



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZ HENRIQUE FONSECA DOS SANTOS

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DE
MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE RESERVATÓRIOS DE
PETRÓLEO *OFFSHORE* BRASILEIROS SUBMETIDAS À ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

VITÓRIA, ES

2021

LUIZ HENRIQUE FONSECA DOS SANTOS

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DE
MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE RESERVATÓRIOS DE
PETRÓLEO *OFFSHORE* BRASILEIROS SUBMETIDOS À ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos.

VITÓRIA, ES

2021

(Folha de Rosto Verso)

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFES, após a conclusão das correções sugeridas pela banca examinadora

LUIZ HENRIQUE FONSECA DOS SANTOS

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DE
MICRORGANISMOS PROVENIENTES DE RESERVATÓRIO DE
PETRÓLEO *OFFSHORE* BRASILEIROS SUBMETIDOS À ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em dia 14 de dezembro de 2021.

**Prof. Dr^a. Patricia Machado Bueno
Fernandes**
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

**Prof. Dr. Alexandre Martins Costa
Santos**
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador

**Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro
Fernandes**
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Ramón Alberto Batista-García
Universidade Autónoma do Estado de
Morelos: Cuernavaca, Morelos, México

Prof. Dr. Silas Pessini Rodrigues
Universidade Federal do Rio de Janeiro

VITÓRIA, ES

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo por ter disponibilizado a infraestrutura e recursos necessários para a elaboração e concretização desse trabalho.

A ANP/Petrobras pelo financiamento desse projeto. As agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPES pelos auxílios financeiros para infraestrutura do LBAA.

À Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes, minha orientadora, pela oportunidade, apoio e ensinamentos que foram importantes nesta etapa acadêmica.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos, por todos os ensinamentos e colaboração no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Antonio Alberto R. Fernandes, coordenador do projeto, pelos ensinamentos e por ter tornado possível o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Elisângela Flavia Pimentel por todos os ensinamentos e pela paciência em repassar os seus conhecimentos.

A todos os amigos do LBAA, em especial a Luiza Favarato, pela amizade e disponibilidade em ajudar em todas as etapas desta dissertação. A Ane, Mirielson, Raissa, Luiza Adami, Isabella, Joellington, Werverton, Raquel e Júlia Gonçalves por toda a amizade e apoio nos momentos de dificuldade. A Oeber, Tatiana, Marlone, Monique, Marybel, Júlia Merchán, Whallef, Luiza Pope, Ana Maria, Nicole, Ana Lídia e Carlos, pela companhia no dia a dia.

Ao Prof. Dr. Ramón Alberto Batista García por aceitar participar da banca e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Dr. Rubens Nobumoto Akamine e Dr. Daniel Alberton Haas, do Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello - CENPES/PETROBRAS, por ter cedido as amostras e discussões no decorrer desse estudo.

Ao Laboratório Multiusuário de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR/UFES no qual realizei as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao meu esposo Anderson, pelo carinho, compreensão e apoio durante esses dois anos de mestrado.

Aos meus pais Valcira e Mário que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos. Aos meus irmãos Rose, Mayra, Thiago e Matheus pelo carinho, amizade e apoio.

A todas as pessoas, que por ventura não tenham sido aqui citadas, e tenham direta ou indiretamente, contribuído para a concretização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"Todo progresso ocorre fora da zona de conforto". (Michael John Bobak)

RESUMO

SANTOS, L.H.F. **Comportamento fisiológico e morfológico de microrganismos provenientes de reservatórios de petróleo offshore brasileiros submetidos à alta pressão hidrostática.** 2021. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A aplicação de água do mar para recuperação secundária de óleo estimula o desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato nos campos de petróleo, levando à corrosão microbiana de equipamentos de aço e a acidificação do óleo. A fim de avaliar o efeito da alta pressão hidrostática no crescimento, atividade redutora de sulfato e na ultraestrutura desses microrganismos, foram utilizadas duas culturas mistas, provenientes de reservatórios *offshore* da costa brasileira, sendo uma de água de injeção coletada a 100 m de profundidade (BTB0119) e a outra de água de produção, à 3.060 m (BTB0419), e uma cultura pura de *Desulfovibrio alaskensis*. As amostras foram caracterizadas morfolologicamente utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura e sua complexidade e tamanho por Citometria de Fluxo. As culturas foram submetidas a dois piezo-tratamentos: 35 e 65 MPa por 20 horas seguido de 28 dias à 0,1 MPa e 35 e 65 MPa por 28 dias. A espectroscopia na luz visível e o método de avaliação “Número Mais Provável” foram utilizados para a medida da concentração das bactérias. Observou-se que os valores das concentrações de bactérias obtidas utilizando a espectroscopia ótica foram mais precisas e realista do que as obtidas utilizando a metodologia de número mais provável. Foi observado também que a pressão ambiente o perfil de crescimento da cultura pura foi similar ao da BTB0419 e diferente da BTB0119. As culturas apresentaram perfis distintos de crescimento em função da pressão aplicada. Todas as culturas apresentaram uma alta atividade redutora de sulfato à 0,1 MPa, decaindo conforme o aumento da pressão. Portanto, compreender o papel que a alta pressão exerce sobre o crescimento dessas culturas pode fornecer informações importantes sobre os problemas causados por sua atividade redutora de sulfato. Este trabalho pretende elucidar algumas questões que podem melhorar as estratégias de tratamento de acidificação e corrosão dos materiais utilizados na produção de petróleo em águas profundas.

Palavras-chave: Bactérias. Corrosão. Água de injeção. Água de produção. Pré-sal.

**PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL BEHAVIOR OF MICROORGANISMS
FROM BRAZILIAN OFFSHORE OIL RESERVOIRS SUBJECTED TO HIGH
HYDROSTATIC PRESSURE**

ABSTRACT

The application of seawater for secondary oil recovery leads to the development of sulfate-reducing bacteria in oil fields, leading to microbial corrosion of steel equipment and acidification of oil. In order to evaluate the effect of high hydrostatic pressure on growth, sulfate-reducing activity and on the ultrastructure of these microorganisms, two mixed cultures from offshore reservoirs off the Brazilian coast were used, one from injection water collected at a depth of 100 m (BTB0119) and the other of production water, at 3,060 m (BTB0419), and a pure culture of *Desulfovibrio alaskensis*. The samples were morphologically characterized by Scanning Electron Microscopy and their complexity and size by Flow Cytometry. The cultures were submitted to two piezo-treatments: 35 and 65 MPa for 20 hours followed by 28 days at 0.1 MPa, and 35 and 65 MPa for 28 days. Visible light spectroscopy and the "Most Likely Number" evaluation method were used to measure bacterial concentration. It was observed that bacterial concentration values obtained using optical spectroscopy were more accurate and realistic than those obtained using the most likely number methodology. It was also observed that at ambient pressure the growth profile of the pure culture was similar to that of BTB0419 and different from that of BTB0119. The cultures showed different growth profiles as a function of the applied pressure. All cultures showed a high sulfate reducing activity at 0.1 MPa, decreasing with increasing pressure. Therefore, understanding the role that high pressure exerts on bacterial cultures growth can provide important information about the problems caused by their activity. This work intends to elucidate some issues that can improve acidification and corrosion treatment strategies of materials used in oil production in deep waters.

Key words: Bacteria. Corrosion. Injection water. Production water. Pre-salt.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das rochas dos reservatórios do pré-sal brasileiro..	18
Figura 2: Ilustração esquemática da localização dos reservatórios do pré-sal e pós-sal.....	19
Figura 3: Esquema exemplificando o processo de recuperação secundário do petróleo	21
Figura 4: Representação esquemática de curvas de crescimento em função da pressão para organismos piezossensíveis, piezotolerantes, piezófilos e piezófilos obrigatórios.....	24
Figura 5: Esquema da redução dissimilatória do sulfato.	28
Figura 6: Esquematização da metodologia abordada no presente estudo.....	31
Figura 7: Preparo do meio de cultura Postagate C em agitador magnético com aquecimento.....	33
Figura 8: Meio Postgate C sendo purgado com nitrogênio.	34
Figura 9: Meio de cultura sendo purgado com nitrogênio no gelo.....	35
Figura 10: Meio de cultura em frascos selados sendo purgados com nitrogênio no gelo.	35
Figura 11: Meio de cultura Postgate C em anaerobiose.	36
Figura 12: Curva de crescimento de <i>D. alaskensis</i> à 0,1 MPa.....	40
Figura 13: Curva de crescimento da cultura BTB0119 à 0,1 MPa.....	41
Figura 14: Curva de crescimento da cultura BTB0419 à 0,1 MPa.....	42
Figura 15: Curva de crescimento estabelecida para cultura pura de BRS <i>D. desulfuricans</i> à 0,1 MPa.....	43

Figura 16: Crescimento de BRS evidenciado pela coloração negra caracterizada pela presença de FeS em amostras de <i>D. alaskensis</i> à 0,1 MPa	44
Figura 17: Número mais provável - NMP em função da pressão	45
Figura 18: Crescimento das culturas de BRS em função da pressão	47
Figura 19: Atividade redutora de sulfato – ARS em função da pressão	49
Figura 20: Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP no crescimento das culturas de BRS BTB0119, BTB0419 e <i>D. alaskensis</i> após 28 dias.	50
Figura 21: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de BTB0119 após 28 dias sob HHP	53
Figura 22: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de BTB0419 após 28 dias sob HHP	54
Figura 23: Histogramas de dispersão lateral da luz (SSC) das amostras em relação aos tratamentos de pressão hidrostática (0,1, 35 e 65 MPa).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio de cultura Postgate C.	32
Tabela 2: Atividade redutora de sulfato em função da pressão.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGs – Ácidos graxos

AGPs – Ácidos graxos poliinsaturados

ARS – Atividade Redutora de Sulfato

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

DO – Densidade Óptica

FSC – Dispersão frontal da luz (do inglês Forward Scatter)

HCl – Ácido Clorídrico

HHP – Alta Pressão Hidrostática (do inglês High Hydrostatic Pressure)

H₂S – Sulfeto de Hidrogênio

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MPa – Mega Pascal

MRS – Microrganismos Redutores de Sulfato

NMP – Número Mais Provável

SSC – Dispersão lateral da luz (do inglês Side Scatter)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Caracterização do processo de produção de petróleo	18
2.1.1 Contexto geológico.....	18
2.1.2 Recuperação secundária do petróleo	19
2.1.3 Corrosão induzida por microrganismos (CIM)	22
2.2 Alta pressão hidrostática (HHP)	23
2.2.1 Efeito da alta pressão em microrganismos piezofílicos.....	25
2.3 Bactérias redutoras de sulfato	26
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Fluxograma experimental.....	31
4.2 Descrição dos campos de coleta e procedimento de amostragem.....	31
4.3 Preparação do meio de cultura Postgate C.....	32
4.4 Padronização das curvas de crescimento à 0,1 MPa.....	36
4.5 Experimentos com alta pressão hidrostática (HHP).	37
4.5.1 Tratamento com HHP por 20 horas seguido de crescimento por 28 dias à 0,1 MPa.	37
4.5.2 Tratamento com HHP por 28 dias.	38
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	38
4.7 Citometria de fluxo.....	39
4.8 Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Curvas de crescimento à 0,1 MPa.....	40
5.2 Crescimento das culturas redutoras de sulfato sob alta pressão hidrostática.....	44

5.2.1 Crescimento sob HHP por 20 horas seguido de crescimento 0,1 MPa por 28 dias..	44
5.2.2 Crescimento sob HHP por 28 dias.	49
5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
5.4 Efeito da HHP na complexidade celular.....	55
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia não renovável no mundo (AL-BAHRY et al. 2016). É um combustível fóssil formado a partir dos restos de antigos organismos vivos, que ao longo de milhões de anos de intenso calor e pressão, se transformaram em uma mistura espessa, inflamável, com coloração variando de amarelo a preto de hidrocarbonetos gasosos, líquidos e sólidos. O petróleo pode ser separado em frações, incluindo gás natural, gasolina, nafta, querosene, combustível e óleos lubrificantes, cera de parafina, e asfalto, dos quais são usadas como matéria-prima para combustível e uma ampla variedade de produtos (AITANI, 2004; DEMBICKI, 2017).

A necessidade de exploração de petróleo em locais de difícil acesso, como em alto mar (*offshore*), tem se tornado cada vez maior graças à descoberta de grandes reservatórios de óleo como o pré-sal, composto por grandes acumulações de óleo leve, de excelente qualidade e com alto valor comercial (MORAIS, 2013). O pré-sal está localizada a uma profundidade de 5.000 e 7.000 m abaixo do nível do mar, sob uma camada de sal de até 2.000 m de espessura situado no litoral brasileiro. (ADVISORS, 2018; FACANHA et al. 2016). Técnicas têm sido implementadas com o objetivo de aumentar a produção de petróleo em campos *offshore*. Essas técnicas baseiam-se principalmente na injeção de fluidos ou gases para manter a pressão interna dos reservatórios (ALAGORNI et al. 2015; VISHNYAKOV et al. 2020).

A injeção de água do mar é o método mais comum e eficaz de recuperação do petróleo em campos *offshore* devido à sua disponibilidade e baixo custo. A água é injetada com o propósito de restaurar a pressão interna do reservatório, o que resulta no deslocamento do óleo remanescente em direção ao(s) poço(s) produtor(es) (AHMED, 2010; VISHNYAKOV et al. 2020). No entanto, a água do mar contém íons sulfato em grande quantidade, o que favorece o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que reduzem o sulfato a sulfeto, ocasionando a corrosão das estruturas metálicas usadas na extração do petróleo (BELL et al. 2020).

As BRS são microrganismos anaeróbios que usam sulfato como um aceptor final de elétrons, por exemplo, na degradação de compostos orgânicos (MUYZER e STAMS, 2008). Elas são onipresentes em habitats anóxicos, onde desempenham um papel importante nos ciclos do enxofre e do carbono, podendo ser encontradas tanto na forma planctônica (nadante) como na forma sésil (aderida) (ANANDKUMAR et al., 2016). As BRS's toleram uma ampla faixa de pH (5,0 a 9,5) e crescem melhor entre temperaturas de 25 °C a 37 °C, mas alguns gêneros termofílicos crescem em temperaturas superiores a 80 °C (ENNING e GARRELF, 2014).

A atividade das BRSs tende a ser favorecida nas regiões do reservatório mais próximo aos poços injetores, que são as mais impactadas pela injeção de água do mar. A corrosão do aço dos ductos de extração, tanques de carga e a contaminação do óleo armazenado ocorrem devido ao aumento da concentração de sulfeto de hidrogênio (H₂S), processo conhecido como “*souring*”, que compromete a qualidade do óleo, gerando prejuízo à indústria petrolífera (KHOUZANI et al. 2019; ZHENG et al. 2020). Apesar de a maior parte da produção de H₂S em oleodutos originar-se da atividade metabólica das BRS, esse gás também pode ser produzido de forma química pela dissolução dos sulfetos metálicos presentes nas rochas dos reservatórios (MOUGIN et al. 2007).

Em ambientes como os reservatórios de petróleo *offshore*, a pressão hidrostática constitui um parâmetro importante, mas pouco estudado, que exerce grande influência na distribuição da vida microbiana nesses ecossistemas (FICHTEL et al. 2015; MICHOUUD e JEBBAR, 2016; MARIETOU e BARTLETT, 2014). Reservatórios como os do pré-sal, no qual a pressão hidrostática é acima de 60 MPa, podem ser povoados por uma grande diversidade de microrganismos, conhecidos como piezófilos, que tem uma taxa de crescimento ideal a uma pressão superior a pressão atmosférica (0,1 MPa) (FACANHA et al. 2016; ROUMAGNAC et al. 2020).

Sabe-se que a alta pressão hidrostática pode inibir processos celulares, como a motilidade, transporte de substrato, divisão celular, replicação de DNA, transcrição, tradução, certas reações enzimáticas e mudanças nos estados líquido-cristalino da membrana (BARTLETT et al. 2014). Dentre esses, a membrana plasmática é o componente mais impactado pela HHP, que tende a se tornar rígida devido à

compactação de suas constituintes lipídicas em bactérias piezossensíveis. Esses efeitos são neutralizados nos piezófilos por meio da alteração da composição da membrana, especialmente na quantidade de ácidos graxos insaturados (ABE, 2015).

Para aumentar o sucesso do controle da acidificação, tem se buscado cada vez mais compreender a biologia desses organismos e o efeito da pressão no crescimento e metabolismo de BRS. No entanto, relativamente poucos estudos avaliaram a influência dos efeitos da alta pressão hidrostática (HHP) em microrganismos redutores de sulfato (AMRANI et al., 2014; PRADEL et al., 2013; WILKINS et al., 2014) Portanto, compreender a atividade de BRS sob alta pressão é importante para entender o ciclo global de enxofre na subsuperfície profunda e poder ajudar a melhorar as estratégias de tratamento de inibição de acidificação existentes (WILLIAMSON et al. 2018).

Este estudo teve como finalidade analisar o efeito da alta pressão hidrostática no crescimento de culturas mistas de BRS provenientes de água de injeção e produção coletadas em poços de petróleo do pós-sal, assim como, caracterizar as modificações celulares que ocorrem nas cepas de BRS sob pressão, e com isso este conhecimento poderá ser utilizado para desenvolver estratégias a fim de minimizar os custos de manutenção dos poços do pós-sal e pré-sal, levando a uma considerável economia de recursos para a empresa petrolífera.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização do processo de produção de petróleo.

2.1.1 Contexto geológico.

A região brasileira de petróleo do pré-sal localiza-se em uma faixa litorânea entre os estados do Espírito Santo e de Santa Catarina, com uma área de aproximadamente 149.000 km². Essa área tem início ao norte da Bacia de Campos, estendendo-se até sul da Bacia de Santos (Figura 1) (ADVISORS, 2018; MORAIS, 2013; RICCOMINI et al 2012).



Figura 1: Distribuição das rochas reservatórios do pré-sal brasileiro (em azul) em relação às bacias sedimentares da margem continental brasileira. Fonte: PAPTERRA, 2010.

O pré-sal é uma sequência de rochas sedimentares formadas durante a separação dos atuais continentes sul-americano e africano, há cerca de 150 milhões de anos. Grandes depressões se formaram entre esses dois continentes, originando grandes

lagos, que acumularam grandes quantidades de matéria orgânica em suas regiões mais profundas. Após um longo processo envolvendo altas temperaturas e pressão, a matéria orgânica foi convertida em óleo e gás, em um processo denominado geração (ADVISORS, 2018).

Conceitualmente, o termo pré-sal refere-se a rocha reservatório localizada sob uma camada de sal de até 2.000 metros de espessura. Considerando que a lâmina d'água pode chegar a mais de 2.000 metros, os reservatórios do pré-sal podem estar localizados a uma profundidade entre 5.000 e 7.000 metros. Por outro lado, o termo pós-sal refere-se as rochas localizadas acima da camada de sal, a uma profundidade de cerca de 3.000 metros (Figura 2) (PAPATERRA, 2010; ADVISORS, 2018).

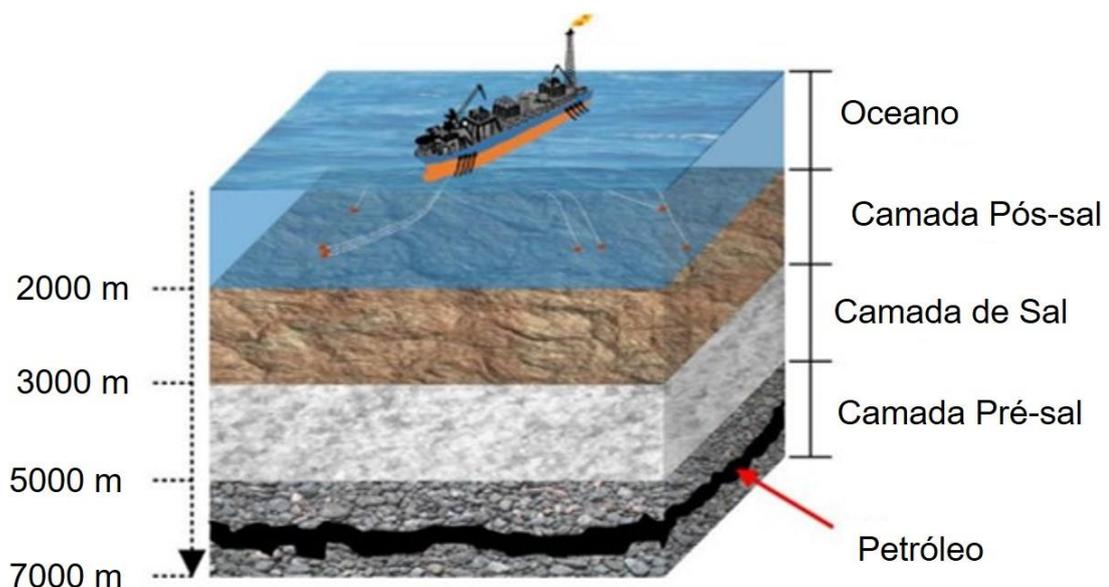


Figura 2: Ilustração esquemática da localização dos reservatórios do pré-sal e pós-sal. Fonte: Modificado de MANGILI; AHÓN, 2019.

2.1.2 Recuperação secundária do petróleo.

Os métodos de recuperação na indústria do petróleo podem ser classificados em primário, secundário e terciário, sendo o último conhecido como recuperação avançada do petróleo. Durante a fase de recuperação primária, o óleo pode chegar

à superfície pela própria pressão interna dos gases (energia natural estocada) presentes nos reservatórios ou através do uso de equipamentos para promover a sua elevação. Nessa etapa é recuperado em torno de 30% do óleo no interior dos reservatórios (MORAIS, 2013; GANAT, 2019).

No decorrer da extração de petróleo em um reservatório, sua pressão natural declina e a produtividade diminui, processo conhecido como depleção (HÖÖK et al. 2014). Normalmente, 60% dos poços de petróleo em produção precisam de algum sistema de pressão adicional para bombear o óleo do reservatório. Para tal, métodos de recuperação secundários são aplicados (VISHNYAKOV et al. 2020). O tratamento secundário é um recurso utilizado para otimizar a recuperação primária e tem como objetivo manter ou aumentar a pressão dentro do reservatório e deslocar o óleo remanescente através do reservatório para os poços de produção, geralmente, utilizando a injeção de água do mar. (NOLAN, 2019).

Conforme ilustrado na figura 3, a água é injetada no reservatório através do poço de injeção, deslocando o óleo remanescente em direção ao poço produtor. Uma vez na superfície, os fluidos gerados neste processo são separados em óleo e água. O óleo produzido será comercializado e a água é armazenada, podendo ser reintroduzida no poço. Ao ser injetada, a água provoca o resfriamento de uma área vizinha ao poço de injeção, chamada zona de influência. Esse resfriamento altera química e biologicamente essa área, favorecendo a atividade microbiana.

A água do mar é a fonte de água mais acessível e barata utilizada nas plataformas de petróleo *offshore*. Os dois maiores problemas associados a este método são a deposição de incrustações causada pela injeção de sólidos (partículas) presentes na água e a corrosão das estruturas metálicas usadas na extração e armazenamento do óleo (ADENIYI et al. 2008). Estima-se que essa corrosão acarreta em pelo menos 20% dos custos totais (SALGAR-CHAPARRO et al., 2020).

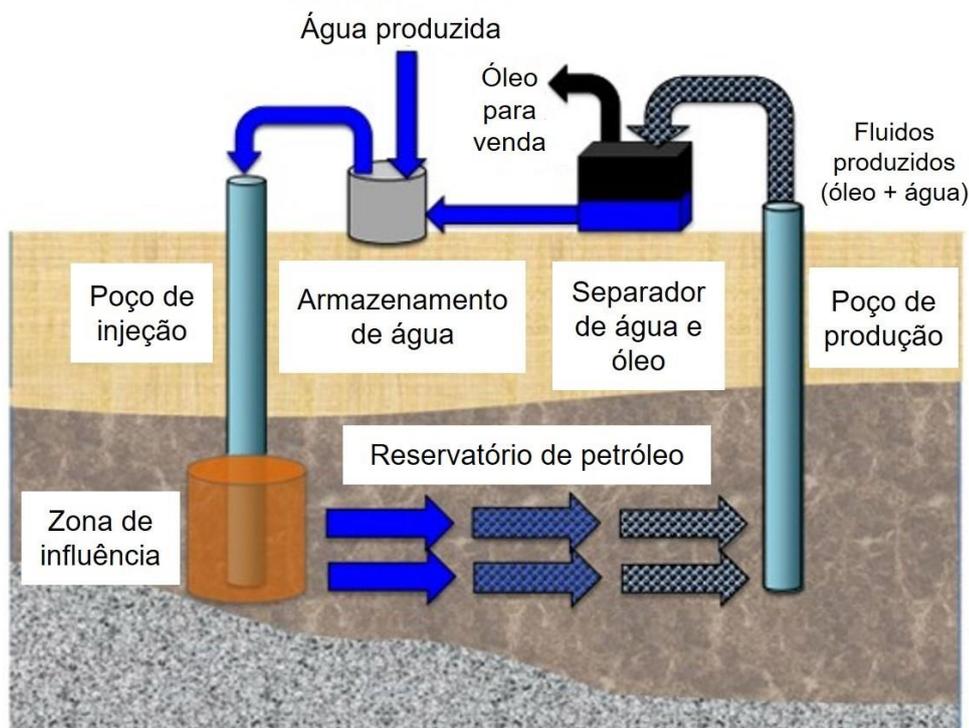


Figura 3: Esquema exemplificando o processo de recuperação secundário do petróleo, comumente usada em campos petrolíferos *offshore* para prolongar a vida produtiva do poço. Fonte: GIEG et al. 2011.

A exploração e produção de petróleo gera uma grande quantidade de água produzida (definida como a água presente em formações subterrâneas e é trazida para a superfície durante a produção de petróleo e gás) (DONG, 2020). Normalmente, um reservatório novo produz cerca de 5 a 15% de água produzida do volume total de petróleo. No entanto, conforme o campo amadurece, o volume de água produzida pode chegar até a 90% da produção, pois água adicional é normalmente injetada no reservatório para sustentar a pressão necessária para manter ou aumentar os níveis de recuperação de óleo (MUGGERIDGE et al., 2014).

A reutilização da água produzida para a reinjeção como método de recuperação secundária, evita o seu descarte na natureza. A indústria de petróleo e gás tem investido em estudos para analisar os efeitos dessa reinjeção, considerando que essa prática pode adicionar ao sistema microrganismos e matéria orgânica, o que pode contribuir para o processo corrosivo (LIANG et al. 2018). Os principais constituintes presentes na água produzida incluem: sal (medido como

salinidade), óleos e graxas, além de outros compostos orgânicos e inorgânicos. A mínima presença desses compostos é o bastante para promover um ambiente favorável à atividade de microrganismos heterotróficos redutores de sulfato, ocasionando a produção de gás sulfídrico, também chamado por sulfeto biogênico. Esse aumento de atividade microbiana provoca a diminuição da qualidade dos hidrocarbonetos produzidos e da produtividade dos poços, além de problemas de segurança, de saúde e questões ambientais (SIAGIAN et al. 2018).

2.1.3 Corrosão induzida por microrganismos (CIM).

A redução de sulfato em sulfeto causada pela ação microbiana (também conhecida na indústria de petróleo e gás como acidificação microbiana ou *biosouring*) é o processo microbiano mais deletério que os operadores de petróleo enfrentam durante a produção de petróleo (ANANDKUMAR et al. 2016). O sulfeto formado apresenta riscos à saúde dos trabalhadores quando presente na fase gasosa como H₂S e precisa ser removido do petróleo bruto antes de ser refinado, resultando em um produto final mais caro (HUBBARD et al., 2014). A concentração aproximada de sulfato, presente na água do mar, é de 28 mmol/L (BELL et al., 2020).

Alguns reservatórios de óleo sofrem o processo de acidificação devido a mecanismos não biogênicos, como exemplo a decomposição termofílica de hidrocarbonetos contendo enxofre, a dissolução da pirita e a redução termoquímica do sulfato. Esses mecanismos são influenciados pela natureza da rocha do reservatório, pela composição do óleo e pelas altas temperaturas (HOLUBNYAK et al. 2011; JORGENSEN et al. 2019).

Em contraste, a acidificação biológica ocorre quando os microrganismos reduzem enzimaticamente sulfato, tiosulfato ou enxofre elementar em sulfeto, a fim de ganhar energia para o seu crescimento (HUBBARD et al. 2014). A maioria dos redutores de sulfato são bactérias, normalmente *Deltaproteobacteria* e *Firmicutes*, e são designados por bactérias redutoras de sulfato (BRS). Alguns redutores de sulfato se afiliam filogeneticamente com Archaeas e são designados como Archaeas redutoras de sulfato, ou ARS (JIA et al. 2019).

A acidificação é iniciada principalmente durante o processo de recuperação secundário do petróleo (PRAJAPAT et al. 2018; VOORDOUW et al. 2011), no qual a água injetada resfria o reservatório ao redor do poço de injeção a temperaturas que são mais favoráveis à redução de sulfato microbiano e à produção de sulfeto. Uma zona de redução ótima de sulfato é, portanto, criada, com sua localização e extensão controladas pelos gradientes térmicos e químicos resultantes da injeção de água e pela distribuição e natureza dos microrganismos que estão presentes (EDEN et al. 1993; GIEG et al. 2011).

2.2 Alta Pressão Hidrostática (HHP).

A pressão hidrostática é uma variável termodinâmica presente em muitos habitats, como o fundo do mar e na sua subsuperfície profunda (PICARD e DANIEL, 2013). A pressão hidrostática é a pressão que ocorre no interior dos líquidos, sendo exercida pelo peso do próprio líquido, aumentando com a profundidade a uma taxa aproximada de 10 MPa (~100 atmosferas/bar) por km na coluna d'água (MARIETOU e BARTLETT, 2014).

Os oceanos cobrem aproximadamente 70% da superfície do mundo com uma profundidade média de 3.800 metros e pressão de 38 MPa. enquanto que a pressão atmosférica a nível do mar, é de 0,1 MPa (SALVADOR-CASTELL et al. 2020). A região de maior profundidade conhecida na Terra atualmente são as Fossas das Marianas, situadas no Oceano Pacífico, atingindo uma profundidade de aproximadamente 11.000 metros e pressão hidrostática de 110 MPa. Apesar dessa condição extrema, uma grande diversidade de bactérias piezófilas têm sido observadas prosperando sob estas condições (PEOPLES et al. 2018).

Todos os habitats de HHP existentes na biosfera são habitados por microrganismos ou em alguns casos, por organismos mais complexos, os quais desempenham papel importante nos ciclos biogeoquímicos da Terra (JEBBAR et al. 2015). O impacto da pressão sobre o crescimento desses organismos permite dividi-los em diferentes categorias: Organismos cuja sobrevivência e reprodução são otimizadas em altas pressões são chamados de piezófilos estritos ou obrigatórios; organismos piezófilos

facultativos são aqueles que toleram a pressão ambiente, mas suas pressões de crescimento ideais são superiores a 10 MPa; organismos que resistem a pressões de até 10 MPa são chamados de piezotolerantes; e finalmente, os organismos cujo crescimento é inibido pela pressão são denominados piezossensíveis (Figura 4) (OGER e CARIO, 2014).

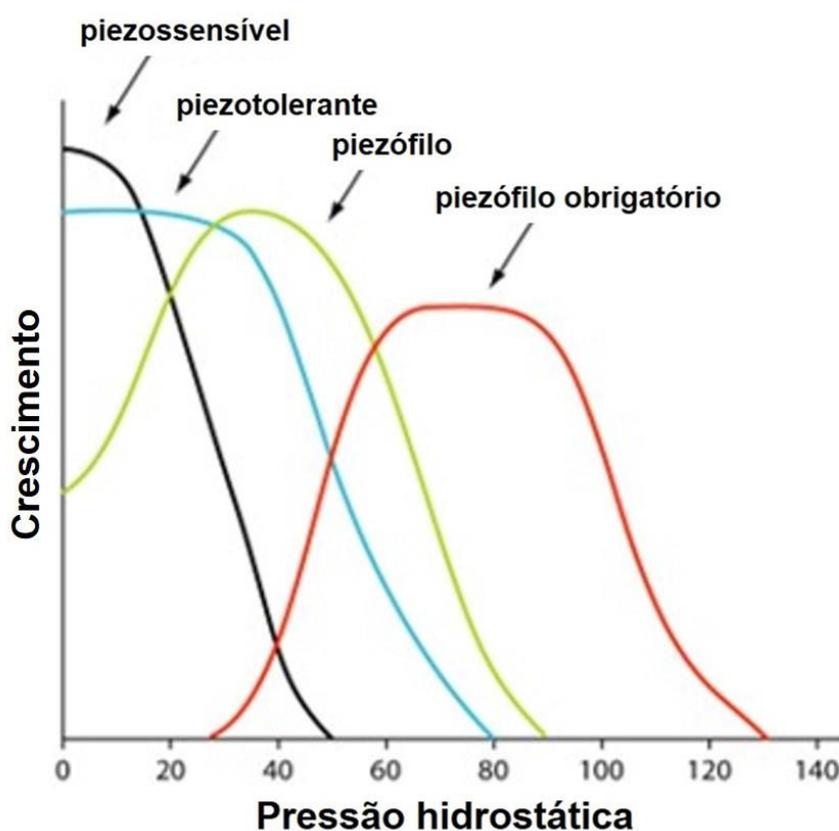


Figura 4: Representação esquemática de curvas de crescimento em função da pressão para organismos piezossensíveis (preto = 0,1 MPa), piezotolerantes (azul < 10 MPa), piezófilos (verde > 10 MPa) e piezófilos obrigatórios (vermelho > 50 MPa). Fonte: OGER e CARIO, 2014.

A HHP tem uma importância biotecnológica devido à sua aplicação nos processos de descontaminação dos alimentos. A HHP tem a capacidade de inativar microrganismos, bem como enzimas responsáveis pela redução da vida útil de um produto (RIVALAIN et al. 2010). Hite, em 1899, demonstrou que os microrganismos que contaminam o leite podiam ser destruídos com aplicação da alta pressão hidrostática (CHAWLA et al. 2011).

A HHP apresenta diversas vantagens quando comparada à descontaminação por altas temperaturas, visto que a última geralmente causa mudanças nas características organolépticas originais dos alimentos, criando alterações nutricionais, na cor, sabor, degradação de várias vitaminas e textura. Além do uso na descontaminação de alimentos, pressões mais amenas vêm sendo indicadas para otimização de processos industriais (OEY et al. 2008).

Segundo BRAVIM et al. (2013), a pressão de 50 MPa tornou o processo fermentativo da glicose em etanol, por *Saccharomyces cerevisiae*, mais rápido e ainda aumentou o rendimento, quando comparado com a fermentação à pressão ambiente. HHP vem sendo aplicada também para desagregação de proteínas, na preparação de vacinas virais, na modulação de conversões enzimáticas, dentre outros (RIVALAIN et al. 2010).

2.2.1 Efeito da alta pressão em microrganismos piezófilos.

A alta pressão hidrostática é um fator que impacta a atividade de vários processos-chave, ocasionando uma diminuição drástica da atividade celular e, eventualmente, a morte celular de organismos piezossensíveis (BARTLETT, 2002; SIMONATO et al. 2006; TAMBURINI et al. 2013). Os piezófilos desenvolveram várias estratégias para lidar com a pressão elevada e manter a integridade e função celular em uma ampla faixa de pressão hidrostática. A adaptação piezófila requer a modificação de alguns genes, uma reorganização mais profunda do genoma, o ajuste fino da expressão gênica ou uma resposta celular fisiológica semelhante ao estresse.

A síntese de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), com proporções que chegam a 70% do total de ácidos graxos (AGs) nas membranas dessas bactérias é a descoberta mais significativa no estudo da bioquímica dos piezófilos. A alta proporção de PUFAs pode aumentar a fluidez da membrana em alta pressão hidrostática (ABE, 2013; BARTLETT, 2002). O aumento dos ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolípidios também foi encontrado em ésteres de cera intracelular de uma bactéria hidrocarbonoclastica piezotolerante (GROSSI et al.,

2010). Uma segunda descoberta importante é o acúmulo de solutos nas bactérias, que podem desempenhar o papel esperado de um "piezólitio". Como os mecanismos relatados para microrganismos em resposta a tensões osmóticas ou de calor, os piezólitos podem desempenhar o papel de solutos estabilizadores de proteínas. Acúmulos de β -hidroxibutirato e manosil-glicerato foram relatados em *Photobacterium profundum* e na archaea piezófila hipertermófila *Thermococcus barophilus*, respectivamente (CARIO et al., 2016; MARTIN; BARTLETT; ROBERTS, 2002). Da mesma forma, o glutamato foi proposto como um piezólitio nos piezófilos *Desulfovibrio hydrothermalis* e *Desulfovibrio piezophilus* (AMRANI et al., 2014).

O metabolismo energético também tem sido observado como um dos processos celulares mais importantes impactados na adaptação à alta pressão (LE BIHAN et al., 2013; PRADEL et al., 2013). Foi constatado que as enzimas sintetizadas por bactérias adaptadas a alta pressão apresentam maior atividade sob condições de alta pressão do que à pressão ambiente. Sendo assim, a expressão ou a estrutura (por exemplo, devido a substituições de aminoácidos) de enzimas podem ser alteradas em microrganismos piezófilos, auxiliando na atividade e estabilidade, em situações de alta pressão hidrostática.

Entretanto, essas habilidades detectadas em estudos bioquímicos e genômicos feitos em cepas piezófilas cultivadas, geram uma visão fragmentada dos mecanismos adaptativos em piezófilos. Acredita-se que entre as diversas espécies não cultivadas presentes na biosfera profunda, haja outras estratégias metabólicas e fisiológicas para lidar com a alta pressão hidrostática que ainda estão para ser descobertas (CARIO; OLIVER; ROGERS, 2019).

2.3 Bactérias redutoras de sulfato.

Microrganismos redutores de sulfato (MRS) ou procariotos redutores de sulfato (PRS) são um grupo composto por bactérias redutoras de sulfato (BRS) e arqueias redutoras de sulfato (ARS), ambos podem realizar respiração anaeróbica utilizando sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor de elétrons terminais, reduzindo-o a sulfeto de hidrogênio (H_2S) para gerar energia. Em outras palavras, o íon sulfato atua como

agente oxidante para metabolização da matéria orgânica (KUSHKEVYCH et al. 2021).

As BRS são um grupo diverso de microrganismos autotróficos e heterotróficos que são onipresentes no meio ambiente (WILLIAMSON et al. 2018). Toleram uma ampla faixa de pH de 5,0 a 9,5 e crescem melhor entre temperaturas de 25 °C e 37 °C, mas alguns poucos gêneros termofílicos crescem em temperaturas superiores a 80 °C (MARDHIAL et al. 2014). Esse grupo de bactérias desempenha um papel importante na corrosão do aço em ambientes marinhos e terrestres, e são normalmente o foco da pesquisa sobre corrosão (ENNING e GARRELF, 2014).

Grande parte das BRS são gram-negativas, exceto espécies do gênero *Desulfonema*. Os dois gêneros mais prevalentes de BRS são *Desulfotomaculum*, composto de formadores de esporos, com formato de bastonetes retos ou curvos, e o gênero não esporulantes *Desulfovibrio* com organismos em forma de vibrios ou bastonetes móveis curvos. Muitas BRS também podem reduzir outros compostos de enxofre inorgânicos, incluindo sulfito, tiosulfato e enxofre elementar (CYPIONKA, 2011; KUSHKEVYCH et al. 2021)

As BRS são capazes de usar uma variedade de substâncias como doadores de elétrons na respiração anaeróbica, dentre elas está o hidrogênio molecular (H₂) e vários compostos orgânicos como o lactato, acetato, piruvato, malato, álcoois como etanol, propanol ou butanol (LIU et al. 2018). De acordo com RABUS et al. (2006), os redutores de sulfato podem ser divididos em dois grupos principais: espécies que oxidam substratos orgânicos incompletamente a acetato (por exemplo, pelo gênero *Desulfovibrio*) e espécies que oxidam substratos orgânicos, incluindo acetato, completamente a CO₂ (por exemplo, pelo gênero *Desulfomicrobium*).

O primeiro processo é conhecido como redução dissimilatória de sulfato ou respiração de sulfato (KUSHKEVYCH et al. 2021). Neste processo o íon sulfato age como um agente oxidante na dissimilação da matéria orgânica, do mesmo modo que o oxigênio na respiração convencional. As BRSs utilizam este íon que é reduzido a H₂S (Figura 5). Nenhum outro microrganismo além de BRS é conhecido por ser capaz dessa forma de respiração (SIMON e KRONECK, 2013).

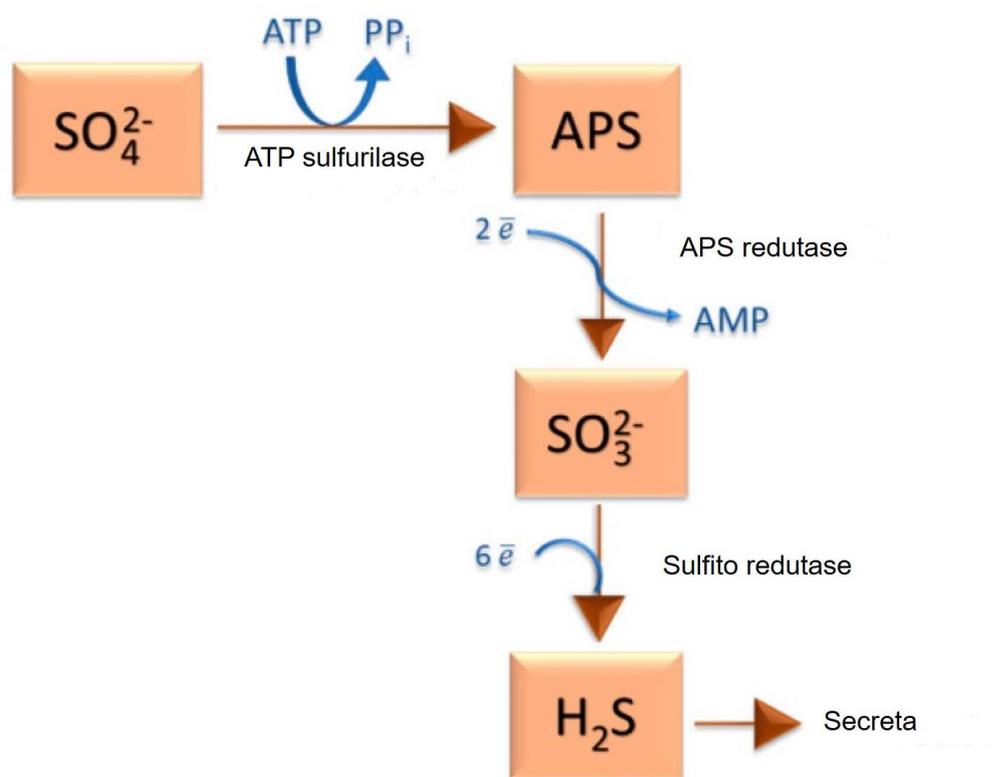


Figura 5: Esquema da redução dissimilatória do sulfato. Fonte: KUSHKEVYCH; HYZOVÁ; VITEZOVÁ; RITTMANN, 2021.

Estudos analisando os aspectos biológicos das BRS tiveram início no ano 1895 quando o pesquisador Beijerinck constatou um processo bioquímico importante em uma espécie recém-isolada, *Spirillum desulfuricans* (atualmente conhecida como *Desulfovibrio desulfuricans*). O processo metabólico descoberto foi a redução dissimilatória de sulfato (KUSHKEVYCH et al. 2021). Anos depois, outros cientistas passaram a estudar as BRS desenvolvendo novos métodos de cultivo, e aperfeiçoando as técnicas moleculares possibilitando a caracterização de muitos novos táxons (ANANDKUMAR et al. 2016). Atualmente, alguns estudos tem como objetivo investigar o potencial biotecnológico dessas bactérias, por exemplo, para biorremediação de compostos tóxicos no meio ambiente. Além disso, outros estudos avaliam a capacidade da BRS de ocasionar corrosão e acidificação em reservatórios de petróleo, o que acarreta consideráveis perdas econômicas (KUSHKEVYCH et al. 2021).

O gênero *Desulfovibrio* é o mais estudado, pertencendo ao filo *Proteobacteria*, classe *Deltaproteobacteria*, ordem *Desulfovibrionales*, família *Desulfovibrionaceae* (RABUS et al. 2006). As espécies desse gênero são gram-negativas, caracterizadas pela mobilidade através de um ou mais flagelos, com aspecto morfológico predominante de bastonetes curvos (conhecidos como “forma de vírgula”) de 0,5–1,5 × 2,5–10,0 µm, podendo ser encontrados também na forma sigmóides (*D. africanus*) ou em espiral (KUSHKEVYCH et al. 2021). Em casos raros elas podem apresentar formato de hastes filamentosas, podendo ser influenciado pelas características do ambiente em que está inserida (FICHTEL et al. 2015).

As BRS apresentam tempo de geração que pode variar entre 20 horas (WILLIAMSON et al. 2018; WOOD et al. 2019) a alguns dias, podendo ser de até duas semanas, dependendo da intensidade na geração de sulfeto de hidrogênio (H₂S), posto que em altas concentrações esse é tóxico para o desenvolvimento bacteriano. Concentrações de sulfato de 544 mg/L são citadas como inibitórias do crescimento de BRS. No entanto, a tolerância ao sulfeto é dependente da espécie e de condições de cultivo, tais como pH, temperatura e pressão. (HAMILTON WA; LEE W, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da alta pressão hidrostática no crescimento e na atividade redutora de sulfato de culturas mistas de bactérias coletadas no pós-sal de reservatório de petróleo *offshore* da costa da região sudeste brasileira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a curva de crescimento das culturas de BRS em 0,1 MPa;
- Submeter as culturas de BRS à 35 e 65 MPa por 20 horas;
- Submeter as culturas de BRS à 35 e 65 MPa por 28 dias;
- Verificar se bactérias provenientes da camada pós-sal podem resistir a HHP do pré-sal;
- Analisar os efeitos da HHP na morfologia e complexidade celular de BRSs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma experimental.

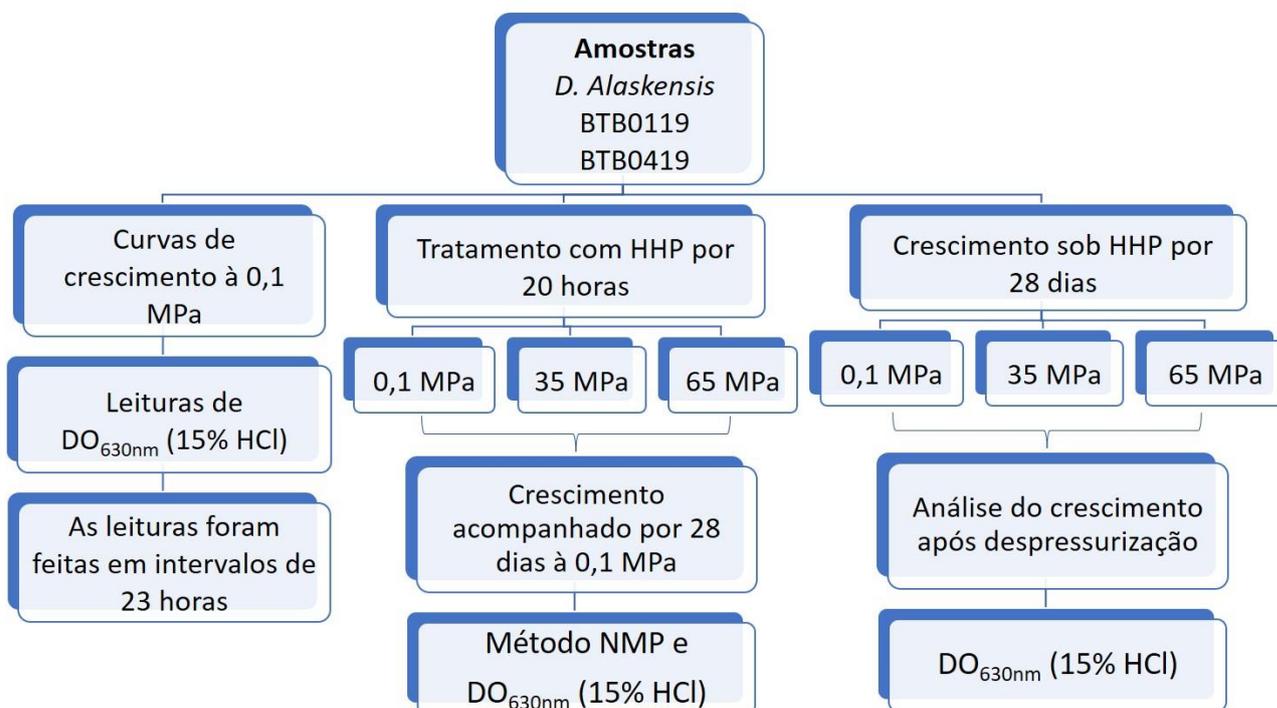


Figura 6: Esquematização dos métodos abordados no presente estudo.

4.2 Descrição dos campos de coleta e procedimento de amostragem.

As culturas de BRS utilizadas nos experimentos foram coletadas nos campos *offshore* do pós-sal por técnicos especializados da Petrobrás. A amostra BTB0119 é resultado de uma cultura mista de água de injeção proveniente de plataformas de petróleo situadas na bacia de Campos, no litoral do estado do Rio de Janeiro. A água de injeção foi coletada a uma profundidade de 100 m abaixo da superfície do mar a 25 °C. A amostra BTB0419 é uma cultura mista de BRS oriunda de água de produção, coletada em uma plataforma de petróleo situada no campo Marlim, no litoral norte do Rio de Janeiro. A cultura foi coletada a 3.060 m de profundidade a uma temperatura de 72 °C. Após as coletas, o material foi acondicionado em frascos do tipo penicilina (50 mL) e purgadas com nitrogênio gasoso para manter as

condições de anaerobiose. As amostras foram levadas para o laboratório de Biotecnologia aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santos – LBAA/UFES, para os experimentos de pressão hidrostática e denominadas de acordo com o banco de microrganismos do LBAA em BTB (bactérias da biotecnologia) com o número apropriado. Uma cultura pura de BRS isolada de um reservatório de óleo acidificado *Desulfovibrio alaskensis* AL1 (<https://bacdiv.dsmz.de/strain/4150>) foi usada como controle.

4.3 Preparação do meio de cultura Postgate C.

As culturas de BRS foram cultivadas a 37 °C em meio de cultura líquido Postgate C, cuja a composição está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do meio de cultura Postgate C.

Reagente	Fórmula	Quantidade para 1 L
Cloreto de Amônio	NH ₄ Cl	1,0 g
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂	0,06 g
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,004 g
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄ 6H ₂ O	0,06 g
Fosfato de Potássio Monobásico	KH ₂ PO ₄	0,5 g
Resazurina	C ₁₂ H ₇ NO ₄	4,0 mL
Citrato de Sódio	C ₆ H ₃ NaO ₂ S	0,3 g
L-lactato de Sódio	C ₃ H ₅ NaO ₃	9,4 mL
Sulfato de Sódio	Na ₂ SO ₄	4,5 g
Tioglicolato de Sódio	C ₂ H ₃ NaO ₂ S	0,124 g
Extrato de Levedura em pó	∅	1,0 g
Água	H ₂ O	1000 mL

pH (após esterilização): 7,6.

Os reagentes foram dissolvidos, sendo que o lactato de sódio, o sulfato ferroso e a resazurina foram adicionados por último. Após isso, o pH foi ajustado para 7,8 com

solução de NaOH 5 M. O meio foi esterilizado em autoclave, por 15 minutos a 121 °C sem retirar o ímã do agitador magnético utilizado para homogeneizar a solução antes da esterilização. Além disso, o meio foi autoclavado com um *stopper* que encaixa perfeitamente na boca do recipiente e possui dois furos (esse deve ser coberto com papel alumínio). Imediatamente após a esterilização, o meio foi alocado em um agitador magnético com aquecimento até que o meio começasse a ferver, esse procedimento libera os gases dissolvidos no meio, enquanto a agitação durante o aquecimento permite que o meio como um todo esteja na mesma temperatura (Figura 7).



Figura 7: Preparo do meio de cultura Postgate C em agitador magnético com aquecimento.

Após início da fervura, é retirado o papel alumínio e em um dos furos do *stopper* foi inserida uma agulha de 15 cm conectada a uma saída de nitrogênio para iniciar a purga por 5 minutos. Após a purga com o meio em ebulição, o meio é retirado do agitador magnético com aquecimento e purgado por mais 20 minutos (Figura 8).



Figura 8: Meio Postgate C sendo purgado com nitrogênio.

A solução de tioglicolato de sódio é então adicionada ao meio. Após esse tempo, o meio é colocado em banho de gelo e purgado por mais 10 minutos (a baixa temperatura mantém o gás dissolvido no líquido) (Figura 9).



Figura 9: Meio de cultura sendo purgado com nitrogênio em banho de gelo.

Uma pipeta de vidro de 10 mL previamente autoclavada foi utilizada para distribuir o meio de cultura em frascos de 50 mL, que foram lacrados com *stopper* azul e selo de alumínio. Em seguida foram purgados com nitrogênio gasoso por 15 minutos em banho de gelo (Figura 10).



Figura 10: Meio de cultura em frascos selados sendo purgados com nitrogênio no gelo.

Após 24 H na geladeira a 4 °C, o meio estava completamente transparente (Figura 11), demonstrando que não há contaminação de oxigênio e o meio está em anaerobiose.



Figura 11: Meio de cultura Postgate C em anaerobiose.

4.4 Padronização das curvas de crescimento à 0,1 MPa.

Para iniciar as curvas de crescimento de *D. alaskensis*, BTB0119 e BTB0419 foram utilizadas diluições nas quais 5 mL das culturas em fase estacionária foram adicionadas em 25 mL de meio Postgate C fresco. As medições para cada ponto de tempo na curva de crescimento foram obtidas usando o método de leitura por densidade óptica (DO_{630nm}) usando ácido clorídrico padronizado por Wood et al. (2019). Alíquotas de 180 μ L de cada cultura (em duplicata) foram colocadas em placas de 96 poços de fundo plano transparente acrescidas de 20 μ L de HCl (15% v/v), posteriormente incubadas à temperatura ambiente por 10 min, para garantir a dissolução completa dos sulfetos de ferro e permitir que o gás H_2S residual se dissipe. Devido aos efeitos tóxicos do gás H_2S , todas as alíquotas de cultura e incubações de placas foram conduzidas em uma capela. Após a incubação, a DO_{630nm} foi registrada em um espectrofotômetro do tipo leitor de placas Synergy™

HT Multi-Detection Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) em intervalos de 23 horas, durante 15 dias e os dados foram processados Software Gen5™. Todas as curvas de crescimento foram realizadas em triplicata.

4.5 Experimentos com alta pressão hidrostática (HHP).

Os experimentos de alta pressão hidrostática foram realizados em garrafas de aço inoxidável 316 L de alta pressão (JBV Usinagem e Tecnologia Ltda., Campinas, SP, Brasil). As amostras foram submetidas a alta pressão hidrostática por meio de bomba hidropneumática com pressão máxima de saída de 103 MPa e deslocamento de 0,4 mL / ciclo (modelo Haskel MS-188, Flutrol Comércio e Controle de Fluidos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) usando água destilada como fluido hidráulico.

4.5.1 Tratamento com HHP por 20 horas seguido de crescimento por 28 dias à 0,1 MPa.

As culturas de BRS (*D. alaskensis*, BTB0119 e BTB0419) foram pressurizadas a 35 e 65 MPa por 20 horas. O crescimento a 0,1 MPa foi avaliado usando o mesmo protocolo descrito anteriormente, exceto para pressurização. Após as 20 horas de incubação, 1 mL de cada cultura foi então inoculada em 9 mL de meio Postgate C e seu crescimento foi acompanhado por 28 dias em pressão ambiente a 37 °C. Para estimar a concentração de microrganismos viáveis nas amostras, foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP) (HUI et al. 2012; KARUNASAGAR et al. 2018). A determinação do NMP de células sobreviventes (NMP/mL) foi calculada a partir da equação.

$$= \sum_{f=1}^k \frac{g_j m_j}{1 - \exp(-\lambda m_j)} = \sum_{f=1}^k t_j^{m_j}$$

Onde:

λ é o número mais provável; K-j é o número de diluições; g-j é o número de tubos positivos na enésima diluição; volume m-jis de amostra usado para preparar a

enésima diluição; t-j: é o número de tubos usados para preparar a enésima diluição. A atividade redutora de sulfato (ARS) é positiva quando ocorre a formação de um precipitado escuro correspondente ao sulfeto ferroso. A medição da atividade foi feita dividindo o número de dias em que o precipitado apareceu por 28. ARS é considerado baixo quando o valor é $\leq 1,33$; moderado para ARS de 1,34 a 4 e alto para valores > 4 , de acordo com os padrões de monitoramento (CONTEC, 2016).

4.5.2 Tratamento com HHP por 28 dias.

As culturas *D. alaskensis*, BTB019 e BTB049 foram inoculadas em meio Postgate C e submetidas a 35 e 65 MPa por 28 dias utilizando o mesmo sistema de pressão descrito no item 4.5. Neste ensaio, utilizou-se o mesmo método de leitura por densidade óptica usando ácido clorídrico (Wood et al. 2019) descrito no item 4.3 para avaliar a concentração celular antes e depois da pressurização.

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram analisadas em modo direto usando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM-6610 LV), com HV (voltagem) de 20 Kv e magnitudes de 10.000x a 20.000x. Alíquotas de 100 μ L de cada amostra foram centrifugados (3 min a 9.000 g) e fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M). Posteriormente, as células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio, desidratados em etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100% v/v), secagem no ponto crítico de CO₂ (Autosandri-815, Tousimis), revestimento com 10 nm de ouro puro em um aspessor a vácuo (Desk V, Denton Vacuum).

4.7 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo, foi usada como ferramenta nas análises morfológicas por meio dos parâmetros de tamanho e complexidade (FSC-A e SSC-A). Os ensaios foram realizados em um citometro de fluxo, CytoFLEX V5-B5-R3 (Beckman Coulter) utilizando o laser azul (488 nm). As amostras foram diluídas a uma concentração de 10^{-2} . Antes e após os tratamentos com alta pressão hidrostrática, coletou-se uma alíquota de 1 mL da suspensão celular em um microtubo. A alíquota foi centrifugada a 10.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em tampão PBS. O processo de lavagem foi realizado duas vezes. O software que acompanha o equipamento (CytExpert) foi então configurado para adquirir um número de eventos a cada 100 μ L por amostra.

4.8 Análise estatística.

Os gráficos foram feitos no software *Scidavis* (Versão 0.2.3) com utilização de média e desvio padrão para as barras de erros. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curvas de crescimento à 0,1 MPa.

A formação característica de precipitados de sulfeto de ferro preto durante o crescimento de BRS impede o uso de abordagens espectrofotométricas tradicionais para capturar dados de crescimento. Devido a isso, as análises de densidade óptica (DO_{630nm}) de crescimento das culturas bacterianas seguiram protocolo padronizado por Wood et al. (2019) que delinearam uma abordagem espectrofotométrica para estimar a massa celular de BRS por meio da adição de HCl.

A curva de crescimento de *D. alaskensis* em 0,1 MPa (Figura 12) demonstrou que essa bactéria teve um tempo de latência de, aproximadamente, 48 horas. Esta fase representa um período de transição para os microrganismos quando são transferidos para uma nova condição, pois é nessa fase que são sintetizadas as enzimas necessárias para que possam crescer no meio novo. Nesta fase não há aumento no número de células, mas há grande atividade metabólica, aumento do tamanho individual das células, do teor de proteínas, do DNA e do peso seco das células (BERTRANDA, 2019).

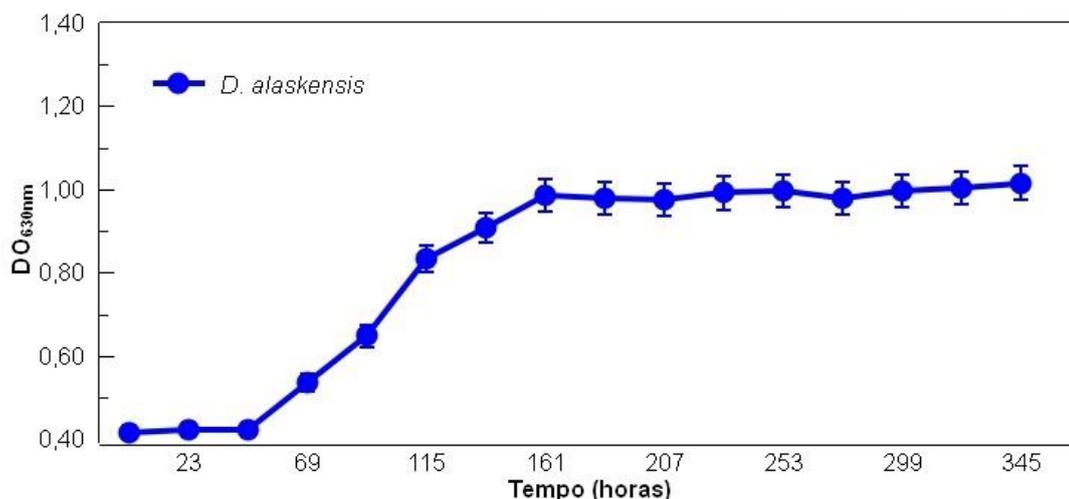


Figura 12: Curva de crescimento de *D. alaskensis* à 0,1 MPa. As leituras de densidade óptica foram feitas com a adição de 20 μ l de HCl (15%). As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas biológicas.

A bactéria *D. alaskensis* apresentou um tempo de geração de 103 horas, com a fase log durando aproximadamente 113 horas (5 dias). A cultura chegou na fase estacionária após 161 horas de incubação e permaneceu com a mesma concentração de células pelo tempo restante do experimento (aproximadamente 8 dias).

A figura 13 mostra a curva de crescimento da cultura mista BTB0119 por 15 dias à 0,1 MPa, demonstrando que BTB0119 teve um tempo de latência em torno de 46 horas. Além disso, os dados obtidos mostram que a cultura teve uma fase exponencial com duração de 276 horas (11 dias), atingindo seu crescimento máximo após 322 horas de incubação (14 dias). O tempo de geração estimado para esta cultura foi de 364 horas. As medições de DO_{630nm} mostraram que essa cultura teve um crescimento menor e mais lento quando comparado a *D. alaskensis* e BTB0419.

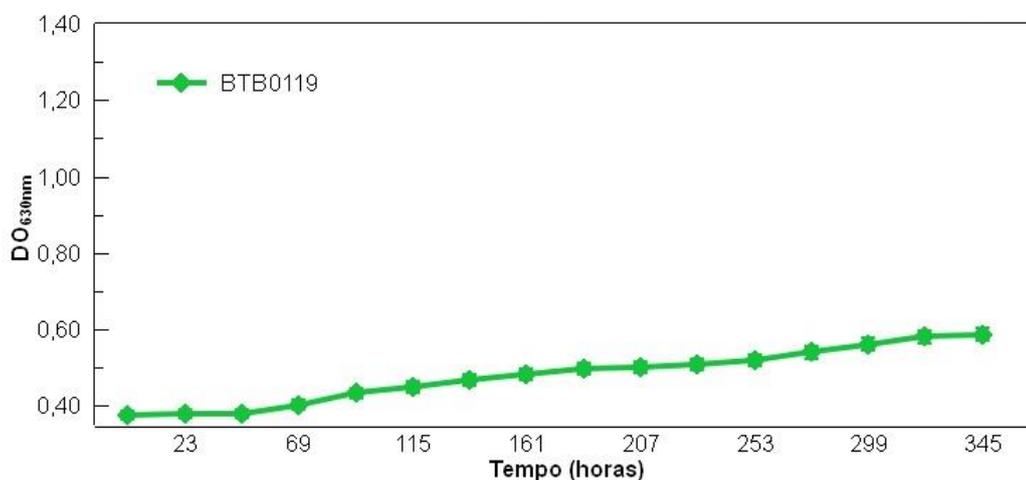


Figura 13: Curva de crescimento da cultura BTB0119 à 0,1 MPa. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas biológicas.

A figura 14 mostra a curva de crescimento estabelecida para a cultura mista BTB0419. O resultado mostra que BTB0419 possui fase *lag* de aproximadamente 46 horas de incubação. A fase exponencial dessa cultura possui tempo de 115 horas (4 dias). A cultura chegou na fase estacionária após 161 horas de incubação e

permaneceu com a mesma concentração de células pelo tempo restante do experimento (aproximadamente 9 dias).

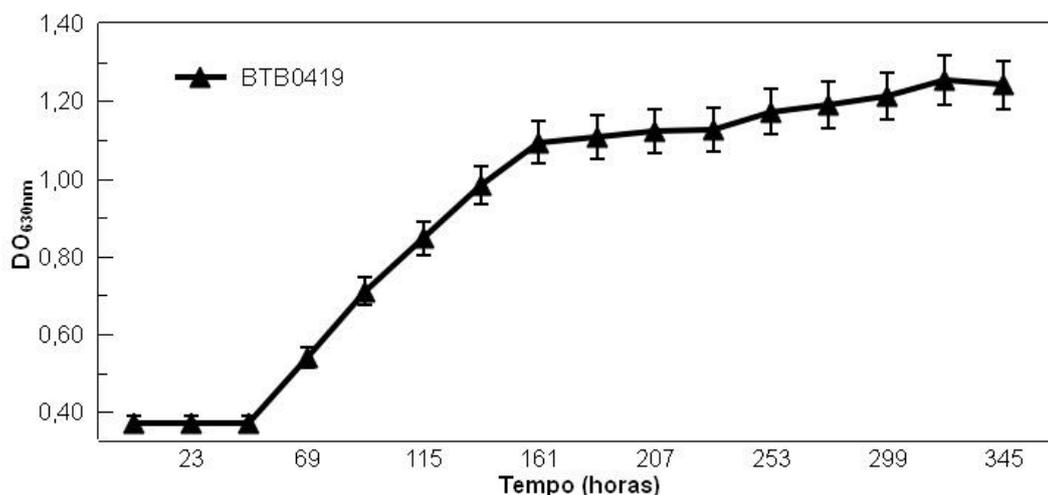


Figura 14: Curva de crescimento da cultura BTB0419 à 0,1 MPa. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas biológicas.

No trabalho de Wood et al. (2019), as leituras de densidade óptica após adição de HCl se mostram eficientes na padronização da curva de crescimento da cultura pura de *D. desulfuricans*. Os autores realizaram as medições de DO_{600nm} aplicando HCl em uma parte do material para a dissolução do precipitado de ferro e a outra parte somente foi adicionado água destilada. De acordo com a figura 15, o precipitado preto começou a se formar na cultura após aproximadamente 50 horas de incubação fazendo com as leituras corrigidas com ácido divergissem das leituras feitas usando água destilada. Os resultados obtidos pelos autores para as medições corrigidas com HCl mostraram que a fase de latência dessa bactéria foi em torno de 40 horas, seguida por 60 horas de fase exponencial (2 dias e meio). A fase estacionária foi atingida após 110 horas de incubação e o tempo de geração foi estimado em 23 horas.

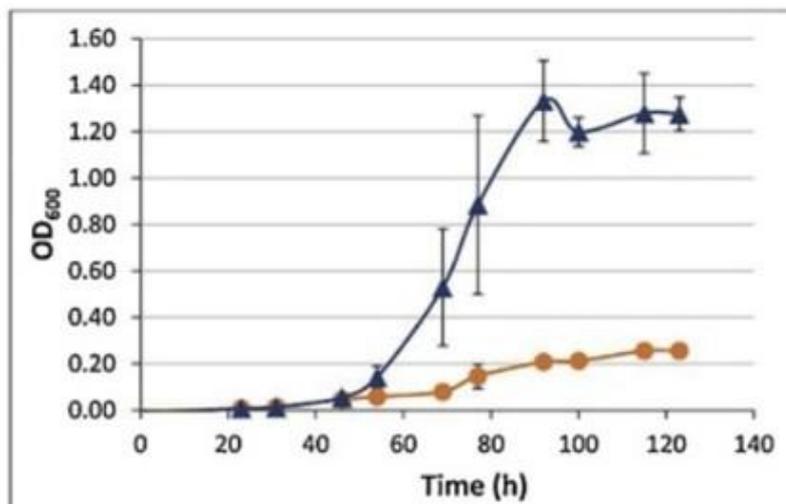


Figura 15: Curva de crescimento estabelecida para cultura pura de BRS *D. desulfuricans* à 0,1 MPa. A linha em azul representa a curva sem a adição de HCl e em laranja após remoção do precipitado preto por HCl. Fonte: WOOD et al. 2019.

No presente estudo, as curvas de crescimento das culturas de BRS foram validadas usando o método padronizado por Wood et al. (2019), que embora pouco difundido, possibilitou uma melhor compreensão das respostas de crescimento das culturas de BRS em pressão ambiente (0,1 MPa). Os resultados mostraram que essas bactérias tem como característica crescimento mais lento com baixa concentração celular e esse mesmo aspecto foi observado na curva de crescimento da cultura pura *D. desulfuricans* (WOOD et al. 2019). Além disso, foi observado nas culturas BTB0119 e BTB0419 um comportamento de crescimento com dois pontos de inflexão nas curvas. Esse fato pode ser em decorrência das amostras serem constituídas por culturas mistas de BRS e devido as interações sintróficas existentes nessas culturas, pois quando uma parte da população atinge a estabilização o subproduto gerado por ela é usado para o crescimento de outras espécies presentes na amostra (MORRIS et al. 2013).

5.2 Crescimento das culturas redutoras de sulfato sob alta pressão hidrostática.

5.2.1 Crescimento sob HHP por 20 horas seguido de crescimento 0,1 MPa por 28 dias

Neste experimento o efeito da HHP foi avaliado submetendo as culturas de BRS (BTB0119, BTB0419 e *D. alaskensis*) à 35 e 65 MPa por 20 horas e seu crescimento foi acompanhado por 28 dias a 0,1 MPa. Após os 28 dias de incubação, os métodos do NMP e leituras de DO_{630nm} foram usadas para avaliar o crescimento em função da pressão.

O NMP é o método tradicionalmente usado na indústria de petróleo e gás para estimar a concentração de microrganismos e a atividade redutora de sulfato de culturas de BRS por meio de diluições sucessivas da amostra em meio líquido (SHEN e VOORDOUW, 2015). O crescimento é identificado pela mudança de cor do meio de cultura, de incolor ou ligeiramente rosa para preto, devido à formação de precipitado de sulfeto de ferro (FeS) (Figura: 16) (CONTEC, 2016).



Figura 16: Crescimento de BRS evidenciado pela coloração negra caracterizada pela presença de FeS em amostras de *D. alaskensis* à 0,1 MPa. A: representa um frasco positivo (+) demonstrando crescimento; B: frasco negativo (-) demonstrando ausência de crescimento.

As estimativas obtidas pelo método NMP para a bactéria redutora de sulfato *D. alaskensis* demonstraram que em pressão ambiente (0,1 MPa) a concentração final de células foi de aproximadamente $4,2 \times 10^5$ por mL. Quando submetida a 35 MPa a

cultura pura apresentou menor crescimento, com número de células de $2,9 \times 10^2$ por mL. A 65 MPa a concentração final foi de $3,0 \times 10^5$ células/mL (Figura 17). De acordo as contagens do NMP *D. alaskensis* apresentou melhor crescimento quando cultivada à 0,1 MPa comparado aos tratamentos de 35 e 65 MPa. Entretanto, o parâmetro usado para medir o crescimento foi a observação do enegrecimento acentuado do meio devido a formação de FeS. Sendo assim, o dado observado em 0,1 MPa foi da formação de precipitado de ferro produzido e não crescimento de fato, uma vez que o NMP não realiza contagens diretas.

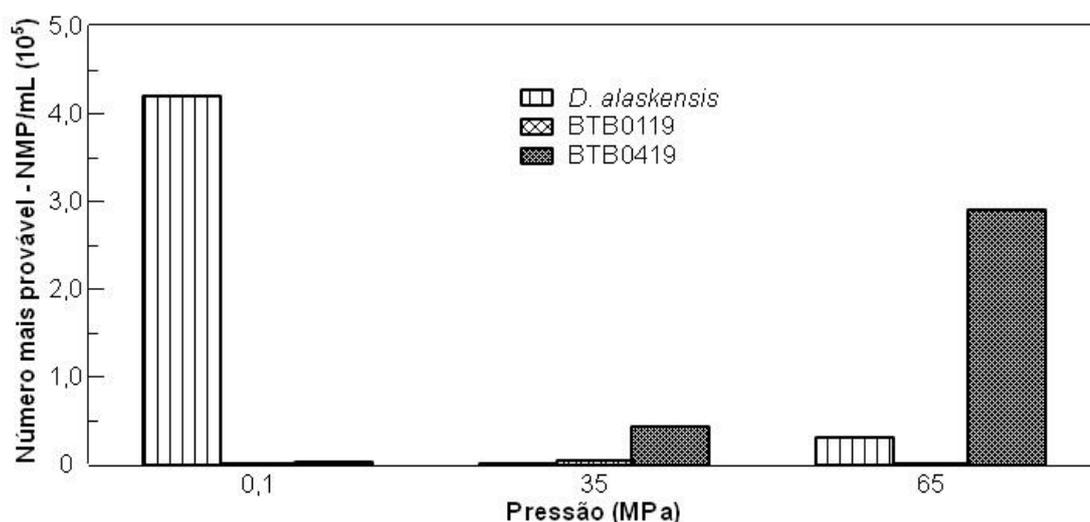


Figura 17: Número mais provável - NMP em função da pressão. As culturas de bactérias foram submetidas a 0,1, 35 e 65 MPa por 20 h. A viabilidade foi verificada por inoculação em meio Postgate C e cultivado por 28 dias em condições anaeróbias a 37 °C.

Os resultados obtidos para BTB0119 mostraram que quando cultivada à 0,1 MPa essa cultura apresentou uma concentração final de $4,2 \times 10^1$ células/mL. No tratamento de 35 MPa, o número de bactérias determinadas pelo método foi de $4,2 \times 10^3$ Células/mL e em 65 MPa apresentou mesma concentração de células observadas em 0,1 MPa (Figura: 17). Os dados do NMP demonstram que essa cultura obteve baixo crescimento em todos os valores de pressão analisados neste experimento. Este fato está associado a baixa quantidade de frascos positivos nas diluições.

As contagens do NMP obtidas para a cultura mista BTB0419 à 0,1 MPa foram de $2,1 \times 10^3$ células/mL (Figura 17). Os valores de crescimento obtidos nos tratamentos de HHP mostraram que em 35 MPa o número de células foi de $4,2 \times 10^4$ células/mL, seguido de $2,9 \times 10^5$ células/mL no tratamento de 65 MPa. Os dados mostram que após os tratamentos com HHP o crescimento dessa cultura foi melhor comparado a pressão ambiente (0,1 MPa), apresentado maior crescimento em 65 MPa. No entanto, os dados obtidos não representam o valor real de crescimento, visto que as medições foram visuais.

As abordagens envolvendo a aplicação do NMP em amostras coletadas de reservatório de petróleo, tem mostrado estudos voltados a detecção e enumeração de culturas de BRS, como no trabalho de Tuccar et al. (2019), em que as análises do NMP em amostras de água produzida, provenientes de um reservatório de petróleo em Diyarbakin, Turquia, localizado entre 1.600 e 2.600 m de profundidade (pressão entre 16 e 26 MPa), mostraram que na amostra coletada havia uma concentração de menos de 10 células de BRS por mL. Magot et al. (2004) avaliaram a concentração de células de *D. bastinii* existentes em uma amostra de água de produção oriunda de uma plataforma de produção *offshore* no campo de Emeraude no Congo. No entanto, os dados de profundidade do reservatório não foram descritos pelos autores, mas o valor do NMP dessa BRS foi de $2,5 \times 10^2$ células/mL.

Paralelamente ao método do NMP, medições por densidade óptica (DO_{630nm}) usando protocolo previamente estabelecido no item 5.1 foram utilizadas para avaliar o crescimento das culturas de BRS. Os dados obtidos da DO_{630nm} mostraram resultados diferentes dos observado usando o método NMP. A cultura pura *D. alaskensis* teve crescimento semelhante nos valores de 0,1 e 35 MPa, porém uma diminuição no crescimento foi observada quando a bactéria foi submetida a 65 MPa (Figura 18). Willianson et al. (2018) cultivaram *D. alaskensis* sob uma faixa de pressões entre 0,1–14 MPa, mostrando que 14 MPa é a pressão ótimo de crescimento para essa bactéria. No presente trabalho *D. alaskensis* apresentou alto crescimento em 0,1 e 35 MPa.

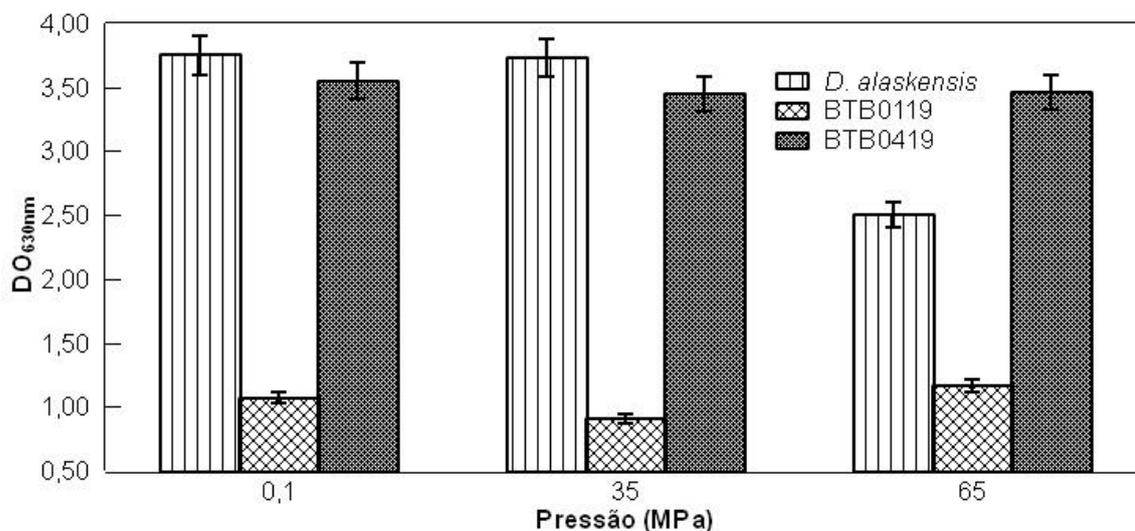


Figura 18: Crescimento das culturas de BRS em função da pressão. BTB019, BTB0419 e *D. alaskensis* foram submetidas à 35 e 65 MPa por 20 horas e seu crescimento foi acompanhado por 28 dias em 0,1 MPa. Após o término de incubação o crescimento foi avaliado por leituras de DO_{630nm}.

A cultura BTB0119 obteve baixos valores nas medições de DO_{630nm} quando submetida a HHP. O mesmo foi observado em pressão ambiente (0,1 MPa) (Figura 18). Os resultados mostram que essa cultura manteve baixo crescimento em todos os tratamentos, demonstrando que cultura possui característica piezotolerante, visto que ela apresenta o mesmo padrão de crescimento em todo o experimento. Dutta et al. (2019), mostraram que genes relacionados à absorção de nutrientes e estresse extracitoplasmático (*omp*, *rse C*), dobramento e desdobramento de proteínas (*dna K*, *gro EL* e outros) e mecanismos de reparo de DNA (*mut T*, *uvr* e outros) facilitam a tolerância à alta pressão por certos grupos de microrganismos.

A cultura mista BTB0419 apresentou a mesma (alta) concentração final de celular em todos os tratamentos, mostrando que a HHP não afetou seu crescimento (Figura 18). BTB0419 é uma cultura mista formada por diferentes espécies de BRS, coletada a uma profundidade de 3.080 m. Por ser oriunda de um ambiente de HHP, essa amostra apresentou melhor resposta adaptativa aos tratamentos avaliados neste experimento. Essa resposta é em decorrência de adaptações específicas como a modulação da composição de ácidos graxos de suas membranas, aumentando a proporção relativa de ácidos graxos insaturados em resposta ao aumento da pressão, a fim de manter a fluidez da membrana, evitando que os

lipídios da membrana se empacotem mais firmemente (SILIAKUS et al. 2017). Outras características incluem modificação da cadeia respiratória, a expressão de diferentes proteínas e a produção de osmólitos (SALVADOR-CASTELL et al. 2020).

O método padronizado por Wood et al. (2019) demonstrou-se mais preciso e mais rápido para avaliar os dados de crescimento de BRS em comparação ao método NMP. A técnica NMP demanda um tempo maior para obter os resultados devido as séries de diluições que necessitam de mais vidraria e meio de cultura. Além disso os resultados não são muito precisos por não utilizar de contagens diretas (COUTINHO et al. 2014).

A redução microbiana de sulfato a sulfeto (também conhecido como "acidificação" ou "*biosouring*" microbiana pela indústria de petróleo) é indiscutivelmente o processo microbiano mais deletério que os operadores de petróleo enfrentam durante a produção de petróleo. Por conta disso, compreender o papel que a pressão desempenha nesse processo é importante visando melhorar as estratégias de contenção de acidificação. A produção de H₂S em função da pressão com a técnica do número mais provável também foi possível acompanhar e avaliar a atividade redutora de sulfato (ARS) após 20 horas de incubação.

À pressão ambiente os resultados mostram que todas as culturas apresentaram alta redução de sulfato (>4). Em 35 MPa somente BTB0419 apresentou atividade redutora de sulfato alta, enquanto que BTB0119 e *D. alaskensis* apresentaram ARS relativamente moderada (>1.33). No tratamento de 65 MPa todas as culturas apresentaram ARS moderado (Figura 19).

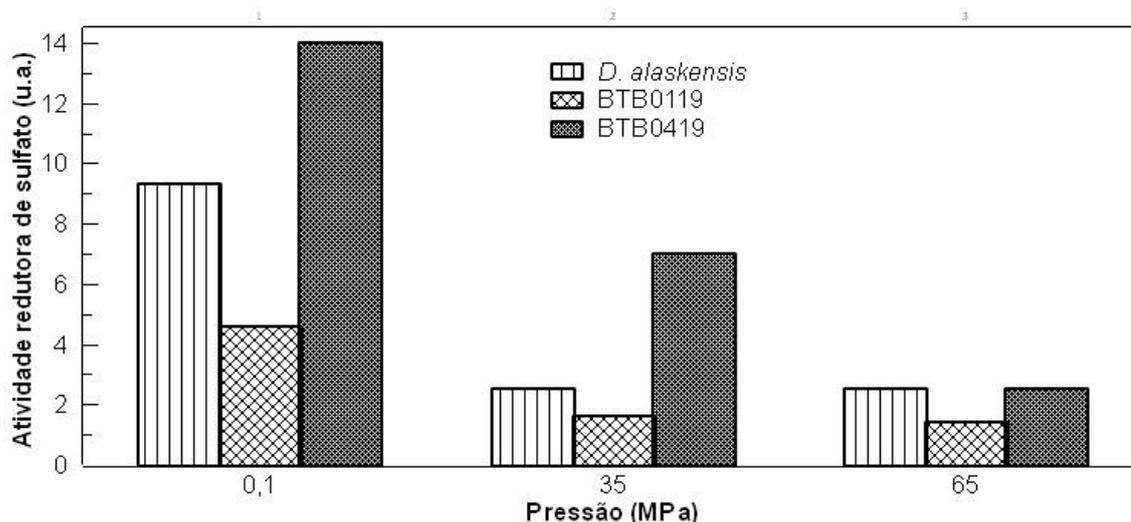


Figura 19: Atividade redutora de sulfato – ARS em função da pressão. A medição da ARS foi feita dividindo o número de dias em que o precipitado apareceu por 28. ARS é considerado baixo quando o valor é $\leq 1,33$; moderado entre 1,34 a 4 e alto quando > 4 .

5.2.2 Crescimento sob HHP por 28 dias.

Nas plataformas de extração de petróleo a corrosão é um problema comum que afeta a indústria petrolífera e a economia (MARIETOU et al. 2018). As culturas de bactéria utilizadas no presente trabalho foram extraídas do pós-sal, com as profundidades apresentadas no item 4.2. Essas culturas possuem alta capacidade corrosiva, por serem constituídas por bactérias redutoras de sulfato. Porém, não se tinha conhecimento se essas culturas seriam capazes de sobreviver a altas pressões caso esses fossem introduzidos no pré-sal carregados pela água de injeção.

Com o objetivo de avaliar o possível crescimento das culturas de BRS em diferentes profundidades, o experimento de 28 dias sob diferentes valores de pressão foi realizado. Nesse experimento, avaliou-se o efeito da pressão sobre o crescimento e a atividade redutora de sulfato das amostras BTB0119, BTB0419 e *D. alaskensis*, como demonstrado na figura 20 e tabela 2.

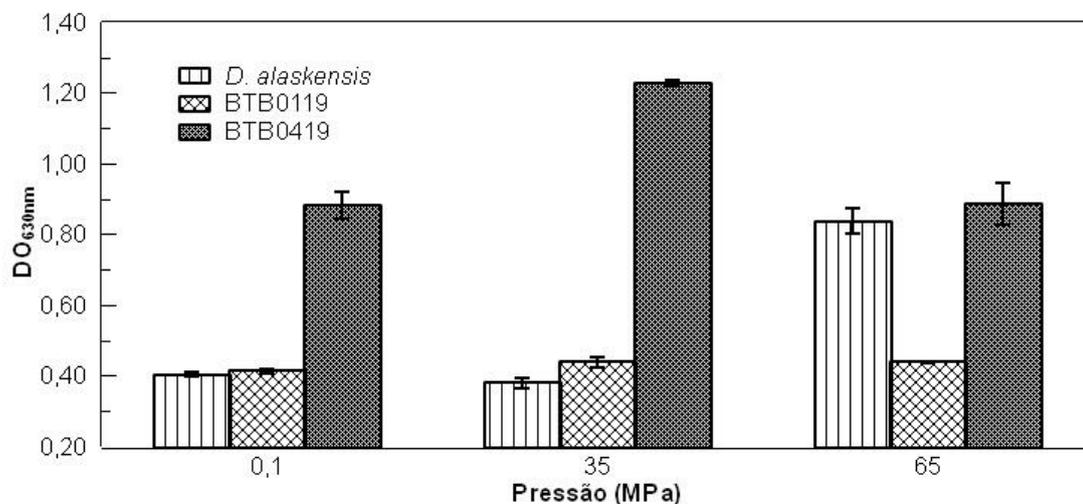


Figura 20: Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP no crescimento das culturas de BRS BTB0119, BTB0419 e *D. alaskensis* após 28 dias de incubação em 35 e 65 MPa. Após o período de incubação o crescimento foi avaliado por leituras de densidade óptica (DO_{630nm}).

A bactéria *Desulfovibrio alaskensis* foi coletada de um poço de petróleo acidificado na Baía de Purdu, no Alasca como descrito por Feio et al. (2004). No trabalho apresentado por Feio et al. (2004), não há descrições relacionadas à profundidade ou pressão do ambiente do qual ela foi extraída. No entanto, Williamson et al. (2018) avaliaram o crescimento dessa bactéria sob uma faixa de pressões entre 0,1 e 14 MPa, e foi observado um melhor crescimento em 14 MPa. Na literatura não há dados que demonstrem testes de pressão com essa bactéria com valores acima de 14 MPa. No presente trabalho, foi avaliado o crescimento da *D. alaskensis* em valores de pressão nunca antes estudados para esse organismo, demonstrando que a 65 MPa esse microrganismo apresentou maior crescimento quando comparado à pressão ambiente e 35 MPa (Figura 20).

A amostra BTB0419, coletada a uma profundidade de 3.080 metros, foi a que apresentou melhor crescimento nos valores de pressão testados (0,1, 35 e 65 MPa) quando comparado com *D. alaskensis* e BTB0119, apresentando melhor crescimento em 35 MPa e não havendo diferença entre o crescimento apresentado em 0,1 e 65 MPa, o que demonstra que 35 MPa é a pressão ótima de crescimento dessa cultura. A 3 km de profundidade, a pressão é de aproximadamente 30 MPa, o que corrobora com o resultado encontrado, uma vez que se espera que o crescimento ideal aconteça nas mesmas condições de onde a amostra foi isolada.

Em contrapartida, BTB0119 foi isolado a uma profundidade de 100 metros em relação ao nível do mar. A essa profundidade, a pressão não chega a 1 MPa. Porém, a pressão parece não afetar o crescimento dessas culturas, uma vez que o crescimento foi o mesmo em todos os valores de pressão avaliados (0,1, 35 e 65 MPa) o que demonstra que essa cultura possui resistência à HHP e pode sobreviver em profundidades maiores. Isso é um risco em potencial para a indústria petrolífera, uma vez que essa água de injeção pode ser inserida no sistema de recuperação de petróleo e carregar junto a ela esses microrganismos com grande potencial de corrosão que são capazes de sobreviver em diferentes profundidades, podendo afetar até mesmo a extração de petróleo do pré-sal, que apresenta pressões de 50 a 100 MPa.

A Tabela 2 é referente ao acompanhamento da atividade redutora de sulfato das culturas, no qual a avaliação foi feita por meio da formação de precipitado de sulfato ferroso no meio de cultura. As observações foram feitas antes de pressurizar as amostras (dia 1) e após os 28 dias de incubação. A BRS *D. alaskensis* apresentou ARS positivo em 0,1 e 65 MPa, porém em 35 MPa não houve precipitação de sulfato ferroso. BTB0119 apresentou precipitado somente em 0,1 MPa. PBTB0419 apresentou ARS positiva em todos valores de pressão avaliados.

Tabela 2: Atividade redutora de sulfato em função da pressão.

Amostras	0,1 MPa		35 MPa		65 MPa	
	Dia 1	Dia 28	Dia 1	Dia 28	Dia 1	Dia 28
<i>D. alaskensis</i>	-	+	-	-	-	+
BTB0119	-	+	-	-	-	-
BTB0419	-	+	-	+	-	+

Os resultados mostraram que todas as culturas avaliadas apresentaram adaptação à HHP. Porém, as culturas BTB0419 e *D. alaskensis* foram as que apresentaram

melhor crescimento quando comparado a BTB0119. Nesse contexto, sabe-se que a HHP afeta a estrutura de vários componentes e funções celulares, como a fluidez da membrana, a atividade e a estrutura das proteínas. O sucesso para o crescimento dessas culturas em HHP pode estar associada ao desenvolvimento de várias estratégias para lidar com a pressão hidrostática (BARTLETT, 2002; TAMBURINI et al. 2013).

Dentre essas características adaptativas incluem-se a síntese de ácidos graxos poli-insaturados (AGPs), com proporções que chegam a 70% do total de ácidos graxos (AGs) nas membranas dessas bactérias. A alta proporção de AGPs pode aumentar a fluidez da membrana em alta pressão hidrostática (ABE, 2013; BARTLETT, 2002). Um outro mecanismo descoberto é o acúmulo intracelular de osmólitos específicos em resposta ao aumento da pressão (também conhecidos como piezólitos). Esse processo é considerado uma estratégia dos piezófilos para proteger a estrutura das proteínas. Organismos como *P. profundum* acumula uma concentração maior de solutos intracelulares, preferencialmente β -hidroxibutirato e seus oligômeros, quando cresce sob HHP (28 MPa) do que a pressão atmosférica. Além disso, *D. hydrothermalis* aumenta a concentração intracelular de glutamato quando a pressão aumenta (0,1 a 26 MPa), sugerindo uma função piezólítica potencial. O efeito piezoprotetor desses solutos orgânicos provavelmente decorre da reorganização das moléculas de água favorecendo o dobramento e a estabilidade das proteínas (TAMBURINI et al., 2013).

Além disso, a sintrofia é uma importante interação mutualística que ocorre em muitos ambientes e é um processo essencial para a troca de elétrons e fontes de carbono entre diferentes espécies. A onipresença do metabolismo sintrófico entre os ambientes anóxicos enfatiza que a cooperação metabólica entre as espécies microbianas é frequentemente a regra, e não a exceção, e que o consórcio é a unidade catalítica do metabolismo anaeróbico (SIEBER; MCINERNEY; GUNSALUS, 2012).

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para avaliar o efeito da HHP na morfologia das culturas BTB0119 e BTB0419. As micrografias obtidas para cultura BTB0119, mostraram que a amostra é composta por bactérias com diferentes tipos morfológicos. Na figura 21 estão ilustradas as micrografias oriundas da análise microscópica da cultura BTB0119, no qual foram observadas células em formato de bacilos (A e C), vibríões (B e D) e cocos (B, C e D).

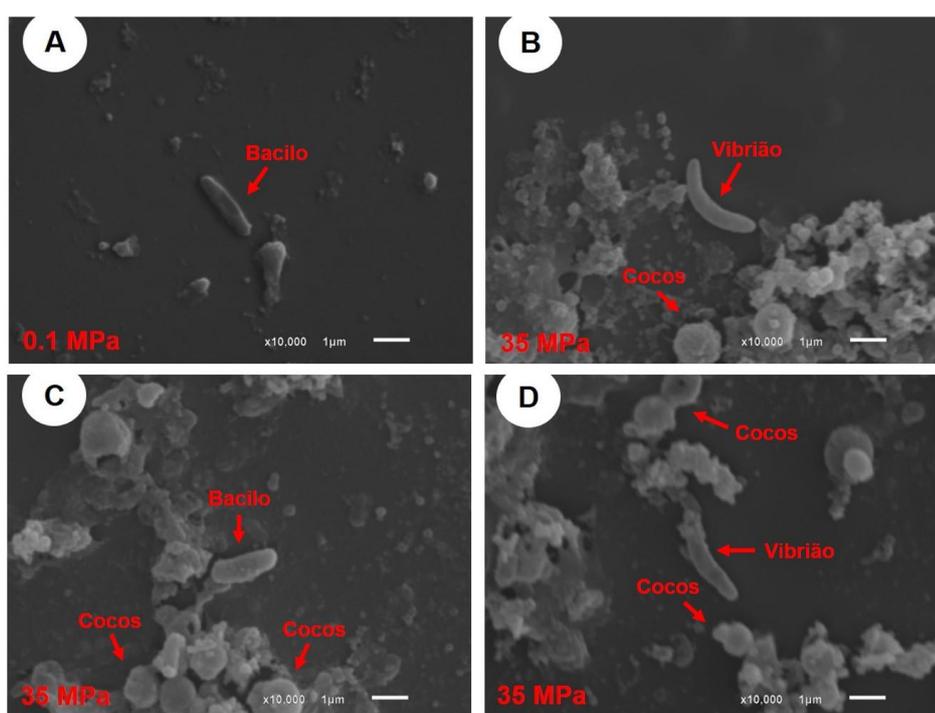


Figura 21: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de BTB0119 após 28 dias sob HHP, mostrando células com diferentes formatos: (A e C) bacilos, (B e D) vibríões, (B, C e D) cocos.

Além do mais, foi possível observar nas imagens B, C e D regiões em que há presença de bactérias envoltas por material polimérico extracelular (EPS). O EPS é responsável pela agregação dos microrganismos presentes em um biofilme, conferindo-lhes maior resistência à ação de agentes químicos e físicos (YIN et al. 2019).

Na figura 22 estão representados os resultados da análise de MEV da cultura BTB0419. As análises mostraram que a cultura também apresentou uma composição com diferentes morfotipos bacterianos, como hastes filamentosas (A, D e E), bastonetes (B e C) e cocos (C e D).

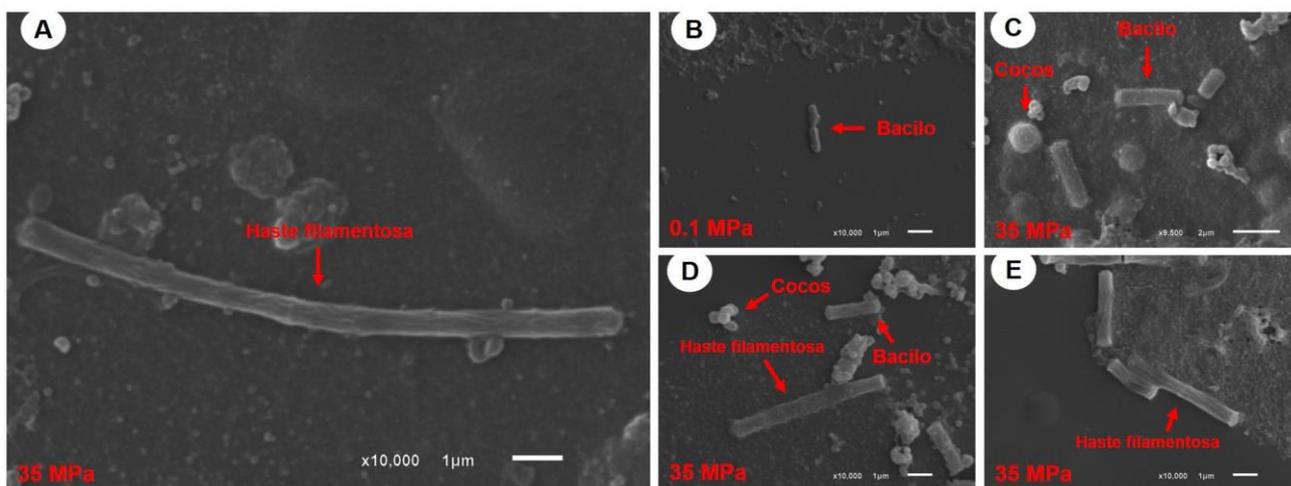


Figura 22: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de BTB0419 após 28 dias sob HHP, mostrando células com diferentes formatos: (A e E) hastes filamentosas, (B, C e D) bacilos, (C e D) cocos.

Após os 28 dias de incubação a 35 MPa, foi observado que algumas células presentes no enriquecimento coletado a 3.060 m cresceram em formato de filamentos longos e retos conforme demonstrado na figura 22 (A, D e E). De acordo com os trabalhos de Molina-Höppner et al. (2003) e Ishii et al. (2004) as células tornaram-se mais alongadas devido a efeitos de inibição da divisão celular, indicando uma resposta típica ao estresse. Segundo esses autores, a pressão exerce efeito inibitório na formação dos polímeros de FtsZ, que são as proteínas formadoras do septo em bactérias. Além disso, a formação de filamentos também pode ser mediada por uma resposta SOS disparada por pressão envolvendo a proteína RecD, que é essencial para recombinação e reparo de DNA (BIDDLE e BARTLETT, 1999).

Os aspectos morfológicos observados no presente trabalho estão de acordo com o descrito na literatura para BRS (CORD-RUWISCH et al. 1987). Ambas as amostras são constituídas por culturas mistas de BRS, com diferentes morfotipos conforme demonstrado nas figuras 21 e 22. Além disso, foi observado que a HHP não

ocasionou alterações na morfologia da cultura BTB0119. No entanto, foi verificada alterações após pressurização em algumas células de BTB0419.

5.4 Efeito da HHP na complexidade celular

As análises de citometria de fluxo foram usadas para monitorar a complexidade celular das culturas de BRS em função da pressão, por meio do espalhamento de luz. Os dados de dispersão foram coletados pelo detector óptico SSC (side scatter), que mede a dispersão lateral da luz. Os dados de SSC das amostras pressurizadas foram comparados com os dados das amostras cultivadas em pressão ambiente (0,1 MPa).

Os resultados da análise de citometria de fluxo das amostras após os tratamentos de 35, 65 e 0,1 MPa por 28 dias estão representados na figura 23. Ao longo do eixo x, está o parâmetro SSC, em escala logarítmica e no eixo y o número de eventos. As análises dos histogramas são feitas através do deslocamento da curva. Quanto mais próximo de 10^7 , maior é a dispersão da luz indicando maior complexidade celular e quanto mais próximo de 10^3 , menor é a dispersão, e assim, a complexidade.

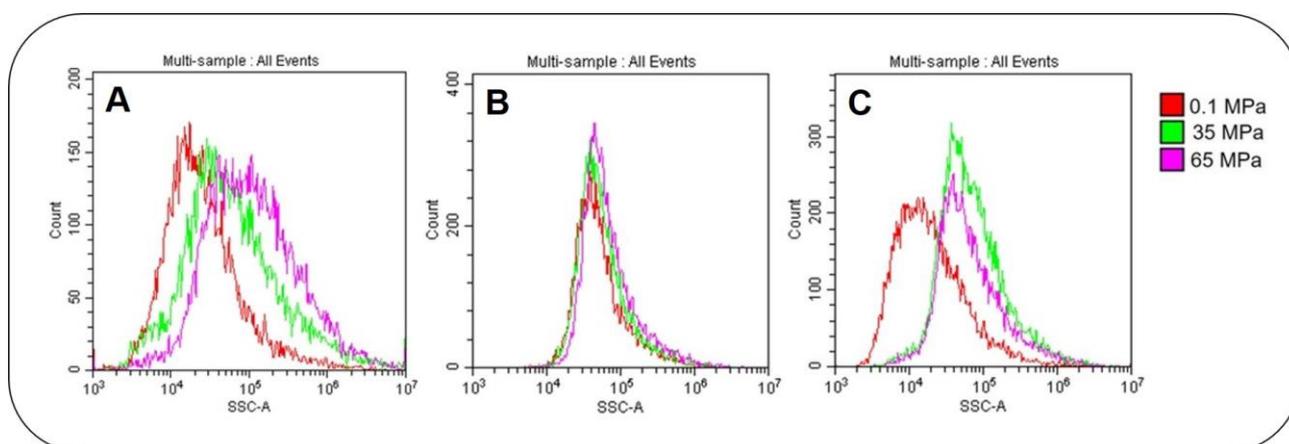


Figura 23: Histogramas de dispersão lateral da luz (SSC) das amostras em relação aos tratamentos de pressão hidrostática (0,1, 35 e 65 MPa). A: *D. alaskensis*; B: BTB0119; C: BTB0419.

Na figura 23 (A) estão representados os dados de complexidade celular da cultura pura *D. alaskensis*, demonstrando que houve diferença na complexidade a partir dos padrões de dispersão da luz, principalmente entre 0,1 MPa (vermelho) e 65 MPa (roxo). De acordo com o histograma, a cultura pura demonstrou menor espalhamento de luz lateral quando cultivada em 0,1 MPa em comparação à 35 e 65 MPa.

Os dados representados no histograma 23 (b) são referentes a cultura BTB0119. Os valores de dispersão lateral obtidos para essa cultura apresentaram o mesmo padrão em todos os tratamentos. Por outro lado, a cultura BTB0419 apresentou diminuição nos dados de dispersão em 0,1 MPa, assim como observado em *D. alaskensis*. Entretanto, nos tratamentos de 35 e 65 MPa houve um aumento em comparação a 0,1 MPa, mantendo perfil semelhante, conforme ilustrado no histograma 23 (c).

Embora normalmente associado à complexidade ou granulosidade celular, o SSC também é um parâmetro que pode ser correlacionado com a absorvância da parede celular bacteriana ou pela diferença no conteúdo celular (SYCURO et al. 2013). Alguns estudos têm demonstrado que o acúmulo interno de solutos (piezólitos) em bactérias piezófilas é muito comum, pois este processo estabiliza macromoléculas intracelulares contra alterações induzidas pela HHP, acarretando em alterações nos perfis de complexidade (GAYÁN et al. 2017; MARTIN et al. 2002; WILLIAMSON et al. 2018).

Nos experimentos aqui descritos, foi verificado que as culturas de *D. alaskensis* e BTB0419 demonstraram aumento na complexidade sob HHP. A diminuição nos dados de dispersão lateral adquiridos à 0,1 MPa pode estar relacionada ao fato dessa condição ser estressante para essas amostras, que possuem características piezófilas, ocasionando perda ou redução das estruturas intracelulares (SCHWENDNER e SCHUERGER, 2020). Não foram observadas mudanças nas medições da complexidade em BTB0119, evidenciando uma característica piezotolerante. As medições de SSC demonstraram que a HHP pode ter ocasionado alterações no conteúdo citoplasmático das células, contribuindo para as mudanças observadas nos valores de complexidade.

6. CONCLUSÃO

O método NMP se mostrou um bom método para avaliar BRS, porém não é preciso para a quantificação de microrganismo em experimentos laboratoriais ou pela indústria, uma vez que o método MNP não usa contagens diretas. Devido a necessidade de um método com maior exatidão, o NMP foi substituído pelo método de leitura por densidade óptica usando 15% HCl para remoção do sulfeto de ferro formado pela atividade redutora de sulfato dessas bactérias. Com a aplicação desse método, foi possível ter uma melhor compreensão das respostas de crescimento das culturas de BRS em condições experimentais.

Observou-se que à 65 MPa por 28 dias as culturas *D. alaskensis* e BTB0419 apresentaram melhor adaptação, evidenciando que essas culturas têm grande potencial de crescer e sobreviver em ambientes como o pré-sal, no qual a profundidade é em torno de 5.000 a 7.000 m, com valor de pressão média de 65 MPa. Resultado este, nunca antes estudados para esses organismos.

Curvas de crescimento em 0,1 MPa foram estabelecidas para as culturas de BRS utilizando o protocolo de leitura de DO_{630nm} após a remoção do precipitado preto (15% HCl). As análises mostraram que essas bactérias tem como característica o crescimento lento, apresentando um tempo de geração de 103 horas para *D. alaskensis*, 364 horas para BTB0119 e 92 horas para BTB0419.

Os tratamentos com HHP mostraram que a pressão exerceu grande influência no crescimento celular e na atividade redutora de sulfato das culturas de BRS. Nos tratamentos de 35 e 65 MPa por 20 horas foi observado que as culturas apresentaram crescimento mais lento quando comparado 0,1 MPa. Além disso, todas as culturas apresentaram alta ARS à 0,1 MPa, mas que diminui com o aumento da pressão.

O crescimento das amostras sob HHP por 28 dias mostrou que o enriquecimento de bactérias BTB0419, coletado de um ambiente de 3.060 m de profundidade apresentou melhor adaptação à 35 MPa, pressão equivalente do ambiente de

procedência dessa amostra. A cultura BTB0119, coletada a 100 m de profundidade teve o crescimento semelhante em todos os valores de pressão avaliados.

A cultura pura de *D. alaskensis*, oriunda de um reservatório de petróleo da Baía de Purdu, Alasca, teve seu crescimento avaliada em valores de pressão nunca antes testados para esse microrganismo, demonstrando que à 65 MPa *D. alaskensis* apresentou maior crescimento quando comparado a 35 e 0,1 MPa por 28 dias. Por ser uma cepa oriunda de um ambiente de reservatório de petróleo, essa cultura possui características adaptativas para sobrevivência à HHP.

As BRS têm como característica um tempo de geração longo com baixa concentração celular, fazendo o cultivo dessas bactérias demorado em condições laboratoriais. Esse aspecto do crescimento dessas bactérias é um mecanismo de resposta as condições extremas presentes nos ecossistemas de poço de petróleo (alta pressão e baixa concentração de nutrientes), o que justifica os resultados relativamente baixos nas medições por densidade óptica obtidos para as culturas de BRS quando comparado a outros microrganismos descritos na literatura (*E. coli* e *S. cerevisiae*), mostrando que mesmo sendo cultivadas em meio de cultura rico e sob HHP as culturas de BRS avaliadas no presente estudo ainda preservam suas características do ambiente onde foram coletadas.

Fotomicrografias eletrônicas das amostras BTB0119 e BT0419 revelaram culturas mistas de bactérias com diferentes tipos morfológicos como cocos, bastonetes, vibriões e hastes filamentosas, apresentando características semelhantes com o descrito na literatura para BRS. BTB0419 sob HHP apresentou células em formato de longos filamentos.

As análises de citometria de fluxo mostraram que HHP causou aumento na complexidade celular das amostras de *D. alaskensis* e BTB0419. O aumento da complexidade foi observado quando as amostras foram cultivadas sob 28 dias a 35 e 65 MPa. Os resultados são atribuídos a mudanças no conteúdo citoplasmático das células.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. Dynamic structural changes in microbial membranes in response to high hydrostatic pressure analyzed using time-resolved fluorescence anisotropy measurement. **Biophysical Chemistry**, v. 183, p. 3–8, 2013.
- ADENIYI, O. D.; NWALOR, J. U.; AKO, C. T. A review on waterflooding problems in Nigeria's crude oil production. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 362–365, 2008.
- Brazil's Pre-salt has Significant Potential. Stratas Advisors, 14 de maio de 2018. Disponível em: <<https://stratasadvisors.com/Insights/2018/051518-Brazil-Pre-Salt>>. Acesso em 10 de outubro de 2021.
- AHMED, T. Principles of Waterflooding. *In*: AHMED, T. **Reservoir Engineering Handbook**. 4. ed. Elsevier, 2010. p. 909–1095.
- AITANI, A. M. Oil Refining and Products. *In*: Cleveland, C. J. **Encyclopedia of Energy**. 4. ed. Elsevier, 2004. p. 715–729.
- AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-HINAI, B.; JOSHI, S. J.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; AL-SABAHI, J. Potential in heavy oil biodegradation via enrichment of spore forming bacterial consortia. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 6, n. 4, p. 787–799, 2016.
- ALAGORNI, A. H.; YAACOB, Z. BIN; NOUR, A. H. An Overview of Oil Production Stages: Enhanced Oil Recovery Techniques and Nitrogen Injection. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 6, n. 9, p. 693–701, 2015.
- AMRANI, A.; BERGON, A.; HOLOTA, H.; TAMBURINI, C.; GAREL, M.; OLIVIER, B.; IMBERT, J.; DOLLA, A.; PRADEL, N. Transcriptomics reveal several gene expression patterns in the piezophile *Desulfovibrio hydrothermalis* in response to hydrostatic pressure. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- ANANDKUMAR, B.; GEORGE, R. P.; MARUTHAMUTHU, S.; PARVATHAVARTHINI, N.; MUDALI, U. K. Corrosion characteristics of sulfate-reducing bacteria (SRB) and the role of molecular biology in SRB studies: An

overview. **Corrosion Reviews**, v. 34, n. 1–2, p. 41–63, 2016.

BARTLETT, D. H. Pressure effects on in vivo microbial processes. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1595, n. 1–2, p. 367–381, 2002.

BARTLETT, D. H.; LAURO, F. M.; ELOE, E. A. Microbial Adaptation to High Pressure. **Physiology and Biochemistry of Extremophiles**, p. 331–348, 2014.

BELL, E.; SHERRY, A.; PILLONI, G.; SUÁREZ-SUÁREZ, A.; CRAMM, M. A.; CUETO, G.; HEAD, I. M.; HUBERT, C. R. J. Sediment cooling triggers germination and sulfate reduction by heat-resistant thermophilic spore-forming bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 456–465, 2020.

BERTRANDA, R. L. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 7, 2019.

BIDLE, K. A.; BARTLETT, D. H. RecD function is required for high-pressure growth of a deep-sea bacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 8, p. 2330–2337, 1999.

BRAVIM, F.; LIPPMAN, S. I.; DA SILVA, L. F.; SOUZA, D. T.; FERNANDES, A. A. R.; MASUDA, C. A.; BROACH, J. R.; FERNANDES, P. M. B. High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093–2107, 2013.

CARIO, A.; JEBBAR, M.; THIEL, A.; KERVAREC, N.; OGER, P. H. Molecular chaperone accumulation as a function of stress evidences adaptation to high hydrostatic pressure in the piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 29483, p. 1–8, 2016.

CARIO, A.; OLIVER, G. C.; ROGERS, K. L. Exploring the Deep Marine Biosphere: Challenges, Innovations, and Opportunities. **Frontiers in Earth Science**, v. 7, n. 225, p. 1–9, 2019.

CHAWLA, R.; PATIL, G. R.; SINGH, A. K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 3,

p. 260–268, 2011.

CONTEC (Nº 2785). Monitoração, interpretação e controle da corrosão interna em dutos. **Comissão de normalização técnica, Petrobras**, 2016.

CORD-RUWISCH, R.; KLEINITZ, W.; WIDDEL, F. Sulfate-Reducing Bacteria and Their Activities in Oil Production. **JPT, Journal of Petroleum Technology**, v. 39, n. 1, p. 97–106, 1987.

COUTINHO, D. A.; GUERREIRO, L. T. A. G.; JUNIOR, W. B. C.; DE SANTANA, M. S.; PEREIRA, V. C.; PIMENTA, G.; ARAUJO, M.; LUTTERBACH, T. S. Estudo Comparativo entre as Técnicas do Número Mais Provável e PCR em Tempo Real para Quantificação de BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato) em Amostras no Setor de Óleo e Gás. **Intercorr**, 2014.

CYPIONKA, H. Biofilms and Fossilization Biosignatures in Rocks. **Encyclopedia of geobiology**, v. 853, p. 853–855, 2011.

DAVIDOVA, I.; HICKS, M. S.; FEDORAK, P. M.; SUFLITA, J. M. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 80–86, 2001.

JUNIOR, H. D. Introduction. *In*: JUNIOR, H. D. **Practical Petroleum Geochemistry for Exploration and Production**. 1. ed. Elsevier, 2017 p. 1–17.

DONG, Y. Analysis on anti-corrosion and anti-scaling technology of water injection well in oil production plant. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 514, n. 2, 2020.

DUTTA, A. PEOPLES, L. M.; GUPTA, A.; BARTLETT, D. H.; SAR, P. Exploring the piezotolerant/piezophilic microbial community and genomic basis of piezotolerance within the deep subsurface Deccan traps. **Extremophiles**, v. 23, n. 4, p. 421–433, 2019.

EDEN, B.; LAYCOCK, P. J.; FIELDER, M. Water injections and biogenic souring. *In*: EDEN, B.; LAYCOCK, P. J.; FIELDER, M. **Oilfield Reservoir Souring**. 1. ed. Health and safety executive, 1993, p. 13-16.

ENNING, D.; GARRELFIS, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New

views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014.

FACANHA, J. M. F. et al. Experimental Investigation of Wettability For Brazilian Pre-Salt Carbonates. **Rio Oi & Gas Expo and Conference 2016**, p. 24–27, 2016.

FEIO, M. J.; ZINKEVICH V.; BEECH, I. B.; LIOBET-BROSSA, E.; EATON, P.; SCMITT, J.; GUEZENEC et al. *Desulfovibrio alaskensis* sp. nov., a sulphate-reducing bacterium from a soured oil reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1747–1752, 2004.

FICHTEL, K.; LOGEMANN, J.; FICHTEL J.; RULLKOTTER, J.; CYPIONKA, H.; ENGELEN, B. Temperature and pressure adaptation of a sulfate reducer from the deep subsurface. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1078, p. 1–13, 2015.

FRAZER, L. C.; BOLLING, J. D. Hydrogen sulfide forecasting techniques for the Kuparuk River Field. p. 399–406, 1991.

FUMIYOSHI A. Effects of high hydrostatic pressure on microbial cell membrane: structural and functional perspectives. *In: Akasaka, K.; Matsuki, H. High Pressure Bioscience: Basic Concepts, Applications and Frontiers*. 1. ed. 2015, p. 627–659.

GANAT, T. Pumping System of Heavy Oil Production. *In: GOUNDER, R. M. Processing of Heavy Crude Oils - Challenges and Opportunities*, p. 1-26, 2019.

GAYÁN, E.; GOVERS, S. K.; AERTSEN, A. Impact of high hydrostatic pressure on bacterial proteostasis. **Biophysical Chemistry**, v. 231, p. 3–9, 2017.

GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 263–282, 2011.

GROSSI, V.; YAKIMOV, M. M.; ALI, B. A. TAPILATU, Y.; CUNY, P.; GOUTX, M.; CONO, V. L.; GIULIANO, L.; TAMBURINI, C. Hydrostatic pressure affects membrane and storage lipid compositions of the piezotolerant hydrocarbon-degrading *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain #5. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 2020–2033, 2010.

HAMILTON WA; LEE W. **Biocorrosion In: Barton L.L (eds) Sulfate-reducing Bacteria**. Boston: Biotechnology Handbooks, 1995.

JEANTHON, C.; HARIDON, S. L.; CUEFF, V.; BANTA, A.; REYSENBACH, A. L.; PRIEUR, D. *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2002, p. 765–772, 2002.

HOLUBNYAK, Y. I.; BREMER, M. J.; MIBECK, B. A.; HAMLING, J. A. Understanding the souring at Bakken oil reservoirs. **Proceedings - SPE International Symposium on Oilfield Chemistry**, v. 2, p. 803–808, 2011.

HÖÖK, M.; DAVIDSON, S.; JOHANSSON, S.; TANG, X. Decline and depletion rates of oil production: A comprehensive investigation. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 372, n. 2006, 2014.

HUBBARD, C. G. et al. Isotopic insights into microbial sulfur cycling in oil reservoirs. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–13, 2014.

ISHII, S. et al. Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. strain Tol 5. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 5026–5029, 2004.

JEBBAR, M. et al. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 721–740, 2015.

JIA, R. et al. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 137, n. November 2018, p. 42–58, 2019.

JØRGENSEN, B. B.; FINDLAY, A. J.; PELLERIN, A. The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–27, 2019.

JOSÉ MAURO DE MORAIS. **Petróleo em Águas Profundas: Uma história**

tecnológica da Petrobras na exploração e produção offshore. Brasília: Ipea, 2013.

KHOUZANI, M. K. et al. Microbiologically influenced corrosion of a pipeline in a petrochemical plant. **Metals**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2019.

KUSHKEVYCH, I. et al. Microscopic methods for identification of sulfate-reducing bacteria from various habitats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, 2021.

LE BIHAN, T. et al. Photobacterium profundum under Pressure: A MS-Based Label-Free Quantitative Proteomics Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

LIANG, Y. et al. **Special Focus on Produced Water in Oil and Gas Fields: Origin, Management, and Reinjection Practice.** [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

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

MAGO, M. et al. Desulfovibrio bastinii sp. nov. and Desulfovibrio gracilis sp. nov., moderately halophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1693–1697, 2004.

MANGILI, P. V.; AHÓN, V. R. R. Comparison of Pvt Correlations for Predicting Crude Oil Properties: the Brazilian Campos Basin Case Study. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 13, n. 3, p. 129–157, 2019.

MARDHIAL I, NORHARZILAN Y, ABDULHAH A, RASOL, R, R. A. S. A. **Effect of pH corrosion sulphate reducing Mardhiah 2014.pdf** **Journal of environmental science and technology**, 2014.

MARIETOU, A. et al. The effect of hydrostatic pressure on enrichments of hydrocarbon degrading microbes from the Gulf of Mexico following the deepwater Horizon oil spill. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–11, 2018.

MARIETOU, A.; BARTLETT, D. H. Effects of high hydrostatic pressure on coastal bacterial community abundance and diversity. **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 80, n. 19, p. 5992–6003, 2014.

MARTIN, D. D.; BARTLETT, D. H.; ROBERTS, M. F. Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. **Extremophiles**, v. 6, n. 6, p. 507–514, 2002.

MICHOUD, G.; JEBBAR, M. High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–10, 2016.

MOLINA-HÖPPNER, A. et al. Effects of pressure on cell morphology and cell division of lactic acid bacteria. **Extremophiles**, v. 7, n. 6, p. 511–516, 2003.

MORRIS, B. E. L. et al. Microbial syntrophy: Interaction for the common good. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 384–406, 2013.

MOUGIN, P. et al. Thermodynamic of thermochemical sulphate reduction. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 58, n. 3–4, p. 413–427, 2007.

MUGGERIDGE, A. et al. Recovery rates, enhanced oil recovery and technological limits. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 372, n. 2006, 2014.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008.

NOLAN, D. P. Overview of Oil, Gas, and Petrochemical Facilities. **Handbook of Fire and Explosion Protection Engineering Principles for Oil, Gas, Chemical, and Related Facilities**, p. 33–50, 2019.

OGER, P.; CARIO, A. La vie sous pression des microorganismes piézophiles. **Biologie Aujourd'hui**, v. 208, n. 3, p. 193–206, 2014.

PAPATERRA, G. E. Z. Guilherme Eduardo Zerbinatti Papaterra PRÉ-SAL : conceituação geológica sobre uma nova fronteira exploratória no Brasil PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOLOGIA Dissertação de Mestrado (Geologia) UFRJ Rio de Janeiro. 2010.

PEOPLES, L. M. et al. Peoples-2018-Vertically distinct microbial com.pdf. p. 1–21,

2018.

PICARD, A.; DANIEL, I. Pressure as an environmental parameter for microbial life - A review. **Biophysical Chemistry**, v. 183, p. 30–41, 2013.

PRADEL, N. et al. The First Genomic and Proteomic Characterization of a Deep-Sea Sulfate Reducer: Insights into the Piezophilic Lifestyle of *Desulfovibrio piezophilus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

PRAJAPAT, G. et al. Reservoir souring control using benzalkonium chloride and nitrate in bioreactors simulating oil fields of western India. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 132, n. January, p. 30–39, 2018.

RABUS, R.; HANSEN, T. A.; WIDDEL, F. **Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes**. [s.l.: s.n.].

RICCOMINI, C.; SANT'ANNA, L. G.; TASSINARI, C. C. G. Pré-sal: geologia e exploração. **Revista USP**, v. 0, n. 95, p. 33, 2012.

RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 659–672, 2010.

ROUMAGNAC, M. et al. Responses to the Hydrostatic Pressure of Surface and Subsurface Strains of *Pseudothermotoga elfii* Revealing the Piezophilic Nature of the Strain Originating From an Oil-Producing Well. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. December, 2020.

SALGAR-CHAPARRO, S. J. et al. Carbon steel corrosion by bacteria from failed seal rings at an offshore facility. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

SALVADOR-CASTELL, M.; OGER, P.; PETERS, J. High-pressure adaptation of extremophiles and biotechnological applications. **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**, p. 105–122, 2020a.

SALVADOR-CASTELL, M.; OGER, P.; PETERS, J. **High-pressure adaptation of extremophiles and biotechnological applications**. [s.l.] INC, 2020b.

- SCHWENDNER, P.; SCHUERGER, A. C. Exploring microbial activity in low-pressure environments. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 38, p. 163–196, 2020.
- SIAGIAN, U. W. R. et al. Oilfield Produced Water Reuse and Reinjection with Membrane. **MATEC Web of Conferences**, v. 156, p. 1–10, 2018.
- SIEBER, J. R.; MCINERNEY, M. J.; GUNSALUS, R. P. Genomic insights into syntrophy: The paradigm for anaerobic metabolic cooperation. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 429–452, 2012.
- SILIAKUS, M. F.; VAN DER OOST, J.; KENGEN, S. W. M. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. **Extremophiles**, v. 21, n. 4, p. 651–670, 2017.
- SIMON, J.; KRONECK, P. M. H. **Microbial Sulfite Respiration**. [s.l.: s.n.]. v. 62
- SIMONATO, F. et al. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 1, p. 11–25, 2006.
- SONG, G. et al. Aquathermolysis of conventional heavy oil with superheated steam. **Petroleum Science**, v. 6, n. 3, p. 289–293, 2009.
- TAMBURINI, C. et al. Prokaryotic responses to hydrostatic pressure in the ocean - a review. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 1262–1274, 2013.
- TÜCCAR, T. et al. Coexistence of sulfate reducers with the other oil bacterial groups in Diyarbakır oil fields. **Anaerobe**, v. 59, p. 19–31, 2019.
- VISHNYAKOV, V. et al. Oil recovery stages and methods. **Primer on Enhanced Oil Recovery**, p. 53–63, 2020.
- VOORDOUW, G. et al. Souring treatment with nitrate in fields from which oil is produced by produced water reinjection. **Proceedings - SPE International Symposium on Oilfield Chemistry**, v. 2, n. 1 mM, p. 651–653, 2011.
- WILKINS, M. J. et al. CO₂ exposure at pressure impacts metabolism and stress responses in the model sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–10, 2014.
- WILLIAMSON, A. J. et al. Dissimilatory sulfate reduction under high pressure by

Desulfovibrio alaskensis G20. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–10, 2018.

WOOD, J. L.; OSMAN, A.; WADE, S. A. An efficient, cost-effective method for determining the growth rate of sulfate-reducing bacteria using spectrophotometry. **MethodsX**, v. 6, n. June, p. 2248–2257, 2019.

YIN, W. et al. Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 2019.

ZHENG, X. et al. Corrosion behavior of the Ti-6Al-4V alloy in sulfate-reducing bacteria solution. **Coatings**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.