ao final do processo metabólico produzem ácidos como acético, láctico, propiônico e butírico e gases como H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (OKORO *et al.*, 2017). Estes podem ser corrosivos e servir como metabólitos para BRS (BRIGSS *et al.*, 2019). Em campos de petróleo é recorrente a identificação do gênero halófilo *Halanaerobium*, produtor de acetato, solventes e gases (H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) como resultado do seu processo de fermentação (VARJANI & GNANSOUNOU, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021). Este gênero manifesta relevância na catálise do aço carbono, material habitual em tubulações de petróleo (LIANG *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2021). Destaca-se também o predomínio dos gêneros *Enterobacter*, *Serratia* e *Enterococcus* em tanques de armazenamento de água produzida como bactérias produtoras de ácido (SONG *et al.*, 2019).

### 3.3.2 Corrosão Influenciada Microbiologicamente (CIM)

CIM é a terminologia aplicada quando as ações de microrganismos influenciam o processo corrosivo de materiais metálicos e não metálicos (KNISZ *et al.*, 2023). Na indústria petrolífera, a ocorrência de CIM é responsável por 40% de todos os eventos de corrosão interna, podendo ser observada desde a exploração e produção até o transporte por sistemas de ductos, afetando, assim, a integridade das instalações e aumentando os custos operacionais (LIU *et al.*, 2017; SKOVHUS ECKERT & RODRIGUES, 2017; KHAN *et al.*, 2021).

O processo corrosivo define-se como um fenômeno natural de deterioração de um material, geralmente metálico, mediante a ação físico-química com o meio. Em geral sua natureza é eletroquímica, envolvendo a oxidação de um metal e a redução de um agente oxidante, ou seja, reações anódicas e catódicas (GENTIL, 2007). A corrosão influenciada por microrganismos ou biocorrosão não é, portanto, uma forma específica de corrosão, e sim, é a interação entre microrganismos, direta ou indiretamente, que induzem, intensificam ou mantêm a cinética das reações de corrosão (NAGIUB & MANSFELD, 2002; TELEGDI, SHABAN & TRIFET, 2020; KNISZ *et al.*, 2023).

Considera-se a CIM como a principal envolvida na corrosão localizada de superfícies, incluindo corrosão do tipo pites e fendas (KHAN *et al.*, 2023a). A corrosão por pites manifesta-se sob a forma de pequenas depressões na superfície metálica, as quais podem ser profundas e gerar danos significativos, já o tipo fendas associa-



se à corrosão localizada entre as frestas existentes na superfície metálica, ocorrendo dentro ou ao redor da abertura estreita. É difícil prever a CIM, ainda mais ao se tratar de uma corrosão extremamente localizada, como o tipo pites. Para tal, geralmente monitora-se utilizando cupons de metais na tubulação, onde são recuperados e inspecionados cotidianamente (ALAMRI, 2020).

A CIM pode ser induzida por metabólitos liberados por microrganismos tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, assim como, pode ser acelerada por mediadores solúveis. Esses permitem a obtenção de energia por microrganismos a partir da transferência de elétrons obtidos no metal, contribuindo para a corrosão acelerada do material, como é o caso das BRS, por exemplo, que utilizam ferro como fonte de elétrons para suas funções metabólicas, contribuindo para a corrosão e produção de H<sub>2</sub>S. As BPA também estão envolvidas em processos corrosivos através da produção de ácidos como parte do seu processo metabólico (LI *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2023a; KNISZ *et al.*, 2023).

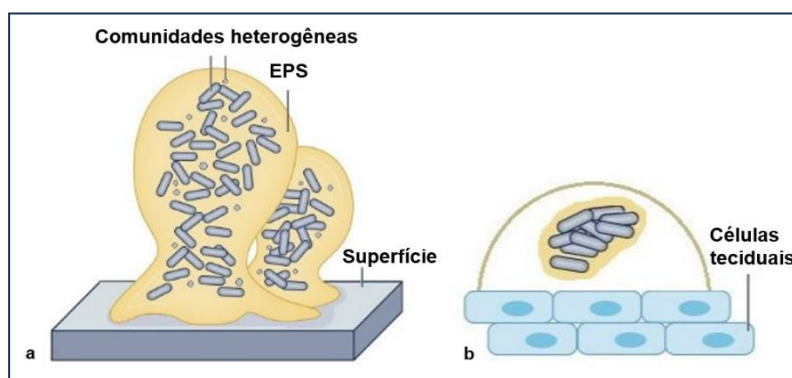
Ademais, para que a CIM ocorra, a disponibilidade de substrato e as condições ambientais devem favorecer o desenvolvimento de microrganismos sob a forma de biofilmes. Biofilmes abrangem um ambiente complexo e dinâmico que propicia condições favoráveis à microrganismos, incluindo aqueles envolvidos na CIM, além de estarem vinculados, em maioria, diretamente a superfícies de materiais, sobretudo aquelas de origem metálica. Logo, a interação de microrganismos específicos na estrutura do biofilme pode induzir o processo corrosivo (BEECH & SUNNER, 2004).

### **3.4 Biofilme**

#### **3.4.1 Definição**

Biofilme refere-se a comunidades estruturalmente complexas e organizadas que estão envolvidas por uma matriz tridimensional contida por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (WOLCOTT *et al.*, 2013; KARYGIANNI *et al.*, 2020; RATHER, GUPTA & MANDAL, 2021). Essa agregação pode ocorrer tanto pela disposição de organismos da mesma espécie quanto por múltiplas espécies, do mesmo modo, é frequente uma elevada densidade populacional (DE BEER & STOODLEY, 2006; CHATTOPADHYAY, USMAN & VARJANI, 2022). Pode-se

encontrar na matriz do biofilme uma grande heterogeneidade de comunidades, como bactérias, arqueias, algas, protozoários, fungos e até macrorganismos, adquirindo assim a designação de *biofouling* (CHARACKLIS, 1990). Biofilmes estão aderidos a superfícies bióticas (por exemplo, dentes) ou abióticas (por exemplo, corpos estranhos) (MENOITA *et al.*, 2012), no entanto, recentemente descobriu-se bactérias que podem formar agregados não ligados a superfícies com taxas de crescimento comparáveis às de biofilme aderidos, como visto em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo também reconhecidas como biofilme (ALHEDE *et al.*, 2011; SAUER *et al.*, 2022) (Figura 2). Todavia essa estrutura sistematizada molda-se tanto para sua própria proteção quanto para expansão de colônias, sendo considerada uma importante estratégia fenotípica (SHARMA *et al.*, 2023).



**Figura 2** - Representação biofilme. a: Representação clássica de biofilme aderido em uma superfície sólida abiótica. b: Agregados não ligados na superfície biótica - revestidos por um muco/fluido. Adaptado de SAUER *et al.*, 2022

Sua natureza foi revelada por Characklis em 1973 e definida em termo pela primeira vez no ano de 1978 por William J. Costerton e colaboradores (CHARACKLIS, 1973; COSTERTON, GEESEY & CHENG, 1978). Desde então, a análise de biofilme tornou-se um tema comum de pesquisa em microbiologia, visto que sua atividade está associada a áreas de extrema relevância para a atualidade, como a médica, farmacêutica, industrial e ambiental. Estima-se que estejam envolvidos em 65% de todas as infecções hospitalares, devido a sua frequência em dispositivos médicos ou no próprio hospedeiro, além disso, são desfavoráveis em indústrias de alimentos e em sistemas de distribuição de água e efluentes, provocando notáveis problemas de biocorrosão em equipamentos e tubulações (PREST *et al.*, 2016; SRIVASTAVA & BHARGAVA, 2016; CARRASCOSA *et al.*, 2021). A ocorrência de tais preocupações

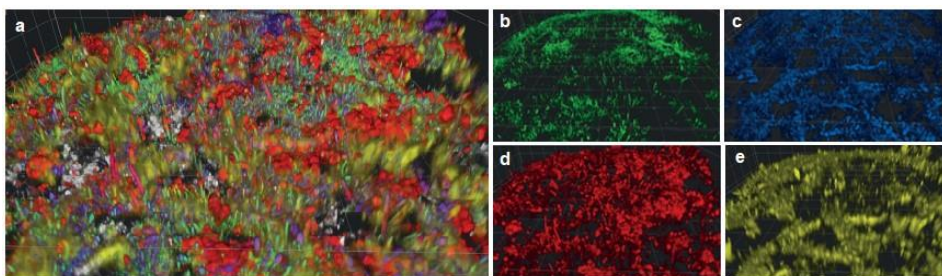
advém da organização complexa do biofilme, a qual dificulta o seu monitoramento e impulsiona processos de resistência bacteriana (LUDENSKY, 2003).

Essas redes complexas de interação apresentam vantagem de sobrevivência, resistência, em relação a microrganismos em estado planctônico, ou seja, de vida livre, uma vez que estão mais protegidos de alterações ambientais e de diversas situações de estresse, como dessecação, toxicidade de compostos, radiação ultravioleta e defesas imunológicas do hospedeiro (FLEMMING & WINGENDER, 2010; SAUER *et al.*, 2022; ALI *et al.*, 2023). Tal estilo de vida só é possível devido a um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares, as quais são produzidas, principalmente, pelos próprios organismos envolvidos (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

#### 3.4.2 Substância poliméricas extracelulares e seus constituintes

As substâncias poliméricas extracelulares formam a arquitetura tridimensional do biofilme, permitindo, por exemplo, a adesão em superfícies e a coesão associada. À vista disso, possibilitam intensas interações, incluindo comunicação célula a célula e a formação de consórcios sinérgicos. Em função da retenção de enzimas extracelulares, por meio do sequestro de nutrientes dissolvidos em seu entorno, fornece compostos contidos por carbono, nitrogênio e fósforo, proporcionando, assim, um ambiente nutritivo e energético para os organismos envolvidos. Além disso, possibilitam um local altamente hidratado, protegendo as respectivas comunidades de dessecação e deficiência de água (FLEMMING & WINGENDER, 2010; FLEMMING *et al.*, 2023).

Na maioria dos biofilmes estabelecidos, os microrganismos representam menos de 10% da matéria seca, enquanto a matriz de EPS representa mais de 90%. A constituição de EPS dispõe aproximadamente em 70% de proteínas extracelulares, 20% em lipídios, 5% de ácidos nucleicos e o restante de outras substâncias (BRANDA *et al.*, 2005). Essa composição varia sobretudo de acordo com as condições ambientais, estágio de desenvolvimento, espécies correlacionadas, mensageiros secundários e moléculas sinalizadoras (FLEMMING *et al.*, 2023). Devido a essa composição variada, biofilmes, em geral, assemelham-se, estruturalmente, a um recife de corais, conforme demonstrado na Figura 3, item a.



**Figura 3** - Microscopia Confocal de Varredura a Laser de um biofilme ambiental. a: complexidade e heterogeneidade da matriz do biofilme; b: volume de distribuição de células bacterianas; c: auto fluorescência de clorofila a, indicando algas; d: volume maciço de glicoconjugados específicos de lectina contendo fucose; e: volume de polissacarídeos, como celulose (FLEMMING *et al.*, 2023).

Os constituintes da matriz extracelular interagem de forma distinta entre si, promovendo características próprias ao biofilme. Entre esses, destaca-se os polissacarídeos, formados por variadas espécies microbianas, o qual tem como sua principal atribuição tornar a matriz estável. Cita-se nesse caso, a *Pseudomonas aeruginosa*, a qual produz pelo menos três polissacarídeos - Psl, Pel e alginato - com funções diferentes no desenvolvimento e arquitetura do complexo extracelular, o alginato, por exemplo, está envolvido no estabelecimento de microcolônias no início da constituição do biofilme e no equilíbrio mecânico de biofilmes maduros, por outro lado, a interação entre o polissacarídeo Pel e o inibidor ecotina possibilita proteção contra possíveis proteases de hospedeiros. Além disso, a celulose, um polissacarídeo de matriz insolúvel, presente em uma ampla gama de espécies, fornece papel essencial na agregação celular microbiana em razão da sua estrutura dominada por ligações  $\beta$ -glicosídicas. Polissacarídeos também auxiliam na retenção de exoenzimas, o que torna a matriz de biofilme um sistema de digestão externa (FLEMMING *et al.*, 2023).

A função proteica de enzimas extracelulares também merece certa notoriedade, visto que são importantes na catálise enzimática de substâncias bioquímicas e degradação de macromoléculas, assim como, na modulação da matriz através de hidrolases, esterases, proteases e liases degradadoras de polissacarídeos, o que permite uma reconstrução contínua a matriz (FLEMMING *et al.*, 2023). Outro componente relevante são os amilóides, proteínas insolúveis em água, os quais possuem múltiplas funções biológicas em biofilmes; amilóides auxiliam na estabilização da matriz, divisão celular, armazenamento de nutrientes, modulação da

tensão superficial, regulação e comunicação do ciclo celular, floculação, resistência à dessecação, toxicidade, virulência e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, assim como, contribuem para a resistência contra estressores mecânicos, térmicos e químicos do biofilme (VAN GERVEN *et al.*, 2018; SERRA & HENGGE, 2019; LEVKOVICH, GAZIT & BAR-YOSEF, 2021; FLEMMING *et al.*, 2023).

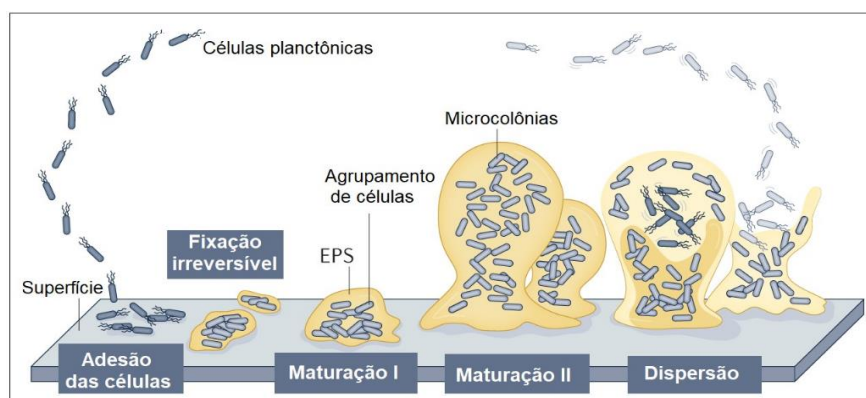
DNA extracelular (eDNA) é um dos polímeros mais frequentes na matriz do biofilme. Sua liberação, para o meio extracelular do biofilme, está relacionada a atividades secretoras, autólise, bem como, liberação por vesículas de membrana, estando assim, associado principalmente a processos de lise celular e ao DNA genômico (IBANEZ *et al.*, 2017). O componente eDNA contribui para estrutura do biofilme, colaborando na estabilização da matriz e por conseguinte no aumento da coesão, além do mais, tem papel significativo na comunicação entre células do biofilme, como fonte de nutrientes, proteção contra-ataques e troca de genes (KARYGIANNI *et al.*, 2020). A troca de fragmentos genéticos entre as células é um fator de grande relevância para a estrutura do biofilme, visto que, plasmídeos e genes de resistência podem ser compartilhados por transferência horizontal de genes, permitindo uma ampla diversidade genética e capacidade de adaptação (KARYGIANNI *et al.*, 2020; FLEMMING *et al.*, 2023).

Em suma, as moléculas constituintes do EPS interagem de forma complexa e dinâmica, determinando as relativas condições de vida das células no ambiente do biofilme. A disposição e concentração de moléculas autoproduzidas de EPS fornece uma infraestrutura versátil e adaptável à vida microbiana multicelular e demonstra propriedades que não são compartilhadas por células planctônicas (FLEMMING *et al.*, 2023). Ademais, a matriz possui ainda capacidade de modulação, viscoelasticidade, exibindo deformação elástica e fluência viscosa, em resposta a estresse mecânico e químico e para captura de nutrientes (NGUYEN *et al.*, 2021).

### 3.4.3 Etapas de formação do biofilme

A formação da arquitetura tridimensional do biofilme é um processo altamente complexo, em que as células de microrganismos passam do modo de crescimento planctônico (com células únicas e independentes) para o modo sésil (agregados microbianos). Durante esse processo ocorre uma série de alterações fisiológicas, metabólicas e fenotípicas, tal como, a expressão de múltiplos genes

regulatórios, os quais variam de acordo com as espécies envolvidas e condições ambientais detectadas (MUHSIN *et al.*, 2015; CIOFU *et al.*, 2022; ALI *et al.*, 2023; KHAN *et al.*, 2023b). Segundo o modelo clássico, a formação de biofilme em superfície envolve, de modo geral; (1) adesão e fixação reversível, (2) fixação irreversível, (3) desenvolvimento inicial da estrutura do biofilme e formação de microcolônias, (4) maturação do biofilme e (5) dispersão, conforme demonstrado na Figura 4.



**Figura 4** - Modelo clássico de cinco etapas de desenvolvimento de biofilme em superfícies. Adaptado de SAUER *et al.*, 2022.

A adesão inicial de células planctônicas flutuantes a qualquer superfície ocorre por meio de forças físicas e apêndices bacterianos, como flagelos, pili ou fímbrias. Nesse estágio a ligação ainda é transitória e facilmente reversível. A intensidade da aderência depende do tipo de material e sua respectiva composição, bem como, de circunstâncias ambientais, como pressão e temperatura. Já a persistência de adesão das células à superfície é mediada através de forças hidrofóbicas, repulsão estéricas, eletrostáticas, de van der Waals e até mesmo por adesão proteica. Todavia, tais mecanismos auxiliam as células a superar forças repulsivas ao se ligar a uma superfície, formando uma monocamada de células bacterianas (VEERACHAMY *et al.*, 2014; MUHSIN *et al.*, 2015; CIOFU *et al.*, 2022; SHARMA *et al.* 2023).

A etapa seguinte envolve ligações entre estruturas microbianas, através de adesinas específicas e a camada mais externa do substrato, o que proporciona de fato, a ancoragem (AN *et al.*, 2000). Nessa fase, organismos frouxamente conectados solidificam-se pelo sistema de adesão produzindo EPS que interagem com o material da superfície e/ou com os receptores presentes em pili, fímbrias ou fibrilas. Logo, a

adesão torna-se mais resistente à remoção por intervenções físicas ou químicas e os micróbios planctônicos ligam-se entre si, formando agregados (MUHSIN *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2023).

Posteriormente, sucede-se a multiplicação e divisão celular para formação de microcolônias, tal processo é provocado por sinalizações químicas específicas que ocorrem na matriz de EPS. A constituição de microcolônias em biofilme é diversa e sua estabilidade está relacionada à cooperação entre comunidades (*quorum sensing*), visto que é importante, por exemplo, a troca de substratos e metabólitos (SHARMA *et al.*, 2023). Por conseguinte, essa maturação se intensifica ainda mais através do amadurecimento e desenvolvimento de micro e macrocolônias, as quais expandem-se em tamanho e espessura. O amadurecimento envolve canais e poros para transporte de água e nutrientes. No entanto, a maturação é possibilitada pela secreção de fatores de sinalização bacterianos, decorrentes da liberação de EPS, ocasionando a expressão de genes próprios no biofilme, o que auxilia, sustenta e protege a estrutura (MUHSIN *et al.*, 2015; CIOFU *et al.*, 2022; SHARMA *et al.*, 2023).

Por último, ocorre o desprendimento e disseminação de células (individuais ou em agregados) do biofilme. Para tal, o biofilme é rompido por meio de regulações genéticas e liberação de enzimas que auxiliam na lise de polissacarídeos ancorados na matriz. A dispersão está relacionada a colonização de novos locais, como também para obtenção de nutrientes escassos, baixo nível de oxigênio, no caso de organismos aeróbios, densidade celular excessiva ou abundância de metabólitos (CIOFU *et al.*, 2022; SHARMA *et al.*, 2023)

Vale ressaltar que a formação de biofilme não ocorre de maneira similar a todas as espécies. Os biofilmes são normalmente representados na literatura pelo modelo clássico de cinco etapas associado a superfície (apresentado acima), todavia tornou-se evidente que seu desenvolvimento pode apresentar características exclusivas em razão de espécie ou condição, como é o caso dos tapetes microbianos, que podem ser altamente estratificados ao longo de camadas horizontais, bem como, aqueles agregados não aderidos em superfície (SAUER *et al.*, 2022).

#### 3.4.4 Sistema de comunicação do Biofilme – *Quorum sensing*

*Quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação célula-célula dependente da densidade microbiana, ou seja, estimula mudanças no comportamento

celular quando a população atinge uma densidade crítica (ABISADO *et al.*, 2018; ISRAEL *et al.*, 2023). O mecanismo é ordenado por auto indutores que penetram na membrana celular e provocam uma série de respostas, estes diferenciam entre si conforme espécies envolvidas, por exemplo, em bactérias gram positivas as moléculas sinalizadoras, que facilitam o QS, são baseadas em peptídeos, enquanto em bactérias gram negativas predomina-se a molécula acil-homoserina lactona (AHLs) (ISRAEL *et al.*, 2023). O sistema QS pode influenciar uma ampla gama de processos biológicos, como a bioluminescência, formação de biofilme, competência celular, transferência horizontal de genes, expressão do fator de virulência, relações simbióticas, esporulação de fungos, produção de pigmentos, motilidade, produção de toxinas e até mesmo a produção de antibióticos (JOSHI, KOTHARI & PATEL, 2016; PREDÁ & SANDULESCU, 2019; ALBUQUERQUE & CASADEVALL, 2012; ÍNAT *et al.*, 2021; VAN GESTEL *et al.*, 2021; ARMES, WALTON & BUCHAN, 2022; WANG *et al.*, 2022).

A detecção do QS foi observada primeiramente em duas bactérias marinhas; *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi*, os autoindutores lactona N-acil-homoserina e autoindutor-2 (AI-2) são sintetizados quando há baixa população bacteriana e ligam-se a proteínas receptoras específicas quando a densidade populacional atinge um nível ideal, o que desencadeia diversos eventos de sinalização, que por sua vez, ativa genes lux e conseqüentemente a emissão de bioluminescência (BRODL, WINKLER & MACHEROUX, 2018; ISRAEL *et al.*, 2023). Desde então, foram identificados homólogos desses genes em várias comunidades, proporcionando assim um melhor entendimento dos padrões comportamentais em agregados (ISRAEL *et al.*, 2023).

No biofilme, o ambiente é propício para a comunicação celular devido a alta densidade microbiana. O sistema QS proporciona mudanças estruturais e fisiológicas para a estrutura envolvida, incluindo a fixação irreversível, síntese de EPS, canais de fluido, auxílio na maturação e dispersão (ISRAEL *et al.*, 2023). Tais alterações são comumente reguladas por AHLs e peptídeos. Logo, a formação do biofilme depende de QS, o qual colabora para sua estabilidade e possui um papel vital na coordenação de atividades microbianas (GHOSH *et al.*, 2022).

#### 3.4.5 Biofilme em Água Produzida de Petróleo



A incorporação de uma ampla variedade de microrganismos e seus versáteis metabólitos na estrutura do biofilme desencadeia efeitos desagradáveis para a indústria de petróleo e gás. Sistemas de extração, produção, tratamento e distribuição são favoráveis para a formação e desenvolvimento de biofilme, incluindo aqueles relacionados a tanques de armazenamento de água produzida, devido, principalmente, à baixa vazão (fluxo lento), a qual promove estagnação de nutrientes favoráveis à formação do biofilme (JENNEMAN & DE LEON, 2022).

A contaminação microbiana em AP está fortemente associada à liberação de ácidos, deposição de sulfeto de ferro, intensificação do processo corrosivo (a partir da CIM) e entupimento (*biofouling* e/ou bioincrustação) de equipamentos, tubulações e instalações de produção, em geral (PAULUS, 2005; YIN *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2022). Em biofilmes heterogêneos, ou seja, constituídos por BRS, BPA, arqueias metanogênicas e outros microrganismos (aeróbios e/ou anaeróbios), prejudiciais para a indústria, é possível ocorrer a associação desses problemas, o que dificulta largamente o seu controle (XU, LI & GU, 2016; JENNEMAN & DE LEON, 2022).

Além da liberação de metabólitos e transferência de elétrons por microrganismos em biofilmes, a indução da CIM pode estar relacionada à presença de oxigênio, visto que este colabora para o tipo de corrosão eletroquímica. Desse modo, o próprio crescimento do biofilme, em superfícies metálicas, pode resultar em CIM, em seu arranjo irregular pode existir uma concentração de oxigênio diferencial, o que pode favorecer a cinética de reações anódicas e catódicas e propiciar o mecanismo corrosivo (BEECH & SUNNER, 2004; KNISZ *et al.*, 2023). Ainda, o acúmulo indesejável de material biológico, *biofouling* e/ou bioincrustação, em estruturas petrolíferas está diretamente relacionado ao desenvolvimento de biofilme. Este pode induzir a CIM (por corrosão sob depósito orgânico), obstruir equipamentos e tubulações, reduzindo o fluxo tanto de petróleo quanto de água produzida, o que pode afetar negativamente a aplicabilidade das operações (GORMLEY *et al.*, 2018; GIZER *et al.*, 2023; KNISZ *et al.*, 2023). Entretanto, para reter as complicações relacionadas à complexidade do biofilme, é necessária utilização de tratamentos customizados, bem como, um amplo monitoramento.

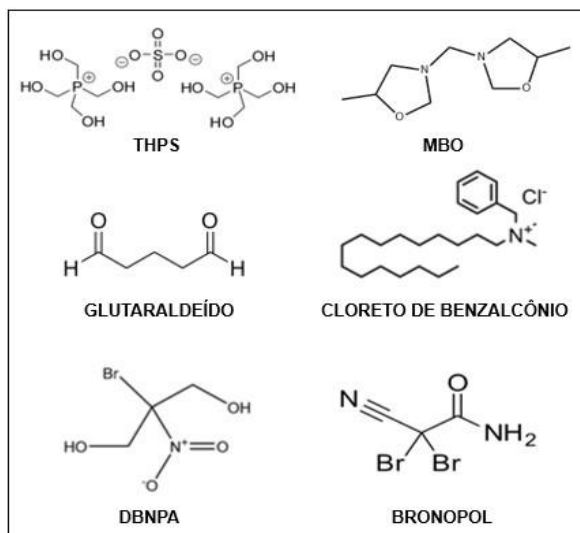
### **3.5 Controle de microrganismos em campos de petróleo**

### 3.5.1 Biocidas

As tentativas de eliminação de microrganismos na indústria petrolífera envolvem o uso de métodos químicos e/ou físicos, sendo biocidas o mecanismo mais frequente de controle; principalmente pelo seu custo-benefício (TURKIEWICZ *et al.*, 2013; ZULKIFLIANI, 2017; SHI *et al.*, 2023). Biocidas são compostos químicos, orgânicos e/ou inorgânicos, utilizados para eliminar ou evitar o crescimento de microrganismos em uma determinada situação. Tais substâncias costumam ser aplicados durante a reinjeção de água produzida no poço para recuperação secundária do petróleo de modo a prevenir danos de contaminação microbiana (ZULKIFLIANI, 2017; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021). Esses produtos devem ser aplicados em concordância com um alvo específico a ser resolvido, sendo necessário um conhecimento aprofundado sobre o tipo de microrganismo a ser atingido e seus respectivos metabólitos, assim como o substrato ou material em que vive. Podem ainda ser preparados com aditivos anti-incrustantes, sequestrantes de oxigênio, dispersantes de óleo, quelantes de cátions divalentes e condicionadores de superfície. De qualquer modo, o biocida ideal deve possuir atividade em baixas concentrações sobre um amplo espectro antimicrobiano, apresentar baixa toxicidade, ser biodegradável, disponível economicamente e solúvel em água ou em outros solventes (CAVALCANTI, 2001; CABRAL & SANTOS, 2019). Ademais, é importante identificar sua toxicidade para que não cause maiores impactos ambientais (KAHRILAS *et al.*, 2015; MAILLARD, 2018).

Existem diversos tipos de biocidas para tratamento na indústria em geral, que podem ser divididos em oxidantes e não-oxidantes. Quando conceituados como oxidantes, agem oxidando a matéria orgânica presente nas células e liberando radicais livres tóxicos (BARROS, MELO & PEREIRA, 2022), em exemplos está o cloro, ozônio e peróxido de hidrogênio (PERES *et al.*, 2008). Biocidas oxidantes não costumam ter efeitos significativos na inibição da formação de biofilmes (SHI *et al.*, 2023). Já biocidas considerados não-oxidantes geralmente não são corrosivos e atacam alvos específicos dentro da célula. Os principais representantes dessa última categoria, em água produzida, são o Glutaraldeído, THPS, DBNPA e em menor quantidade, ADBAC e Bronopol, já o antimicrobiano MBO é comumente empregado em biocombustíveis (KAHRILAS *et al.*, 2015; ZIMMER *et al.*, 2017; ALAMRI, 2020)

(Figura 5). Destes, apenas o ADBAC é classificado como lítico, o restante enquadra-se como eletrolítico.



**Figura 5** - Estrutura molecular dos biocidas.

Biocidas eletrolíticos interagem por ligação covalente com nucleófilos celulares (grupos tiol (-SH) e amina secundária (-NH)) em proteínas de membrana, ocasionando a inativação enzimática (BARROS, MELO & PEREIRA, 2022). Já os biocidas líticos, como compostos de amônio quaternário (CAQs) e álcoois, interagem com a membrana externa e posteriormente com a membrana citoplasmática, causando a perda de integridade e o vazamento intracelular de componentes, seguido de lise celular (PAULUS, 2005; AMJAD, 2010). O biocida pertence à família dos CAQs, o que significa que possuem um grupo amina quaternária com carga positiva e uma ou duas cadeias alquílicas (PATI & ARNOLD, 2020).

Ainda, os biocidas diferenciam entre si em composição química, características físicas, estabilidade, toxicidade e modo de ação. Estes, podem atuar em múltiplos alvos nas células bacterianas (MAILLARD & PASCOE, 2023). Por exemplo, o biocida THPS tem capacidade de provocar danos extensivos à membrana celular e de inibir a enzima lactato desidrogenase, utilizada por BRS e essencial ao metabolismo de lactato (JONES *et al.*, 2012). Por outro lado, Glutaraldeído reage com proteínas de membrana, reticulando proteínas, alterando a permeabilidade celular e causando inibição de funções da membrana externa, como transporte de nutrientes e liberação de resíduos (MAILLARD, 2002), sendo também efetivo contra biofilmes de

BRS (GARDNER & STEWART, 2002). Já a ação do DBNPA depende da interação do bromo com nucleófilos contendo enxofre (como cisteína e glutatona) presentes no interior das células, ou seja, este não interage com a membrana (mantém intacta) mas sim, com componentes-chave do metabolismo celular (BARROS, MELO & PEREIRA, 2022). Além disso, sabe-se que o Bronopol reage com grupos tiol em enzimas citoplasmáticas ligadas à membrana, por exemplo desidrogenases, o que resulta na inibição metabólica, bem como, demonstrou-se que em condições aeróbias, este oxida cataliticamente proteínas contendo tiol, resultando em subprodutos de superóxido e peróxido, os quais são responsáveis pela sua atividade bactericida (COOMBS *et al.*, 2023). O bronopol também está associado a baixos níveis de liberação de formaldeído, embora ainda não seja fortemente considerado como liberador de formaldeído (COOMBS *et al.*, 2023; ECHA, 2023). A constituição por oxazolidinas presente no biocida MBO, permite inibição de síntese de proteínas e se relaciona com seu modo de ação o qual pode envolver a interação com estruturas celulares externas, componentes da membrana plasmática ou estruturas citoplasmáticas. O ingrediente ativo MBO é considerado eficaz no controle de microrganismos, como BRS (SIEGERT, 2009; YEMASHOVA *et al.*, 2007; BÜCKER, 2015).

A eficácia de um produto biocida pode ser influenciada por fatores inerentes ao produto, como concentração do ativo, pH e excipientes da formulação. Características inerentes aos microrganismos (tipo bacteriano, atividade metabólica e estilo de vida - biofilme) e fatores relacionados à aplicação do produto também devem ser considerados, tal como o tempo de contato e tipo de superfície. A concentração é sem dúvidas mais importante, pois determina a extensão e a gravidade do dano causado à célula bacteriana, podendo resultar em efeitos bactericidas irreversíveis ou bacteriostáticos reversíveis. Baixas concentrações de biocidas podem apresentar interações específicas com a célula, logo, a falta de compreensão desses fatores pode contribuir para a sobrevivência bacteriana (MAILLARD & PASCOE, 2023).

Ademais, para um efetivo controle de microrganismos prejudiciais na indústria petrolífera, os biocidas são utilizados em larga escala, o que pode estimular mecanismos de adaptação e resistência (MAILLARD, 2018; PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021). Desse modo, é importante que sua eficácia seja confirmada primeiramente por testes laboratoriais para só então ser aplicado em sistemas reais.

### 3.6 Resistência Bacteriana a Biocidas

O uso indevido de tratamentos ou baixas concentrações (subdosagens) de um biocida podem representar um fator para o desenvolvimento da resistência em bactérias. Tal capacidade de sobrevivência depende do tipo de microrganismo envolvido (endósporos bacterianos e bactérias gram-negativas tendem a ser mais resistentes que bactérias gram-positivas) e das propriedades fisiológicas intrínsecas e adquiridas, assim como, da influência dos biofilmes bacterianos (VAZ & LALL, 2021; ZHANG & CHENG, 2022; MAILLARD & PASCOE, 2023).

A resistência adquirida está diretamente relacionada à aquisição de plasmídeos ou transposons, ou ainda, a seleção de mutantes resistentes de um microbioma previamente exposto a um agente antimicrobiano. A resistência intrínseca refere-se à capacidade natural de adaptação de uma espécie. Existem várias formas de resistência intrínseca, como por exemplo, a redução na permeabilidade celular de algumas bactérias e a produção de bombas de efluxo para diminuição da concentração intracelular do biocida (MORTON *et al.*, 1998; GOUDARZI & NAVIDINIA, 2019; VAZ & LALL, 2021; COOMBS *et al.*, 2023).

Em relação a permeabilidade celular, em bactérias gram-negativas, compostos hidrofílicos tendem a ter dificuldades para atravessar a bicamada lipídica e devem ser facilitados por canais de porinas ou porinas de membrana externa (Omps). Entretanto, a exposição frequente a antimicrobianos pode induzir mutações no gene que codifica a proteína Omps, resultando em sua redução ou perda e contribuindo assim, para o desenvolvimento da resistência (ZHANG & CHENG, 2022). Por outro lado, as bombas de efluxo representam um sistema de autoproteção que evita a acumulação de substâncias tóxicas nas células através do bombeamento dessas moléculas para fora da bactéria, tal sistema é considerado o mecanismo de resistência bacteriana mais rápido e eficaz de resposta ao estresse. O efluxo tem sido amplamente associado ao aumento de 2 a 10 vezes na MIC em biocidas (ZHANG & CHENG, 2022; MAILLARD & PASCOE, 2023). Há outros mecanismos que também podem estar envolvidos na resistência a biocidas, como a produção de enzimas inativadoras, alterações metabólicas, mudanças na morfologia celular, indução de sistemas de autorreparo e a formação de biofilme (NOURBAKHSI *et al.*, 2022; ZHANG & CHENG, 2022).

O estilo de vida na forma de biofilme proporciona às bactérias um aumento de 10–1000 vezes na resistência aos antimicrobianos em comparação com as células planctônicas (MAH & O'TOOLE, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2011; RODIS *et al.*, 2020). Essa baixa suscetibilidade está relacionada, em grande parte, à matriz do biofilme, a qual atua como uma barreira de difusão, limitando a penetração de biocidas. Nesse sentido, há relatos que o polissacarídeo alginato, presente na matriz do biofilme como uma EPS, pode reter agentes antimicrobianos. A expressão de bombas de efluxo também é regulada positivamente em biofilmes. Além de todo o ambiente protetor, o biofilme promove a estabilidade de plasmídeos e pode facilitar, através da comunicação célula-célula, a transmissão de elementos genéticos móveis que codificam genes de resistência (ANDERSON & O'TOOLE, 2008; MOZINA, KLANCNIK & RASPOR, 2013; RODIS *et al.*, 2020).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização do estudo

Todas as análises foram desenvolvidas no Laboratório de Pesquisa e Análises Microbiológicas do Departamento de Microbiologia (Lab. nº 537), Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS/UFRGS).

### 4.2 Amostras de água produzida e biocidas utilizados

Quatro amostras de diferentes plataformas de campos de petróleo *offshore* localizados no estado do Rio de Janeiro e São Paulo foram utilizadas para esse estudo (Tabela 2). A empresa Dorf Ketal Brasil Ltda, destaque na indústria de especialidades químicas para área do petróleo, foi responsável pela coleta e fornecimento das amostras de água produzida, assim como, dos biocidas THPS, Glutaraldeído, DBNPA, ADBAC, Bronopol e MBO, utilizados neste estudo. O biocida MBO foi incluído neste estudo para avaliação de uma possível ação inibitória em AP.

**Tabela 2** - Dados das amostras de água produzida utilizadas no estudo.

Amostra	Bacia	Campo	Plataforma	Local na Plataforma
A	Bacia de Campos – RJ	1	A	Água livre do poço
B	Bacia de Campos – RJ	1	B	Hidrociclone
C	Bacia de Campos – RJ	2	C	Separador
D	Bacia de Santos – SP	3	D	Flotador

Os biocidas comerciais disponibilizados possuíam diferentes valores de teores ativos (m/m). Para permitir suas respectivas comparações, foram igualmente equalizados, para uma dosagem de 50% de teor ativo, através de diluições com água destilada estéril. A fim de manter a integridade da molécula, as soluções estoques foram preparadas no mesmo dia das análises.

### 4.3 Caracterização físico-química e biológica da água produzida

As amostras foram disponibilizadas previamente caracterizadas quanto ao teor de cloreto, turbidez e pH pela empresa Dorf Ketal Brasil Ltda. A salinidade foi avaliada por titulação potenciométrica no equipamento Titrino Plus 848 (Metrohm,

Switzerland), no qual foi conectado a um eletrodo de prata e teve como solução padrão  $\text{AgNO}_3$  0,01 mol·L<sup>-1</sup>. A turbidez foi analisada por meio de turbidímetro- modelo Aqualytic AL250-IR sendo utilizada uma solução de formazina para calibração. Para a análise do potencial hidrogeniônico foi necessário medidor de pH (Hanna Instruments, EUA) (Apêndice A).

A concentração microbiana total da amostra foi quantificada por meio de diluições seriadas em água peptonada e semeadura em *Plate Count Ágar* (PCA) pelo método de espalhamento em superfície. Posteriormente, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placa utilizando o Contador de Colônias Manual CP608, Phoenix Luterco (Apêndice B).

#### **4.4 Isolamento e cultivo de bactérias halofílicas**

As bactérias halofílicas foram isoladas a partir das amostras de água produzida na extração de petróleo pela técnica de enriquecimento durante 21 dias. Para a identificação de organismos halófilos foi utilizado o meio de cultura Caldo Marinho (Marine Broth 2216, Sigma Aldrich). Sendo assim, as amostras foram individualmente semeadas em 40 mL de Caldo Marinho 2x na proporção 1:1 e incubadas em condições aeróbias e anaeróbias a 30°C. Para permitir o desenvolvimento e cultivo de bactérias halofílicas/halotolerantes em condições anaeróbias foi utilizada jarra de anaerobiose e gerador atmosférico Anaerobac® (Probac, Brasil), assim como, indicador de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e fita indicadora de anaerobiose. Semanalmente, inóculos de 10% (v/v) foram transferidos para frascos contendo Caldo Marinho 1x. Após os 21 dias, foi realizada uma diluição seriada do crescimento em água peptonada e semeadura em placas de ágar Marinho para isolamento de colônias e posterior identificação. A diluição em água peptonada foi realizada em 20 vezes ( $10^{-1}$  até  $10^{-20}$ ) e a semeadura em ágar Marinho a cada duas diluições. Após o crescimento, foram selecionadas três colônias de cada morfologia colonial distinta (cor, aspecto e tamanho) conforme menor diluição.

#### **4.5 Identificação e preservação dos isolados**

Inicialmente, utilizou-se a técnica de semeadura por esgotamento e coloração de Gram para determinação da pureza e observações de características morfológicas. Para a identificação dos isolados foi aplicado o método de *MALDI-TOF*



(*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly*) a partir do espectrofotômetro Microflex LT Biotyper 4.0 (Bruker) e de acordo com as especificações do fabricante. Na preparação das amostras foram utilizadas as técnicas de análise de Transferência Direta e Extração de Proteínas. Uma colônia de cultura recente, para técnica de transferência direta, ou 1µL do extrato protéico, foi depositado em um *spot* na placa alvo do *MALDI-TOF*, após a secagem foi aplicado 1µL de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e em seguida foi realizada a leitura pelo equipamento. Por meio do software flexControl e MBT RTC (*Real Time Classification*) obteve-se um espectro característico de espécie e diferentes escores de confiabilidade foram gerados. Escores maiores que 2 foram considerados para nível de identificação de espécies, à medida que, escores de 1,70 a 1,99 foram indicativos a nível de gênero. Escores inferiores a 1,70 não foram considerados para identificação.

Para confirmação em nível de espécie do gênero *Achromobacter* foram necessários testes bioquímicos adicionais, desenvolvidos conforme BUSSE e STOLZ (2006). Realizou-se a prova de redução nitrato-nitrito a partir do crescimento dos isolados em caldo nitrato (Nitrate Broth, Himedia) e posterior aplicação de ácido sulfanílico e N-Dimetil-Naftilamina. Pó de zinco foi utilizado para contraprova dos negativos.

As cepas já identificadas foram preservadas a -20°C em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) com adição de leite em pó desnatado e 10% de glicerol. Após o crescimento das cepas em 1mL de caldo BHI, a cultura foi centrifugada a 300 rpm por 1 minuto, retirou-se 900ul de sobrenadante e o *pellet* da célula foi homogeneizado juntamente com *skim milk* e glicerol (SAEKI *et al.*, 2015). A amostra foi congelada a -20°C para análises posteriores.

## 4.6 Caracterização das cepas bacterianas

### 4.6.1 Avaliação da tolerância em NaCl

A tolerância ao sal foi avaliada em nível de espécie através de análise visual em tubos após adição de TTC (Trifenil Tetrazolio 2,3,5 Cloreto) - indicador redox. A máxima tolerância ao NaCl foi testada em concentrações de 0,1M; 0,5M; 1M; 2M e

2,6M, utilizando Cloreto de Sódio P.A. NaCl (Vetec Sigma Aldrich Brasil LTDA). Ademais, as cepas deste ensaio foram escolhidas conforme maior escore de identificação no *MALDI-TOF*, sendo utilizado uma cepa principal de cada espécie.

Os isolados foram cultivados *overnight* em ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*), ajustados conforme a escala 0,5 McFarland em salina 0,9% e 40  $\mu$ L do ajuste foi inoculado em 4 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) suplementado com NaCl nas devidas molaridades, produzindo uma suspensão com  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Em tubos com 1,5 mL de TSB com suplementações de NaCl foi adicionado 1,5 mL da suspensão produzida. A incubação foi de 24 horas a 35°C.

Após o período de crescimento, foi adicionado aos tubos 300  $\mu$ L de TTC 0,5% (10% do poço) para análise da viabilidade celular. A observação de células viáveis e metabolicamente ativas procedeu-se por meio da visualização de coloração vermelha nos tubos.

#### 4.6.2 Capacidade de formação de biofilme

Todos os isolados foram classificados conforme seu nível de aderência em microplacas de 96 poços de poliestireno com fundo plano de acordo com a metodologia de Stepanovic e colaboradores (2007). Após o crescimento *overnight* em TSA, os isolados foram ajustados para escala nefelométrica 0,5 de Mc Farland em salina 0,9%. Em quintuplicata, 20  $\mu$ L do ajuste em salina foi adicionado em cada poço em conjunto com 180  $\mu$ L de caldo TSB. A cepa ATCC 35984 (*Staphylococcus epidermidis*) foi usada para controle positivo e 200  $\mu$ L de TSB estéril foi empregue para controle negativo. As placas permaneceram incubadas durante 24 horas a 35°C.

Posteriormente ao desenvolvimento do biofilme, os sobrenadantes foram retirados e os poços lavados três vezes com solução salina 0,9% para remoção de células não aderentes. Células aderentes foram fixadas com 200  $\mu$ L de metanol 99% por 15 minutos. Seguida a fixação, o metanol foi descartado e adicionou-se 200  $\mu$ L de solução cristal violeta 2% filtrada. Após 5 minutos, o excesso de corante foi removido com água destilada e acrescentou-se 200  $\mu$ L de etanol 99% para a solubilização do corante. A quantificação do biofilme formado foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Anthos Zenyth 200rt, Biochrom Ltd.) a 570nm.

Sendo assim, os isolados foram classificados em categorias de aderência conforme média de densidade óptica dos isolados (DOI). A densidade óptica ponto de

corte (DOc) foi definida em três desvios padrão acima da média da densidade óptica do controle negativo (DON). Obedecido tais parâmetros, a formação de biofilme foi avaliada em não aderente ( $DOi \leq DOc$ ), fracamente aderente ( $DOc < DOi \leq 2 \times DOc$ ), moderadamente aderente ( $2 \times DOc < DOi \leq 4 \times DOc$ ) e fortemente aderente ( $4 \times DOc < DOi$ ).

#### 4.6.3 Capacidade de produção de ácido

Os isolados foram analisados, em nível de espécie, conforme a sua produção de ácido a partir da utilização do meio de cultura Caldo Vermelho Fenol (CVF) com adição de 5g/L de glicose (Apêndice C). Bactérias produtoras de ácidos foram caracterizadas, após o crescimento em CFV à 35°C, mediante indicador vermelho fenol, no qual tornou-se de vermelho alaranjado para amarelo quando houve produção de ácido ( $pH < 6,5$ ) durante a fermentação de carboidrato.

#### 4.6.4 Corrosão influenciada microbiologicamente em cupons de aço carbono

A CIM foi determinada por ensaios de perda de massa a partir de cupons de aço carbono 1020 submetidos a teste de imersão em caldo TSB durante 7 dias. Tal procedimento foi realizado em duplicata de forma a avaliar a corrosão gerada por nível de espécie, assim como, a possível corrosão causada por caldo TSB estéril. Os cupons utilizados neste ensaio foram fornecidos pela empresa Dorf Ketal Brasil Ltda.

Os cupons metálicos foram preparados conforme normas técnicas ASTM (*American Society for Testing and Materials*) (G31-12) com modificações. Com auxílio de lixa granulometria 120 *mesh*, os cupons foram polidos para remoção de depósitos aderidos à superfície e posteriormente pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g. Então foram imersos em etanol 96% e através de sucessivas lavagens com acetona P.A. e água destilada autoclavada os conservantes foram eliminados. Após foram secos e esterilizados com radiação ultravioleta durante 30 minutos para cada lado do cupom.

Mediante auxílio de luva e pinça estéril, os cupons foram presos com fio de nylon e acomodados em frascos com 450mL de solução de TSB e 4,5mL de inóculo ajustado na escala 0,5 Mc Farland (Figura 6), sendo devidamente identificados através do fio e incubados pelo período de 7 dias a 35°C. Para esse teste, foi

considerado o volume de solução de 0,20 mL para cada mm<sup>2</sup> de superfície, segundo norma NACE TM0169/G31.



**Figura 6** - Disposição dos cupons analisados em caldo TSB para verificação da taxa de biocorrosão por isolado representante das espécies analisadas no presente estudo.

Posteriormente ao período de incubação, os cupons foram retirados e submetidos a decação com ácido clorídrico 10% por 10 minutos. Para verificar a perda de massa, ao final da limpeza, foram novamente pesados em balança analítica. A taxa de corrosão foi expressa conforme a fórmula abaixo (NACE TM0169/G31) e interpretada segundo NACE RP-07-75 (2013) (Tabela 3).

$$\text{Taxa de corrosão} = \frac{K \times W}{A \times T \times D}$$

Onde K=constante em mpy (milésimo de polegada de penetração por ano) ( $3,45 \times 10^6$ ); T= tempo de exposição em horas (168h); A= área do cupom exposta em cm<sup>2</sup> (área total do cupom=19,73 cm<sup>2</sup>); W= perda de massa em grama dos cupons após limpeza; D= densidade do cupom de aço carbono 1020 em g/cm<sup>3</sup> (7,86 g/cm<sup>3</sup>). Para o cálculo da área total do cupom, foram considerados as respectivas medidas: 12 mm de largura, 75 mm de comprimento, 1 mm de espessura e 0,6 mm no diâmetro do furo.

**Tabela 3** - Avaliação da corrosividade.

Corrosividade	Taxa de corrosão	
	mpy*	mm/y
Baixa	< 1	< 0,025
Moderada	1 – 4,9	0,025 – 0,120
Alta	5,0 – 10	0,130 – 0,250
Severa	> 10	> 0,250

\*1 mpy=0,0254 mm/y (milímetros de penetração por ano).

#### 4.7 Determinação da viabilidade de células planctônicas na presença de biocidas

Todas as cepas identificadas foram avaliadas isoladamente e em forma de consórcio (em duplicata) por amostra, conforme a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano - Concentração Inibitória Mínima - de cada biocida (THPS, Glutaraldeído, ADBAC, MBO, Bronopol e DBNPA). Para esse propósito, os isolados foram crescidos *overnight* em ágar TSA e seguidamente ajustados em escala 0,5 Mc Farland em salina 0,9%. Para a análise MIC dos biocidas em consórcios considerou-se uma suspensão contendo quatro cepas de cada espécie (exceto gênero *Bacillus* sp., com 3 cepas) conforme a respectiva amostra (amostra A - 16 cepas e amostra B - 11 cepas, conforme Apêndice D). Tanto para as cepas avaliadas separadamente quanto para os consórcios obteve-se uma suspensão com  $1 \times 10^6$  UFC/mL em caldo TSB 2x e 100 $\mu$ L da mesma foi adicionado em placas de 96 poços de poliestireno com fundo em “u” juntamente com 100 $\mu$ L de solução estoque das dosagens de cada biocida utilizado. Também, foi incluído controle de viabilidade (controle positivo), coloração e controle de esterilidade (controle negativo). As dosagens de biocidas consideradas foram, respectivamente; 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm e 1000 ppm. Estas dosagens foram escolhidas tendo como base ensaios realizados pelo grupo em estudos anteriores (PEREIRA, PILZ-JUNIOR & CORÇÃO, 2021).

Seguidamente, procedeu-se à incubação das placas de poliestireno por 24 horas a 35°C. Após esse período, o crescimento foi observado através da turbidez e a MIC foi determinada mediante primeiro poço com ausência de crescimento visível (poço não turvo).

#### 4.8 Determinação da viabilidade de células sésseis na presença de biocidas

Foi avaliado a concentração inibitória mínima do biofilme e a concentração mínima de erradicação do biofilme em espécie e consórcio de acordo com a amostra relacionada. Para análise de espécie utilizou-se quatro cepas (exceto gênero *Bacillus* sp., com 3 cepas) com diferentes perfis de aderência e MIC, conforme amostras. Para a determinação do MBIC e MBEC em forma de consórcio realizou-se uma suspensão com os mesmos isolados acima a partir da respectiva amostra (amostra A - 16 cepas e amostra B - 11 cepas, conforme Apêndice D), em duplicata. As concentrações obtidas para MIC e 2xMIC de cada biocida foram utilizadas.

O protocolo descrito em 4.6.2 foi seguido para formação do biofilme. Após o desenvolvimento do biofilme, retirou-se por aspiração os sobrenadantes e os poços foram lavados 3x com solução salina 0,9% para remoção das células planctônicas. Após as lavagens, somente os microrganismos aderentes permaneceram no poço, adicionou-se então, 100µL de TSB 2x e 100µL das soluções estoques de cada biocida e respectivas dosagens. O controle positivo foi composto somente por 200µL de TSB estéril. As placas foram novamente incubadas por 24 horas a 35°C. Após este período, o crescimento visível foi observado mediante turbidez para análise de MBIC.

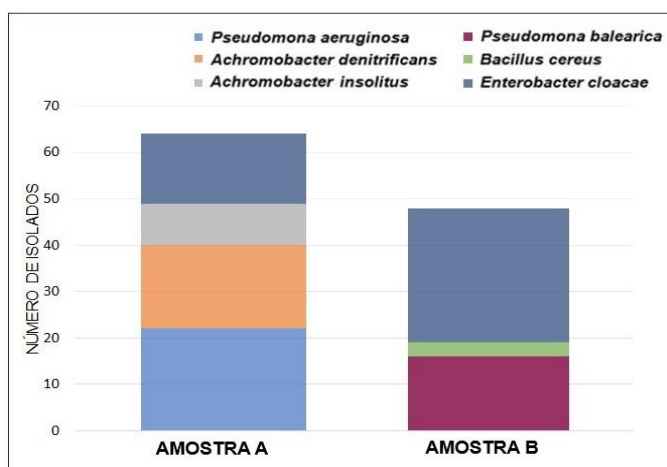
Para determinação da MBEC, foi retirado os sobrenadantes daqueles poços sem crescimento visível e acrescentado 200µL de caldo neutralizante *Dey Engley Neutralizing Broth* (DENB), Himedia. Mediante ponta de ponteiros estéreis foi raspado as células restantes e todo o conteúdo do poço foi adicionado em eppendorf esterilizado, conforme técnica de Wang e colaboradores (2012). Levou-se os eppendorfs para vortex para rompimento dos agregados celulares e 5µL do seu conteúdo foi semeado em ágar TSA através de semeadura por gota. Após 24 horas, as placas de TSA foram avaliadas por presença e ausência de crescimento, sendo MBEC definido através da primeira concentração sem crescimento visível nas placas de TSA.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos Isolados

Ao todo foram identificados 112 isolados em água produzida, sendo 64 na amostra A e 48 na amostra B. As amostras C e D foram descartadas por possível contaminação ambiental, visto que foram encontrados apenas espécies do gênero *Bacillus sp.*

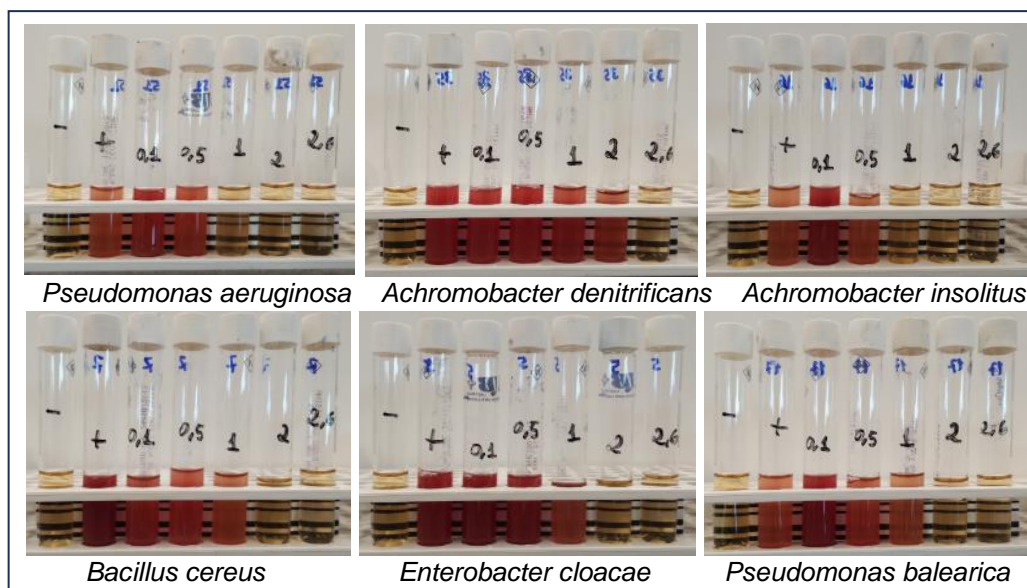
A caracterização por *MALDI-TOF* foi precisa (escores de confiabilidade maiores que 2) na grande maioria dos isolados identificados, sendo necessário testes bioquímicos adicionais apenas para espécies do gênero *Achromobacter* (Amostra A), o qual obteve escores de 1,8 e 1,9 entre duas espécies - *A. denitrificans* e *insolitus*. Após prova de redução nitrato-nitrito, *A. insolitus* foi considerado como positivo para a redução (coloração vermelha foi obtida no teste) e *A. denitrificans* como negativo (incolor/cor do meio no teste). Em síntese, foram encontrados 49 isolados em condições aeróbias (CAe) na Amostra A; *Pseudomonas aeruginosa* (22), *Achromobacter denitrificans* (18) e *Achromobacter insolitus* (9), em condições anaeróbias (CAn) prevaleceu a espécie *Enterobacter cloacae* (15). Por outro lado, na Amostra B, foram identificados 28 isolados em condições aeróbias, entre esses; *Pseudomonas balearica* (*Stutzerimonas balearica*) (16), *Bacillus cereus* (3) e *Enterobacter cloacae* (9) e em condições anaeróbias apenas *Enterobacter cloacae* (20) (Figura 7). Não foi identificado nenhum isolado anaeróbio estrito, em razão disso, os experimentos posteriores foram realizados em aerobiose.



**Figura 7** - Identificação dos isolados nas amostras A e B em água produzida *offshore* de petróleo.

## 5.2 Análise da Máxima Tolerância à NaCl

A partir de análise visual após adição de TTC percebeu-se que as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Achromobacter insolitus* obtiveram tolerância máxima em NaCl a 0,5M. Enquanto *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas balearica* apresentaram crescimento em até 1M e apenas *Achromobacter denitrificans* apresentou viabilidade em 2M (Figura 8).



**Figura 8** - Observação da máxima tolerância em NaCl dos isolados. Da esquerda para a direita: Controle negativo, controle positivo, 0,1M, 0,5M, 1M, 2M e 2,6M.

## 5.3 Formação de Biofilme

O software ADAP foi utilizado para leitura da densidade óptica dos isolados. Foi encontrado como média da DOn o valor de 0,024 e desvio padrão de 0,011. O ponto de corte com três desvios acima da DOc foi igual a 0,032. A grande maioria dos isolados (n=106) foi classificada como fortemente aderente (94,6%), com exceção de seis isolados que foram considerados como moderadamente aderente; cepa nº 5, 12, 18 e 15 de *Enterobacter cloacae*, cepa nº 10 de *Bacillus cereus* e cepa nº 22 de *Pseudomonas balearica*.

## 5.4 Produção de Ácidos

O crescimento em CVF indicou *Enterobacter cloacae* (Enterobacteriaceae) e *Bacillus cereus* (Bacillaceae) como bactérias produtoras de ácido (Figura 9).





**Figura 9** - Crescimento dos isolados em CVF. D Da esquerda para a direita: *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter insolitus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas balearica*, *Bacillus cereus* e controle negativo.

### 5.5 Corrosão influenciada microbiologicamente

Os cupons de aço carbono 1020 submetidos a avaliação da CIM, em nível de espécie, apresentaram uma taxa de corrosão baixa a moderada após a decapagem ácida. Observou-se taxa de corrosão moderada nos isolados representantes de *Enterobacter cloacae* (BPA), *Bacillus cereus* (BPA) e *Pseudomonas balearica* (Tabela 4). O controle negativo (TSB estéril) manteve-se com o mesmo peso inicial do início do experimento.

**Tabela 4** - Taxa de corrosão observada em cupons de aço carbono 1020 quando submetidos ao teste de imersão durante 7 dias em caldo TSB contendo os isolados.

Identificação	Perda de massa	mpy	mmy	Taxa de corrosão
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0,001g	0,1324	0,0033	Baixa
	0,002g	0,2648	0,0067	Baixa
<i>Achromobacter denitrificans</i>	0,002g	0,2648	0,0067	Baixa
	0,001g	0,1324	0,0033	Baixa
<i>Achromobacter insolitus</i>	0,002g	0,2648	0,0067	Baixa
	0,001g	0,1324	0,0033	Baixa
<i>Pseudomona balearica</i>	0,009g	1,1917	0,0302	Moderada
	0,008g	1,0593	0,0269	Moderada
<i>Bacillus cereus</i>	0,011g	1,4566	0,0369	Moderada
	0,012g	1,5890	0,0403	Moderada
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,033g	4,3692	0,1109	Moderada
	0,027g	3,5753	0,0908	Moderada

### 5.6 Concentração Inibitória Mínima frente aos biocidas

Os isolados testados exibiram valor MIC diferenciados para os 6 biocidas analisados. As maiores concentrações inibitórias mínimas foram encontradas nos biocidas Glutaraldeído e THPS, os quais apresentaram resistência em concentrações de 250 ppm a 1000 ppm. ADBAC apresentou MIC entre 10 ppm e 125 ppm, MBO em 50 ppm a 250 ppm, Bronopol de 10 ppm a 50 ppm e DBNPA demonstrou sua

concentração inibitória entre 25 ppm e 250 ppm. As informações detalhadas do MIC obtido em cada uma das concentrações e a quantidade de isolados em cada amostra estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Quantidade de isolados das Amostras A e B em sua respectiva concentração inibitória mínima frente aos biocidas THPS, Glutaraldeído (GLUT), ADBAC, MBO, Bronopol (BNP) e DBNPA.

Concentração	THPS		GLUT		ADBAC		MBO		BNP		DBNPA	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
10 ppm	-	-	-	-	16	36	-	-	44	15	-	-
25 ppm	-	-	-	-	11	8	-	-	20	31	15	-
50 ppm	-	-	-	-	36	4	-	1	-	2	32	22
125 ppm	-	-	-	-	1	-	42	18	-	-	17	24
250 ppm	23	12	-	2	-	-	22	29	-	-	-	2
500 ppm	31	12	36	15	-	-	-	-	-	-	-	-
1000 ppm	10	22	26	29	-	-	-	-	-	-	-	-
>1000 ppm	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-

Ademais, observou-se que o biocida Bronopol e ADBAC apresentaram a mais baixa concentração inibitória mínima em relação aos demais biocidas da análise. Em concentrações de 10 ppm, Bronopol inibiu 86,3% dos isolados identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, 100% dos isolados em *Achromobacter denitrificans*, 77,7% em *Achromobacter insolitus* e 87,5% de *Pseudomonas balearica*. Já o biocida ADBAC produziu melhores efeitos, na concentração de 10 ppm, em *Enterobacter cloacae* (59%), *Bacillus cereus* e *Pseudomonas balearica* (100%). As cepas analisadas apresentaram distintos intervalos de MIC para cada biocida, em razão disso, os resultados foram apresentados por espécie. O MIC mais frequente, conforme espécie da amostra, assim como o MIC do consórcio A e B, foram apresentados na Tabela 6 e 7.

**Tabela 6** - MIC de maior frequência nos isolados conforme espécie e a MIC obtida pelo consórcio da Amostra A.

<b>Amostra A</b>					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Achromobacter insolitus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Consórcio A
<b>THPS</b>	500	250	250	500	500
<b>Glutaraldeído</b>	1000	500	500	1000	1000
<b>ADBAC</b>	50	50	25	10	50
<b>MBO</b>	125	125	125	250	250
<b>Bronopol</b>	10	10	10	25	25
<b>DBNPA</b>	25	50	50	125	125

Concentrações em ppm.

**Tabela 7** - MIC de maior frequência nos isolados conforme espécie e a MIC obtida pelo consórcio da Amostra B.

<b>Amostra B</b>				
	<i>Pseudomonas balearica</i>	<i>Enterobacter Cloacae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Consórcio B
<b>THPS</b>	250	1000	500	1000
<b>Glutaraldeído</b>	500	1000	1000	1000
<b>ADBAC</b>	10	10	10	10
<b>MBO</b>	125	250	125	250
<b>Bronopol</b>	10	25	25	25
<b>DBNPA</b>	50	125	250	250

Concentrações em ppm.

### 5.7 Concentração inibitória mínima do biofilme e a concentração mínima de erradicação do biofilme

Os isolados analisados em forma de biofilme apresentaram distintos intervalos de MBIC e MBEC para cada biocida. O MBIC e MBEC mais frequente entre os isolados da mesma espécie, estão apresentados na Tabela 8 e 9, conforme respectiva amostra. Em geral, os resultados foram variáveis, mas o biocida Glutaraldeído apresentou o maior MBIC em todas as análises, enquanto Bronopol e

ADBAC apresentaram a menor MBIC. A concentração de erradicação do biofilme mostrou, em todos os casos, um aumento significativo em relação ao MBIC. Em ambas as amostras, obteve-se um grande aumento do MBIC e MBEC quando submetidas a análise de consórcios (Tabela 8 e 9). Em relação aos consórcios A e B, percebeu-se respostas distintas para os respectivos biocidas.

**Tabela 8** - MBIC e MBEC dos biocidas de maior frequência nos isolados testados conforme espécie da Amostra A e MBIC e MBEC obtida pelo consórcio A.

Amostra A										
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n=3, 36, 39 e 51		<i>Achromobacter denitrificans</i> n=7, 13, 14 e 25		<i>Achromobacter insolitus</i> n=16, 22, 27 e 32		<i>Enterobacter cloacae</i> n=1, 5, 10 e 15		Consórcio A	
	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC
<b>THPS</b>	1000	1500	500	1000	500	1000	1000	>2000	2000	>2000
<b>Glutaraldeído</b>	1500	>2000	1500	2000	1500	>2000	2000	>2000	>2000	-
<b>ADBAC</b>	50	>250	50	250	50	250	50	250	125	>250
<b>MBO</b>	500	1000	250	1000	125	500	250	>1000	1000	>1000
<b>Bronopol</b>	50	>125	125	>125	125	125	50	125	>125	-
<b>DBNPA</b>	250	1000	500	1000	250	500	500	1000	1000	>1000

Concentrações em ppm.

**Tabela 9** - MBIC e MBEC dos biocidas de maior frequência nos isolados testados conforme espécie da Amostra B e MBIC e MBEC obtida pelo consórcio B.

Amostra B									
	<i>Pseudomonas balearica</i> n=2, 5, 9 e 13		<i>Enterobacter cloacae</i> n= 9, 12, 22 e 26		<i>Bacillus cereus</i> n= 7, 8 e 10		Consórcio B		
	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC	MBIC	MBEC	
<b>THPS</b>	500	1000	1000	1500	500	>2000	>2000		-
<b>Glutaraldeído</b>	1500	>2000	2000	>2000	2000	>2000	>2000		-
<b>ADBAC</b>	50	250	50	250	50	250	50		>250
<b>MBO</b>	125	500	250	500	125	500	500		>1000
<b>Bronopol</b>	50	125	50	125	25	125	125		>125
<b>DBNPA</b>	250	500	500	1000	250	1000	1000		>1000

Concentrações em ppm.

## 6 DISCUSSÃO

As espécies identificadas nas respectivas amostras de água produzida de petróleo *offshore* podem estar associadas aos métodos dependentes de cultivo, como o isolamento e a cultura, utilizados neste estudo. Embora essas técnicas forneçam informações relevantes sobre as propriedades fisiológicas e funcionais das bactérias, elas não refletem a real diversidade da comunidade microbiana como em estudos que usam metagenômica para análise da microbiota ou outros métodos independentes de cultivo, já que estes conseguem detectar bactérias não cultiváveis em laboratório (LIU *et al.*, 2022; PANDEY & LAL, 2023). Em geral, Proteobactérias e Firmicutes estão entre os principais filos identificados em métodos de isolamento e cultivo (LIU *et al.*, 2022). Já em estudos baseados em cultura de comunidades de reservatórios de petróleo é esperado encontrar bactérias relacionadas às famílias de Pseudomonaceae e Bacillaceae, como observado nas amostras do presente estudo (SILVA *et al.*, 2013; BATISTA, 2019). Ademais, constatou-se que a diversidade microbiana presente na Amostra A foi ligeiramente maior que aquela encontrada na Amostra B, o que pode estar relacionado ao local de coleta, uma vez que, mesmo pertencendo à mesma bacia petrolífera, as amostras foram obtidas de plataformas e locais distintos e, portanto, possuem características físico-químicas específicas.

Apesar da composição relativamente alta de cloreto de sódio no Caldo Marinho utilizado para o isolamento (19,45 g/L), observou-se ausência de espécies halofílicas, predominando apenas microrganismos halotolerantes (com diferentes graus de tolerância em NaCl). Esse resultado pode estar associado às concentrações típicas de cloreto de sódio encontrado nas respectivas amostras (21.410 e 24.377 mg/L). Halófilos moderados, por exemplo, aqueles presentes nas famílias Halanaerobiaceae e Halobacteroidaceae, requerem concentrações de NaCl entre 30.000 e 200.000 mg/L para crescimento ideal (OREN, 2014).

Além disso, constatou-se a prevalência de espécies aeróbias e somente uma espécie anaeróbia facultativa (*Enterobacter cloacae*). O desenvolvimento de bactérias aeróbias no microbioma da indústria de O&G está fortemente relacionado às atividades antrópicas durante o processo de produção (AN *et al.*, 2013; BRIGGS *et al.*, 2019). Outra hipótese para o desenvolvimento de comunidades aeróbias em

reservatórios de petróleo poderia ser a produção in situ de oxigênio através do metabolismo bacteriano anaeróbio (SILVA *et al.*, 2013).

Em nível de filo, ambas amostras foram dominadas por Proteobactérias (97,3%) com uma única espécie do filo Firmicutes presente na amostra B (*Bacillus cereus*). A prevalência de Proteobacteria é comum na extração e injeção de água produzida, assim como, em amostras da zona de transição óleo-água de campos petrolíferos (SONG *et al.*, 2019; PANNEKENS *et al.*, 2019). Apesar disso, alguns estudos associaram a ocorrência de gêneros como *Achromobacter* e *Enterobacter* apenas após a extração e armazenamento da água produzida (KORENBUM, 2018; SONG *et al.*, 2019). No entanto, o gênero *Achromobacter* foi detectado em outros estudos com amostras de óleo-água de reservatórios petrolíferos brasileiros, sugerindo a disseminação generalizada dessas bactérias em campos de petróleo (VASCONCELLOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). Ainda, observou-se que todas as espécies identificadas neste estudo são recorrentes em amostras de água produzida de campos *offshore* de petróleo, sendo o gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* os mais frequentes (GAO *et al.*, 2016; BATISTA, 2019; KORENBUM, 2018; PANNEKENS *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2019). A espécie *Enterobacter cloacae* é comumente relacionada a água, esgoto e tanques de armazenamento residuais (OLEIWIS, NAJIM & RADIF, 2021; NAJMULDEEN, 2021), portanto, a combinação de rejeitos aquosos em tanques, juntamente com resíduos de limpeza de plataformas, pode ser uma explicação para sua presença na água produzida.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os membros da família de Enterobacteriaceae e Bacillaceae analisados podem produzir ácidos como fonte de carbono e contribuir, moderadamente, no processo de corrosão em cupons de aço carbono 1020. A presença de bactérias produtoras de ácido em água produzida pode favorecer o desenvolvimento de BRS (BOGAN *et al.*, 2004), corroborando ainda mais na intensificação do processo corrosivo de instalações da indústria petrolífera. As BPA podem, ainda, desempenhar um papel significativo no estabelecimento de biofilmes como primeiras colonizadoras (BRIGGS *et al.*, 2019). A análise da taxa de CIM por espécie também revelou que o isolado representante da espécie *Pseudomonas baleriaca* apresentou uma taxa de corrosão significativa. Em um estudo de Salgar-Chaparro (2020), *Pseudomonas baleriaca* foi isolada de aço corroído em uma unidade flutuante de produção e armazenamento de petróleo na Austrália e

associada como uma bactéria oxidante de ferro. Microrganismos oxidantes de ferro obtêm a energia necessária ao seu metabolismo a partir da oxidação do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), resultando na formação de depósitos densos de óxido de ferro que em contato com metais podem favorecer a corrosão sob depósito (LEE *et al.*, 2013; RAY, LEE & LITTLE, 2010).

As cepas submetidas aos efeitos de diferentes biocidas para avaliação da MIC apresentaram respostas específicas a cada biocida. Observou-se em ambas as amostras que a tolerância dos isolados foi superior aos biocidas Glutaraldeído e THPS. Esse dado possivelmente está relacionado a ampla aplicação desses biocidas em sistemas aquosos na indústria petrolífera para controle bacteriológico, o que pode estimular mecanismos de resistência bacteriana e conseqüentemente aumentar a MIC (KAHRILAS *et al.*, 2015). Por outro lado, biocidas como Bronopol e ADBAC, que apresentaram a menor MIC entre os isolados, são empregados em menor parcela na indústria petrolífera (<1% e 3%, respectivamente) (KAHRILAS *et al.*, 2015), corroborando a hipótese de que ainda não há resistência bacteriana contra eles.

Um efeito inibitório significativo foi observado em relação ao biocida MBO, indicando ser uma alternativa promissora para o tratamento da água produzida de petróleo. Apesar de ser reconhecido como um liberador de formol, destaca-se por sua liberação baixa e contínua, garantindo reduzida toxicidade ao ambiente, sendo seu uso, em combustíveis, aprovado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e ANP (EGUCHI, 2007; GROOT *et al.*, 2010; 2012). No entanto, uma investigação mais aprofundada de MBO em AP é recomendável. A eficácia do biocida DBNPA na MIC também foi considerada razoável, mesmo sendo comumente empregado pela indústria petrolífera (KAHRILAS *et al.*, 2015). No entanto, visando a otimização de seus efeitos, sugere-se a utilização de DBNPA em conjunto com outros biocidas.

As variações obtidas de MIC entre espécies refletem diferenças metabólicas e genéticas entre as espécies estudadas. Ainda, evidencia aquelas espécies de maior tolerância aos biocidas, por exemplo, a presença de *Enterobacter cloacae* na Amostra A aumentou a MIC relativa ao consórcio A para o biocida MBO em 2 vezes. Esses dados reforçam a necessidade de tratamentos customizados para cada amostra, já que a atividade antimicrobiana varia consideravelmente entre diferentes tipos de cepas, inclusive da mesma espécie (MAILLARD, 2002; KAUR *et al.*, 2009; ALJOHANI, 2019). Além disso, houve variações, em MBIC, na exposição do

mesmo biocida entre os consórcios A e B, como identificado em THPS (A: 2000 ppm e B: >2000 ppm), CB (A:125 ppm e B:50 ppm), MBO (A:1000 ppm e B: 500 ppm) e Bronopol (A: >125 ppm e B: 125 ppm), demonstrando ainda mais a importância de métodos específicos de controle. Conforme MBEC, todos os biocidas mostraram efeitos bacteriostáticos, exigindo a necessidade de reaplicação após determinado período.

A abundância de cepas classificadas como fortemente aderente (94,6%) quando submetidas a teste de capacidade de formação de biofilme merece certa atenção na indústria petrolífera. Conforme observado neste estudo houve um aumento significativo na concentração inibitória mínima dos isolados analisados em forma de biofilme em ambas as amostras, principalmente quando submetidos a formação de biofilme com múltiplas espécies (consórcio amostral). Diversos mecanismos podem estar envolvidos nesse aumento, como exemplo, tem-se a expressão de bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa* que contribui para a resistência de biofilmes ao biocida Glutaraldeído (VIKRAM, BOMBERGER & BIBBY, 2015) e a expressão de fímbrias curli na formação de biofilme em *Enterobacter cloacae* (KIM *et al.*, 2012). O papel essencial do hidrocarboneto espermidina na formação robusta de biofilmes em *Bacillus sp.* também deve ser considerado (HOBLEY *et al.*, 2017; DUTTA *et al.*, 2023). É necessária uma investigação detalhada para esclarecer todos os mecanismos que induzem a formação de biofilme à exposição de biocidas e conseqüentemente o impulsionamento da resistência bacteriana.

Em geral, os biocidas Bronopol e o ADBAC mostraram ser mais eficientes na eliminação dos isolados tanto de vida livre, como em forma de biofilme, em relação aos outros biocidas investigados. A mesma eficácia observada para esses biocidas neste estudo também foi relatada por Kaur (2009), ao compará-los ao THPS e Glutaraldeído no controle de BRS mistas em amostras de água produzida de um campo petrolífero na Índia, sendo a eliminação total de bactérias redutoras de sulfato alcançada em apenas duas horas de tempo de contato para ambos biocidas. Bronopol também obteve efeitos significativos na prevenção de biofilmes e na inibição de compostos químicos prejudiciais em comunidades bacterianas corrosivas em sistema de água industrial (NARENKUMAR, RAMESH & RAJASEKAR, 2018). Em outros resultados mostrou-se um efeito inibidor desejável do biocida ADBAC na formação da



bioincrustação em sistemas industriais (CHANG, YANG & SHI, 2015). As propriedades específicas presentes em Bronopol e ADBAC também podem contribuir para os resultados encontrados neste estudo. Bronopol reage com grupos sulfidríla, levando ao acúmulo de radicais livres e conseqüentemente à morte celular, por outro lado, o biocida ADBAC afeta a permeabilidade da membrana, inibindo a atividade enzimática e coagulação (MAILLARD, 2002; KAUR *et al.*, 2009). Apesar dos efeitos significativos relatados por ambos os biocidas, é considerável um estudo aprofundado, conforme amostras, sobre o tipo de microrganismo a ser atingido e seus respectivos metabólitos. Contudo, em razão da toxicidade associada a baixos níveis de liberação de formaldeído provenientes do biocida Bronopol (COOMBS *et al.*, 2023; ECHA, 2023), torna-se recomendável realizar modificações na sua molécula a fim de viabilizar sua aplicação no ambiente.

## 7 CONCLUSÃO

Esse estudo revelou a identificação de bactérias halotolerantes em duas amostras de água produzida de campos *offshore* da indústria petrolífera brasileira, assim como, das espécies halotolerantes envolvidas na CIM do aço carbono, enfatizando aquelas produtoras de ácidos. Demonstrou-se, também, a elevada capacidade de aderência dos respectivos isolados.

Através da exposição de bactérias halotolerantes planctônicas e sésseis a diferentes biocidas foi possível observar e comparar a viabilidade/resistência em nível de espécie e consórcios para cada biocida (MIC e MBIC). Entre os biocidas analisados, foi constatado que o Bronopol e ADBAC mostraram ser mais eficientes na eliminação dos isolados, tanto em células livres quanto em biofilmes, sendo preferíveis para controle das respectivas amostras. No entanto, biocidas como Glutaraldeído e THPS parecem não ser tão eficientes em água produzida de petróleo devido à sua ampla aplicabilidade na indústria. Estes resultados podem fornecer uma base para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos adaptados a outras amostras em ambientes similares.

O aumento observado na MBIC reflete uma alta tolerância por parte dos isolados, necessitando, assim, de doses mais elevadas para lidar com as complexidades associadas à formação do biofilme. Por outro lado, as variações substanciais identificadas nas MBIC entre diferentes amostras para um mesmo biocida e as respostas distintas entre espécies enfatizam a essencialidade de abordagens de monitoramento personalizadas.

## 8 REFERÊNCIAS

- Abdel-Shafy H, Mansour MSM, El-ToonY MM. 2020. Integrated treatment for oil free petroleum produced water using novel resin composite followed by microfiltration. *Separation and Purification Technology*, v. 234, p. 116058.
- Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. 2018. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio*, 9(3), 10-1128.
- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. (ANP). *Onshore no Brasil: Construindo novos caminhos*. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/apresentacoes-palestras/2023/arquivos/2023-04-12-tabita-loureiro-ow.pdf>. Acesso em outubro de 2023.
- Alamri AH. 2020. Localized corrosion and mitigation approach of steel materials used in oil and gas pipelines—An overview. *Engineering failure analysis*, v. 116, p. 104735.
- Albuquerque P, Casadevall A. 2012. Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology*, 50(4), 337-345.
- Al-Ghouti MA, Al-Kaabi MA, Ashfaq MY, Da'na DA. 2019. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *Journal of Water Process Engineering*, 28, 222-239.
- Alhede M, Kragh KN, Qvortrup K, Allesen-Holm M, van Gennip M, Christensen LD, Bjarnsholt T. 2011. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PloS one*, 6(11), e27943.
- Ali A, Zahra A, Kamthan M, Husain FM, Albalawi T, Zubair M, Noorani MS. 2023. Microbial biofilms: applications, clinical consequences, and alternative therapies. *Microorganisms*, 11(8), 1934.
- Aljohani, WA. 2019. *Impact of Industrial Biocides on Bacterial Isolates from Hydraulic Fracturing Produced Water* (Doctoral dissertation, Michigan Technological University).
- Al-Kaabi MA, Zouari N, Da'na DA, Al-Ghouti MA. 2021. Adsorptive batch and biological treatments of produced water: recent progresses, challenges, and potentials. *Journal of Environmental Management*, 290, 112527.
- Almada LP, Parente V. 2013. Oil & Gas industry in Brazil: A brief history and legal framework. *Panorama of Brazilian Law*, 1(1), 223-252.
- Amjad Z. 2010. *The Science and Technology of Industrial Water Treatment*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- An D, Caffrey SM, Soh J, Agrawal A, Brown D, Budwill K, ..., Voordouw G. 2013. Metagenomics of hydrocarbon resource environments indicates aerobic taxa and genes to be unexpectedly common. *Environmental science & technology*, 47(18), 10708-10717.

An YH, Dickinson RB, Doyle RJ. 2000. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. In Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications (pp. 1-27). Totowa, NJ: Humana Press.

Anderson GG, O'toole GA. 2008. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Bacterial biofilms*, p. 85-105.

Araújo P, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. 2011. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 3, 826-834.

Armes AC, Walton JL, Buchan A. 2022. Quorum Sensing and Antimicrobial Production Orchestrate Biofilm Dynamics in Multispecies Bacterial Communities. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02615-22.

Assunção M, Almeida MR, Vieira M. 2020. The environmental dynamic efficiency of onshore oil fields located at the Brazilian coastal basin.

ASTM G31-12 - Standard guide for laboratory immersion corrosion testing of metals.

Atagana HI. 1996. Microbiological profile of crude oil in storage tanks. *Environmental monitoring and assessment*, v. 41, p. 301-308.

Bader MSH. 2007. Seawater versus produced water in oil-fields water injection operations. *Desalination*, v. 208, n. 1-3, p. 159-168.

Barros AC, Melo LF, Pereira A. 2022. A multi-purpose approach to the mechanisms of action of two biocides (Benzalkonium chloride and Dibromonitrilopropionamide): discussion of *Pseudomonas fluorescens*' viability and death. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 842414.

Batista LLF. 2019. Avaliação de substâncias naturais e bioprodutos microbianos com potencial antagonista às bactérias redutoras de sulfato. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, BH.

Beech IB, Sunner J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current opinion in Biotechnology*, 15(3), 181-186.

Belyakova EV, Rozanova EP, Borzenkov IA, Tourova TP, Pusheva MA, Lysenko AM, Kolganova TV. 2006. The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil field. *Microbiology*, 75, 161-171.

Beyer J, Goksøyr A, Hjermmann DØ, Klungsøyr J. 2020. Environmental effects of offshore produced water discharges: A review focused on the Norwegian continental shelf. *Marine environmental research*, 162, 105155.

Birkeland NK. 2004. The microbial diversity of deep subsurface oil reservoirs. *Studies in surface science and catalysis*, 151, 385-403.

Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.

Brasil. Resolução CONAMA Nº 393 de 2007. Diário Oficial da União- Brasília. Data da legislação: 08/08/2007 - Publicação DOU nº 153, de 09/08/2007, pág. 72-73.

Brasil. Resolução CONAMA Nº 430 de 2011. Diário Oficial da União- Brasília.

Briggs WF, Stanley HO, Okpokwasili GC, Immanuel OM, Ugboma CJ. 2019. Isolation and molecular characterization of acid producing bacteria from selected oilfield environments within the Niger Delta. *Journal of Advances in Microbiology*, 17(3), 1-9.

Bogan BW, Lamb BM, Husmillo G, Lowe K, Paterek JR, Kilbane II, John J. 2004. Development of an environmentally benign microbial inhibitor to control internal pipeline corrosion. Gas Technology Institute (US).

Brodl E, Winkler A, Macheroux P. 2018. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Computational and structural biotechnology journal*, 16, 551-564.

Bücker F. 2015. Caracterização molecular, biodegradação e controle de biofilmes formados durante o armazenamento simulado de misturas de diesel e biodiesel. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Busse HJ, Stolz A. 2006. *Achromobacter*, *Alcaligenes* and related genera. *The prokaryotes*, p. 675-700.

Cabral RC., Santos DF. 2019. Estudo das principais técnicas para o tratamento de água produzida de petróleo. Uma análise das principais metodologias utilizadas em campo. *Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT-ALAGOAS*, 5(2), 175.

Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. 2021. Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(04), 2014.

Cavalcanti GH. Efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas da Petrobras. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2001.

Chang SY, Yang QP, Shi L. 2015. Experimental research on biofouling inhibition of benzalkonium chloride. 36. 2441-2444

Characklis WG. 1973. Attached microbial growths—I. Attachment and growth. *Water Research*, v. 7, n. 8, p. 1113-1127.

Characklis WG. McFeters, Marshall KC. 1990. *Physiological ecology in biofilm systems*. John Wiley & Sons, Inc. p 195-230.

Chattopadhyay I, Usman TM, Varjani S. 2022. Exploring the role of microbial biofilm for industrial effluents treatment. *Bioengineered*, v. 13, n. 3, p. 6420-6440.

Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. 2022. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 621-635.

Coombs K, Rodriguez-Quijada C, Clevenger JO, Sauer-Budge AF. 2023. Current understanding of potential linkages between biocide tolerance and antibiotic cross-resistance. *Microorganisms*, 11(8), 2000.

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, v. 238, n. 1, p. 86-95.

Crispim TS, Tamiasso-Martinhon P, Teixeira JMS, Sousa C, Sanches AR. 2019. BREVE REVISÃO SOBRE ÁGUA PRODUZIDA, 16º Congresso Nacional do Meio Ambiente Justiça social e sustentabilidade, Química Ambiental, Poços de Caldas - MG - Brasil ISSN on-line Nº 2317-9686.

Dahle H, Garshol F, Madsen M, Birkeland NK. 2008. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93, 37-49.

Davidova IA, Duncan KE, Perez-Ibarra, BM, Suflita JM. 2012. Involvement of thermophilic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Environmental microbiology*, 14(7), 1762-1771.

De Beer D, Stoodley P. 2006. Microbial biofilms. *Prokaryotes*, v. 1, p. 904-937.

Dos Santos JC, Lopes DRG, Silva LCF, Ramos JLL, Dias RS, Lima HS, ..., da Silva CC. 2022. Characterization of the biofilm structure and microbial diversity of sulfate-reducing bacteria from petroleum produced water supplemented by different carbon sources. *Journal of Environmental Management*, 304, 114189.

Dudek M, Vik EA, Aanesen SV, Øye G. 2020. Colloid chemistry and experimental techniques for understanding fundamental behaviour of produced water in oil and gas production. *Advances in Colloid and Interface Science*, 276, 102105.

Dutta B, Halder U, Chitikineni A, Varshney RK, Bandopadhyay R. 2023. Delving into the lifestyle of Sundarban Wetland resident, biofilm producing, halotolerant *Salinicoccus roseus*: a comparative genomics-based intervention. *BMC genomics*, 24(1), 681.

Echchelh A, Hess T, Sakrabani R. 2018. Reusing oil and gas produced water for irrigation of food crops in drylands. *Agricultural Water Management*, 206, 124-134.

Eckford RE, Fedorak PM. 2002. Chemical and microbiological changes in laboratory incubations of nitrate amendment "sour" produced waters from three western Canadian oil fields. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 243-254.

Edbeib MF, Wahab RA, Huyop F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 1-23.

Eguchi JY. 2007. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. *Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*, São Paulo, 22, 35-39, 2007. Disponível em: [http://www.sbcc.com.br/sumario\\_22.htm](http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm). Acesso em novembro, 2011.

Elumalai P, Parthipan P, AlSalhi MS, Huang M, Devanesan S, Karthikeyan OP, ... Rajasekar A. 2021. Characterization of crude oil degrading bacterial communities and their impact on biofilm formation. *Environmental Pollution*, 286, 117556.

European Chemicals Agency (ECHA). Investigation Report Formaldehyde and Formaldehyde Releasers. Available online: [https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/annex\\_xv\\_report\\_formaldehyde\\_en.pdf/58be2f0a-7ca7-264d-a594-da5051a1c74b](https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/annex_xv_report_formaldehyde_en.pdf/58be2f0a-7ca7-264d-a594-da5051a1c74b) (accessed on 18 July 2023).

Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, ... Wuertz S. 2023. The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 70-86.

Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623-633.

Gao P, Tian H, Wang Y, Li Y, Li Y, Xie J, ... Ma T. 2016. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China. *Scientific Reports*, 6(1), 20174.

Gardner LR, Stewart PS. 2002. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 354-360.

Gentil V. 2007. *Corrosão. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 5ªed.* Rio de Janeiro, RJ.

Ghosh D, Seth M, Mondal P, Mukhopadhyay SK. 2022. Bacterial biofilms: role of quorum sensing and quorum quenching. *J Exp Biol Agric Sci* 10:278–293.

Ghosh S, Bagchi A. 2015. Intermolecular interaction study of dissimilatory sulfite reductase (DsrAB) from sulfur oxidizing proteobacteria *Allchromatium vinosum*. In: *Information Systems Design and Intelligent Applications: Proceedings of Second International Conference INDIA 2015, Volume 2.* Springer India. p. 19-27.

Gizer G, Önal U, Ram M, Şahiner N. 2023. Biofouling and mitigation methods: A review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(2).

Gormley K, McLellan F, McCabe C, Hinton C, Ferris J, Kline DI, Scott BE. 2018. Automated image analysis of offshore infrastructure marine biofouling. *Journal of Marine Science and Engineering*, 6(1), 2.

Goudarzi M, Navidinia M. 2019. Overview perspective of bacterial strategies of resistance to biocides and antibiotics. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, v. 14, n. 2.

Groot A, Geier J, Flyvholm MA, Lensen G, Coenraads PJ. 2010. Formaldehyde+releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. *Metalworking fluids and remainder. Part 1. Contact Dermatitis*, 63:117-128. DOI: 10.1111/j.1600+0536.2010.01714.

Groot AC. M.D. Flyvholm MA. 2012. Formaldehyde and Formaldehyde-Releasers Kanerva's Occupational Dermatology, pp 397-413.

Guerra K, Dahm K, Dundorf S. 2011. Oil and Gas Produced Water Management and Beneficial Use in the Western United States. Science and Technology Program.

Gupta S, Sharma P, Dev P, Sourirajan A. 2015. Halophilic Bacteria of Lunsu Produce an Array of Industrially Important Enzymes with Salt Tolerant Activity.

Hobley L, Li B, Wood JL, Kim SH, Naidoo J, Ferreira AS., ... Michael AJ. 2017. Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator *slrR*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(29), 12041-12053.

Hollanda LR, Santos SBF, Faustino JGAA, Dotto GL, Foletto EL, Chiavone-Filho O. 2021. Oil field-produced water treatment: characterization, photochemical systems, and combined processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(38), 52744-52763.

Ibanez A, A. L., Zafra, O., & González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Frontiers in microbiology*, 8, 1390.

Ibrahim AEL. 2023. Environmental Management of Offshore Crude Oil and Natural Gas Exploration and Production Activities.

Inat G, Sırıken B, Başkan C, Erol İ, Yıldırım T, Çiftci A. 2021. Quorum sensing systems and related virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chicken meat and ground beef. *Scientific Reports*, 11(1), 15639.

Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás (IBP). 2023. Panorama Geral Do Setor De Petróleo E Gás: Uma Agenda Para O Futuro.\_panorama-geral-do-setor-og-22-03-2023-web.pdf (ibp.org.br).

Israel E, Ramganes S, Abia ALK, Chikere CB. 2023. Quorum Sensing: Unravelling the Intricacies of Microbial Communication for Biofilm Formation, Biogeochemical Cycling, and Biotechnological Applications. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(8), 1586.

Jenneman GE, De León KB. 2022. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 169, 105385.

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

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



Joshi C, Kothari V, Patel P. 2016. Importance of selecting appropriate wavelength, while quantifying growth and production of quorum sensing regulated pigments in bacteria. *Recent Patents on Biotechnology*, 10(2), 145-152.

Judd S, Qiblawey H, Al-Marri M, Clarkin C, Watson S, Ahmed A, Bach S. 2014. The size and performance of offshore produced water oil-removal technologies for reinjection. *Separation and purification technology*, 134, 241-246.

Kadnikov VV, Ravin NV, Sokolova DS, Semenova EM, Bidzhieva SK, Beletsky AV., ... Nazina TN. 2023. Metagenomic and Culture-Based Analyses of Microbial Communities from Petroleum Reservoirs with High-Salinity Formation Water, and Their Biotechnological Potential. *Biology*, 12(10), 1300.

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

Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. 2020. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in microbiology*, 28(8), 668-681.

Kaur G, Mandal AK, Nihlani MC, Lal B. 2009. Control of sulfidogenic bacteria in produced water from the Kathloni oilfield in northeast India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(2), 151-155.

Khan MA, Hussain M, Djavanroodi F. 2021. Microbiologically influenced corrosion in oil and gas industries: A review. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, v. 10, n. 1, p. 80-106.

Khan MM, Ali A, Kolenda R, Olowe OA, Weinreich J, Li G, Schierack P. 2023b. The role of AJB35136 and fdtA genes in biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 126.

Khan MS, Yang K, Liu Z, Zhou L, Liu W, Lin S, ..., Shang C. 2023a. Microorganisms Involved in the Biodegradation and Microbiological Corrosion of Structural Materials. *Coatings*, 13(10), 1683.

Khatib Z, Verbeek P. 2003. Water to value—produced water management for sustainable field development of mature and green fields. In: *SPE International Conference and Exhibition on Health, Safety, Environment, and Sustainability*. SPE. p. SPE-73853.

Khorram AG, Fallah N, Nasernejad B, Afsham N, Esmaelzadeh M, Vatanpour V. 2023. Electrochemical-based processes for produced water and oily wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 139565.

Kim SM, Lee HW, Choi YW, Kim SH, Lee JC, Lee YC, ... Kim J. 2012. Involvement of curli fimbriae in the biofilm formation of *Enterobacter cloacae*. *The Journal of Microbiology*, 50, 175-178.

Kniesz J, Eckert R, Gieg LM, Koerdt A, Lee JS, Silva ER, ... & Wade SA. 2023. Microbiologically influenced corrosion—more than just microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(5), fuad041.

Korenblum E. 2018. Estrutura da Comunidade Bacteriana Presente em Sistemas de Produção de Petróleo. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências- Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

Lee JS, McBeth JM, Ray RI, Little BJ, Emerson D. 2013. Iron cycling at corroding carbon steel surfaces. *Biofouling* 29:1243–1210. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.836184>.

Levkovich SA, Gazit E, Bar-Yosef DL. 2021. Two decades of studying functional amyloids in microorganisms. *Trends in Microbiology*, 29(3), 251-265.

Li L, Lee R. 2009. Purification of produced water by ceramic membranes: material screening, process design and economics. *Separation Science and Technology*, v. 44, n. 15, p. 3455-3484.

Li Y, Xu D, Chen C, Li X, Jia R, Zhang D, ... & Gu T. 2018. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: a review. *Journal of Materials Science & Technology*, 34(10), 1713-1718.

Liang R, Grizzle RS, Duncan KE, McInerney MJ, Suflita JM. 2014. Roles of thermophilic thiosulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Frontiers in microbiology*, 5, 89.

Liu S, Moon CD, Zheng N, Huws S, Zhao S, Wang J. 2022. Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation. *Microbiome*, 10(1), 76.

Liu T, Cheng YF, Sharma M, Voordouw G. 2017. Effect of fluid flow on biofilm formation and microbiologically influenced corrosion of pipelines in oilfield produced water. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 156, 451-459.

Liu Y, Lu H, Li Y, Xu H, Pan Z, Dai P, ... , Yang Q. 2021. A review of treatment technologies for produced water in offshore oil and gas fields. *Science of the Total Environment*, 775, 145485.

Ludensky M. 2003. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeterioration & Biodeterioration*, 51: 255-263.

Magot M, Ollivier B, Patel BKC. 2000. "Microbiology of petroleum reservoirs." *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 103-116.

Mah TFC, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.

Maillard JY, 2002. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of applied microbiology*, v. 92, n. s1, p. 16S-27S, 2002.

Maillard JY, PASCOE Michael. 2023. Disinfectants and antiseptics: mechanisms of action and resistance. *Nature Reviews Microbiology*, p. 1-14.

Maillard JY. 2018. Resistance of bacteria to biocides. *Microbiology spectrum*, 6(2), 6-2.

Menoita E, Santos V, Testas C, Gomes C, Santos A. 2012. Biofilms: knowing the entity. *Journal of aging & innovation*. 1(2): 23-32.

Mohd Noor MAM. 2021. Environmental impacts of the oil industry: An overview of the impacts and source management. *Environmental Management*. <https://doi.org/10.30880/eeee.0000.00.00.000>.

Morton LHG, Greenway DLA, Gaylarde CC, Surman SB. 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3-4), 247-259.

Mosquera S, Ivey M, Chevrier VF. 2023. Detection of *dsrAB* operon expression in *Desulfotalea psychrophila* cells subjected to simulated Martian conditions of temperature and regolith's sulphate minerals composition. *International Journal of Astrobiology*, 22(6), 641-662.

Možina S, Klančnik A, Raspor P. 2013. Mechanisms of microbial resistance in biofilms. *Biofilms in Bioengineering*, v. 1, p. 311-332.

Muhsin J, Ufaq T, Tahir H, Saadia A. 2015. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *J Microbiol Biotechnol*, 4, 1-14.

NACE RP-07-75(2013). Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations.

NACE TM0169/G31. Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals.

Nagiub A, Mansfeld F. 2002. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibitor (MICI) with EIS and ENA. *Electrochimica Acta*, v. 47, p. 2319- 2333.

Najmuldeen HHR. 2021. Assessment of Chlorine Resistance *Enterobacter cloacae* Isolated from Water Storage Tanks in Sulaimaniyah City-Iraq. *Passer Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(1), 87-94.

Narenkumar J, Ramesh N, Rajasekar A. 2018. Control of corrosive bacterial community by bronopol in industrial water system. *3 Biotech*, 8, 1-13.

Nguyen H, Ybarra A, Başağaoğlu H, Shindell O. 2021. Biofilm viscoelasticity and nutrient source location control biofilm growth rate, migration rate, and morphology in shear flow. *Scientific Reports*, 11(1), 16118.

Nourbakhsh F, Nasrollahzadeh MS, Tajani AS, Soheili V, Hadizadeh F. 2022. Bacterial biofilms and their resistance mechanisms: A brief look at treatment with natural agents. *Folia Microbiologica*, 67(4), 535-554.

Ojo S, Othman MHD, Kamaludin R, Sinsamphanh O, Abdullah H, Puteh M H, ..., Mamah SC. 2022. Oilfield-produced water treatment using conventional and membrane-based technologies for beneficial reuse: A critical review. *Journal of Environmental Management*, 308, 114556.

Okoro CC, Oluseye A, Michael I. 2017. Microbial community structures of an offshore and near-shore oil production facilities after biocide treatment and the potential to induce souring and corrosion. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 5, p. 171-184.

Oleiwis SR, Najim SS, Radif HM. 2021. Morphological and Molecular Study of Biofilm Formation by *Enterobacter cloacae*. *Ann Trop Med Public Health*, 24, 176-86.

Oren A. 2006. Life at high salt concentrations. *The prokaryotes*, v. 3, p. 263-282, 2006. *LIVRO Prokaryotes*. 2:263–282 DOI: 10.1007/0-387-30742-7\_9.

Oren A. 2013. Life at High Salt Concentrations. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thomson F (ed) *Prokaryotes—Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, 4th edn. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 421–440.

Oren, A. 2014. The order Halanaerobiales, and the families Halanaerobiaceae and Halobacteroidaceae. *The prokaryotes: Firmicutes and tenericutes*, 153-177.

Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP). Relatório 2022-2045. *World Oil Outlook*. Organization of the Petroleum Exporting Countries. Disponível em: [https://www.opec.org/opec\\_web/en/](https://www.opec.org/opec_web/en/) Acesso em outubro de 2023.

Pandey H, Lal D. 2023. Exploring Bacterial Diversity: How Far Have We Reached. *Advancements of Microbiology*, 62(3-4), 117-131.

Pannekens M, Kroll L, Müller H, Mbow FT, Meckenstock RU. 2019. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *New Biotechnology*, 49, 1-9.

Pati SG, Arnold WA. 2020. Triagem abrangente de surfactantes de amônio quaternário e líquidos iônicos em efluentes de águas residuais e sedimentos de lagos. *Impactos do processo Environ Sci* 22, 430–441. doi: 10.1039/C9EM00554D.

Paulus W. 2005. *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook*. Springer Science & Business Media.

Pereira GF, De Lima GER, Da Silva RC, Corção G, Wolf CR. 2020. Microbiome compositions and resistance to biocides in Brazilian produced water. DOI: 10.48072/2525-7579.rog.2020.192.

Pereira GF, Pilz-Junior HL, Corção G. 2021. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. *Scientific Reports*, 11(1), 23027.

Pereira GF. 2023. Avaliação da utilização de biocidas no tratamento de água produzida na indústria de petróleo e seu impacto na resistência bacteriana. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – UFRGS, Porto Alegre, RS.

Peres FS, Teixeira AC, Yokoyama L, Campos JC, Miguel ML. 2008. Tratamento de águas de refrigeração com peróxido de hidrogênio. *Química Nova*, Vol. 31, p1851-1855.

Petrobras. 2022. Relatório de Sustentabilidade. 2022. Disponível em: <https://sustentabilidade.petrobras.com.br>. Acesso em outubro de 2023.

Petrobras. 2023a. Sobre a Petrobras | Portal de Transparência | Petrobras. Disponível em: <https://transparencia.petrobras.com.br/institucional/sobre-petrobras>. Acesso em outubro de 2023.

Petrobras. 2023b. Monitoramento de Água Produzida. Monitoramento de Água Produzida | Comunica Bacia de Santos | Petrobras. Disponível em: <https://comunicabaciadesantos.petrobras.com.br/monitoramento-de-agua-produzida>. Acesso em outubro de 2023.

Piceno YM, Reid FC, Tom LM, Conrad ME, Bill M, Hubbard CG, ..., Andersen GL. 2014. Temperature and injection water source influence microbial community structure in four Alaskan North Slope hydrocarbon reservoirs. *Frontiers in microbiology*, 5, 409.

Pintor AM, Vilar VJ, Botelho CM, Boaventura RA. 2016. Oil and grease removal from wastewaters: sorption treatment as an alternative to state-of-the-art technologies. A critical review. *Chemical Engineering Journal*, 297, 229-255.

Preda VG, Săndulescu O. 2019. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, v. 7, n. 3.

Prest EI, Hammes F, Van Loosdrecht MC, Vrouwenvelder JS. 2016. Biological stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in microbiology*, 7, 45.

Rather MA, Gupta K, Mandal M. 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1-18, 2021.

Ray RI, Lee JS, Little BJ. 2010. Iron-oxidizing bacteria: a review of corrosion mechanisms in fresh water and marine environments. Abstr. Corrosion, Conference and Expo, NACE International, San Antonio, TX.

Rodis N, Tsapadikou VK, Potsios C, Xaplanteri P. 2020. Resistance mechanisms in bacterial biofilm formations: A review. *J. Emerg. Intern. Med*, 4, 30.

Saeki EK, Farhat LP, Pontes EA. 2015. Efficiency of cryoprotectants glycerol and skimmed milk for microorganisms freezing. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2015 Vol.9 No.2 pp.195-198.

Salgar-Chaparro SJ, Castillo-Villamizar G, Poehlein A, Daniel R, Machuca LL. 2020. Complete genome sequence of *Pseudomonas balearica* strain EC28, an iron-oxidizing bacterium isolated from corroded steel. *Microbiology Resource Announcements*, 9(19), 10-1128.

Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, Bjarnsholt T. 2022. The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.

Serra DO, Hengge R. 2019. in *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices. Biologically-Inspired Systems Vol. 12* (eds Cohen, E. & Merzendorfer, H.) 355–392 (Springer).

Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Aalinkeel R. 2023. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614.

Shi X, Zhang R, Sand W, Mathivanan K, Zhang Y, Wang N, ... , Hou B. 2023. Comprehensive Review on the Use of Biocides in Microbiologically Influenced Corrosion. *Microorganisms*, 11(9), 2194.

Siegert W. (2009). Microbial contamination in diesel fuel—are new problems arising from biodiesel blends. In *Proceedings of the 11th international conference on the stability and handling of liquid fuels* (pp. 18-22).

Silva TR, Verde LCL, Neto ES, Oliveira VM. 2013. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 57-70.

Skovhus TI, Eckert RB, Rodrigues E. 2017. Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—Overview and a North Sea case study. *Journal of biotechnology*, v. 256, p. 31-45, 2017.

Sobolciak P, Popelka A, Tanvir A, Al-Maadeed MA, Adham S, Krupa I. 2020. Materials and technologies for the tertiary treatment of produced water contaminated by oil impurities through nonfibrous deep-bed media: A review. *Water*, 12(12), 3419.

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. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 176, 1198-1207.

Srivastava S, Bhargava A. 2016. Biofilms and human health. *Biotechnology letters*, v. 38, p. 1-22.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, 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(8), 891-899.

Takai K, Hirayama H, Nakagawa T, Suzuki Y, Nealson KH, Horikoshi K. 2004. *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6), 2325-2333.

Telegdi J, Shaban A, Trif L. 2020. Review on the microbiologically influenced corrosion and the function of biofilms. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 9(1), 1-33.

Tian Y, Xue S, Yanling MA. 2020. Comparative analysis of bacterial community and functional species in oil reservoirs with different in situ temperatures. *International Microbiology*, v. 23, p. 557-563.

Torbaghan ME, Torghabeh GHK. 2019. Biological removal of iron and sulfate from synthetic wastewater of cotton delinting factory by using halophilic sulfate-reducing bacteria. *Heliyon*, v. 5, n. 12.

Torres L, Yadav OP, Khan E. 2016. A review on risk assessment techniques for hydraulic fracturing water and produced water management implemented in onshore unconventional oil and gas production. *Science of the Total Environment*, v. 539, p. 478-493.

Turkiewicz A, Brzeszcz J, Kapusta P. 2013. The application of biocides in the oil and gas industry. *Nafta-Gaz*, 69(2), 103-11.

Van Gerven N, Van der Verren SE, Reiter DM, Remaut H. 2018. The role of functional amyloids in bacterial virulence. *Journal of molecular biology*, 430(20), 3657-3684.

Van Gestel J, Bareia T, Tenennbaum B, Dal Co A, Guler P, Aframian N, ..., Eldar A. 2021. Short-range quorum sensing controls horizontal gene transfer at micron scale in bacterial communities. *Nature communications*, 12(1), 2324.

Varjani SJ, Gnansounou E. 2017. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresource technology*, v. 245, p. 1258-1265.

Vasconcellos SP, Crespim E, da Cruz GF, Senatore DB, Simioni KCM, dos Santos Neto, EV, ... de Oliveira VM. 2009. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, 40(5), 574-588.

Vaz S, Lall M. 2021. Potential public health impact of the development of antimicrobial resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* on repeated exposure to biocides In vitro. *Medical Journal of Dr. DY Patil University*, 14(1), 45-50.

Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. 2014. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 228(10), 1083-1099.

Vieira DS, Cammarota MC, Camporese EFS. 2003. Redução de contaminantes presentes na água de produção de petróleo. In 2º Congresso Brasileiro de P&G em Petróleo & Gás.

- Vigneron A, Alsop EB, Chambers B, Lomans BP, Head IM, Tsesmetzis N. 2016. Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility. *Applied and environmental microbiology*, 82(8), 2545-2554.
- Vikram A, Bomberger JM, Bibby KJ. 2015. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3433-3440.
- Vogel N, Beltrame TF. 2022. Tratamento de cátions sódio e potássio presentes em água produzida de petróleo sintética: uso de eletrodialise. *Águas Subterrâneas*, 36(2).
- Wang D, Bai L, Li S, Yan W. 2022. Similarities and Differences in Quorum Sensing-Controlled Bioluminescence between *Photobacterium phosphoreum* T3 and *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67. *Applied Sciences*, 12(4), 2066.
- Wang R, Bono JL, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay DM. 2012. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *Journal of food protection*, 75(8), 1418-1428.
- Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. 2013. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), 107-112.
- Xu D, Li Y, Gu T. 2016. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. *Bioelectrochemistry*, v. 110, p. 52-58.
- Yemashova NA, Murygina VP, Zhukov DV, Zakharyantz AA, Gladchenko MA, Appanna V, Kalyuzhnyi SV. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6, 315-337.
- Yin B, Yang J, Bertheas U, Takahashi DF. 2008. 'High throughput': new technique to evaluation of biocides for biofouling control in oil fields;'High throughput': nova tecnologia para avaliação da eficácia de biocidas no controle de biofilme na indústria do petróleo.
- Youssef N, Elshahed MS, Mcinerney MJ. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities. *Advances in applied microbiology*, v. 66, p. 141-251, 2009.
- ZHANG F, CHENG W. 2022. The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*, v. 11, n. 9, p. 1215.
- Zhang Y, Yu Z, Zhang H, Thompson IP. 2017. Microbial distribution and variation in produced water from separators to storage tanks of shale gas wells in Sichuan Basin, China. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 3(2), 340-351.
- Zheng J, Chen B, Thanyamanta W, Hawboldt K, Zhang B, Liu B. 2016. Offshore produced water management: A review of current practice and challenges in harsh/Arctic environments. *Marine pollution bulletin*, 104(1-2), 7-19.



Zimmer AR, Oliboni A, Viscardi SL, Teixeira RM, Ferrão MF, Bento FM. 2017. Biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive (biocide) under simulated stored conditions: a field and lab scale monitoring. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 627-636.

Zulkifliani Z. 2017. Biocide Screening Test To Produce Water Reinjection In The "X Oil Field". *Scientific Contributions Oil and Gas*, v. 40, n. 3, p. 155-162.

**APÊNDICE A****Dados complementares das amostras.**

Amostra	Teor de cloreto	Turbidez	pH
A	21.410 mg/L	63,8 NTU	7,6
B	24.377 mg/L	4,64 NTU	5,2

**APÊNDICE B****Contagem da concentração microbiana em PCA.**

Diluição	Amostra A (UFC/mL)	Amostra B (UFC/mL)
$10^{-1}$	$1,97 \times 10^4$	$>10^5$
$10^{-2}$	$1,5 \times 10^4$	$1,81 \times 10^5$
$10^{-3}$	$1,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$
$10^{-4}$	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$

**APÊNDICE C****Composição do meio de cultura Caldo Vermelho Fenol.**

Componente	Concentração
Peptona	10 g/L
Extrato de carne	3 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L
Vermelho fenol	0,018 g/L
Glicose	5 g/L

## APÊNDICE D

**Cepas utilizadas para as análises do consórcio MIC e análises MBIC e MBEC.**

Amostra	Espécie	Número da cepa
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3, 36, 39 e 51
	<i>Achromobacter denitrificans</i>	7, 13, 14 e 25
	<i>Achromobacter insolitus</i>	16, 22, 27 e 32
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1, 5, 10 e 15
B	<i>Stutzerimonas balearica</i>	2, 5, 9 e 13
	<i>Bacillus cereus</i>	7, 8 e 10
	<i>Enterobacter cloacae</i>	9, 12, 22 e 26

**ANEXO A****Composição do meio de cultura Marine Broth 2216 - Sigma Aldrich.**

Componente	Concentração
Nitrato de amônio	1,6 mg/L
Ácido bórico	22,0 mg/L
Cloreto de cálcio	1,8 mg/L
Fosfato dissódico	8,0 mg/L
Citrato férrico	0,1 g/L
Cloreto de magnésio	5,9 g/L
Sulfato de magnésio	3,24 g/L
Peptona	5,0 g/L
Brometo de potássio	0,08 g/L
Cloreto de potássio	0,55 g/L
Bicarbonato de sódio	0,16 g/L
Cloreto de sódio	19,45 g/L
Fluoreto de sódio	2,4 mg/L
Silicato de sódio	4,0 mg/L
Cloreto de estrôncio	34,0 mg/L
Extrato de levedura	1,0 g/L