



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências da Biointeração
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

DIEGO CERQUEIRA MONTES

**Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas
de campos de petróleo como método de monitoramento de
Bactérias Redutoras de Sulfato- BRS**

Salvador-BA

2015

DIEGO CERQUEIRA MONTES

**Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos
de petróleo como método de monitoramento de Bactérias Redutoras de
Sulfato- BRS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia,
como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

**Salvador – BA
2015**

M772 Montes, Diego Cerqueira

Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos de petróleo como método de monitoramento de Bactérias Redutoras de Sulfato- BRS/ Diego Cerqueira Montes. – Salvador, 2015.

129 f.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2015.

1. Bactérias. 2. Microbiologia. 3. Sulfatos. 4. Petróleo. I. Chinalia, Fábio Alexandre. II. Almeida, Paulo Fernando III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 579.8

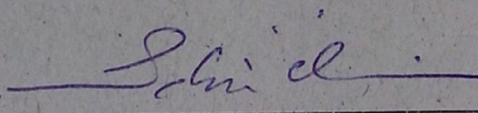
DIEGO CERQUEIRA MONTES

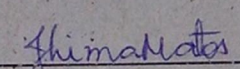
Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos de petróleo como método de monitoramento de bactérias redutoras de sulfato - BRS

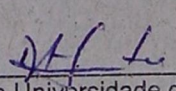
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 09 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Fábio Alexandre Chinalia – Orientador 
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,
ABDN, Escócia.
Universidade Federal da Bahia.

Josilene Borges Torres Lima Matos 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Dalva Aparecida de Souza 
Doutora em Ciências da Engenharia Ambiental pela Universidade de São Paulo,
USP, Brasil.
Universidade Federal de São Carlos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por acompanhar-me sempre.

Aos meus pais, José e Maria Helena, por todo amor, apoio e acolhimento em todos os momentos, pelo companheirismo, pela motivação nos momentos mais difíceis, pela confidencialidade e pelo carinho.

A minha irmã Paloma, pelo todo apoio, companhia, amizade.

Ao nobre Bobby, pelo seu companheirismo.

A toda minha família por acreditar em mim nessa etapa.

Ao meu orientador Professor Doutor Fabio Chinalia pela orientação científica, ensinamentos e credibilidade depositada.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Paulo Almeida pelo incentivo, pelos ensinamentos e pelas orientações.

A minha namorada Roberta.

A Roberta e Sueli, pelo companheirismo, parceria e pela amizade construída.

Ao Igor Sampaio pela grande ajuda no Laboratório e ao seu xará Igor Oliveira por acompanhar-me no cromatógrafo.

Aos meus pupilos do LABEM João e Luana.

Aos colegas do LABEM e dos Laboratórios parceiros.

Ao Neto, pelo auxílio no cromatógrafo.

As funcionárias do colegiado.

A PETROBRAS.

A Capes, pela bolsa concedida.

Enfim, a todos meus colegas e amigos que me ajudaram nessa caminhada.

MONTES, Diego Cerqueira. Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos de petróleo como método de monitoramento de Bactérias Redutoras de Sulfato-BRS. 129 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado)– Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

As Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são de enorme importância do ponto de vista industrial e ambiental. O sulfeto produzido pelas BRS constitui um grande problema para o setor petrolífero por causar a biocorrosão nas instalações e por ser tóxico ao ser humano. O monitoramento dessas bactérias é realizado com frequência a fim de qualificar o tratamento para prevenir a produção de sulfeto. O tratamento comumente utilizado é a injeção de biocidas cuja utilização deve ser proporcional a densidade de BRS a fim de minimizar danos econômicos e ambientais. O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um método indireto, baseado no consumo de aceptores de elétrons (sulfato) para monitorar populações de BRS. A metodologia consistiu, a princípio, no desenvolvimento de um método de análise por cromatografia de íons que, além do sulfato e nitrato, pode também separar outros 15 ânions como: tungstato, sulfeto, fosfato, molibdato, oxalato, nitrito, cloreto, piruvato, butirato, propionato, acetato, fluoreto, formiato, succinato e citrato. O método de avaliação foi testado para se ajustar aos padrões regidos pelo INMETRO e ANVISA (órgãos brasileiros de regulamentação). Adicionalmente foi realizada a adaptação de um método espectrofotométrico para determinação de sulfato para assim auxiliar o processo cromatográfico. O tempo de corrida no cromatografo foi de 45 minutos que foi inferior ao método fornecido pelo fabricante e com um LD de 574,2 e 127,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sulfato e nitrato, respectivamente. As análises espectrofotométricas foram eficientes para medir sulfato e nitrato entre o intervalo de 40 e 200 mg L^{-1} . A associação da cinética microbiana de crescimento e consumo de sulfato foi realizada em cultura pura de BRS e em cultura mista de amostras ambientais. Para testes com cultura pura foi utilizada uma cepa de BRS considerada como modelo experimental para o grupo, a bactéria *Desulfovibrio vulgaris*. Para testes com cultura mista foram utilizados consórcios microbianos coletados de amostras de água produzida de petróleo e do Rio Camarajipe, Salvador-BA. Foi observado que a *D. vulgaris* apresentou uma taxa de crescimento de $0,67 \text{ h}^{-1}$ em meio rico contendo sulfato, mas é capaz de crescer na presença de nitrato com taxas próximas de $0,34 \text{ h}^{-1}$ e um consumo de nitrato de $\cong 22 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esse resultado ilustra a ineficiência do uso isolado de nitrato para controlar BRS em poços de petróleo. Os testes relacionando a variação da densidade de *D. vulgaris* em meio de cultura com fonte de carbono e aceptor de elétron (SO_4^{2-}) em concentrações padronizadas demonstrou alta correlação linear ($R^2 \geq 99\%$). Esse resultado comprova a viabilidade de usar o Modelo de Monod para quantificar biomassa dessa cultura em apenas 12 horas de teste, ao invés de 28 dias como é o caso da técnica de NMP. A sensibilidade do método está entre as densidades de 10^2 - 10^8 cel/mL . Os resultados foram menos significativos com culturas mistas de BRS provinda de amostras ambientais, mas, os resultados sugerem que ajustes na técnica podem melhorar seu desempenho.

Palavras –chave: bactérias redutoras de sulfato – BRS, monitoramento, cromatografia de íons, cinética microbiana.

MONTES, Diego Cerqueira. Determination of sulfate and nitrate anions in aqueous samples of oil field as a monitoring method of sulfate reducing bacteria -SRB. 129 pp. ill. 2015. Master Dissertation– Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Sulphate reducing bacteria (SRB) are of significant environmental and industrial importance. SRB produces significant amounts of sulphite that can cause bio-corrosion on industrial installations and be toxic to humans. Monitoring the presence of such bacteria is an activity frequently required in order to determine treatment and prevent sulphite production during petrol exploration. Injection of biocides is commonly used for this purpose and should be proportional to SRB present in the environment in order to avoid economic and environmental drawbacks. The objective of this work was to develop an indirect method for monitoring SRB population in situ based on the consumption ratios of electron acceptors such as sulphate. First, it was necessary to adapt a chromatographic method for detecting ions such as sulphate and nitrate, but the approach has also showed to be successful for separating 15 other anions such as tungstate, sulphite, phosphate, molybdate, oxalate, nitrite, chlorate, pyruvate, butyrate, propionate, acetate, fluoride, formate, succinate and citrate. The chromatographic approach is robust to pass the “INMETRO” and “ANVISA”, the Brazilian regulation agencies. Additionally, the chromatographic approach was also tested against a spectrophotometric method for determine sulphate. The chromatographic run achieved was of 45 min only, compared to a longer period suggested by the manufacturer and with a detection limit of 574.2 and 127,1mg l⁻¹ for sulphate and nitrate, respectively. The spectrophotometric approach was efficient for detecting sulphate and nitrate at the range of 40 to 200mg l⁻¹. Sulphate consumption versus the biomass activity of SRB was first tested using pure culture and later with environmental mixed cultures. *Desulfovibrio vulgaris* was used as a biological model representing SRB for the tests with pure culture. Two different consortiums were used for testing environmental SRB mixed cultures, one collected at the Camarajipe River, Salvador-BA, and cells grown from industrial produced water obtained from oil wells. It was observed that *D. vulgaris* showed a growth rate of about 0,67 h⁻¹ in rich media with sulphate as sole electron acceptor, but the culture was also able to grow on nitrate with an average consumption of $\cong 22\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ and a growth rate of 0.34 h⁻¹. This result suggest the inefficiency of using nitrate as means to control SRB in oil wells once some SRB can utilize it as electron acceptors. Tests correlating the variation of *D. vulgaris* initial biomass with sulphate consumption rate at standard conditions of carbon source and electron acceptor concentrations showed to be of statistical significance ($R^2 \geq 99\%$). This result strongly support the tested method, which is based on the Monod model, for measuring bacterial biomass within only 12 hours instead of 28 days such as required by the most probable number technique (MPN). The sensitivity of the method was set between 10²-10⁸ cel/ml, but the results were less significant when tested with mixed environmental cultures. Nonetheless, the result showed that some adjustment in the technique may improve its performance.

Key Words: sulphate-reducing bacteria- SRB, microbial monitoring, ions chromatography, microbial kinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação da biocorrosão do ferro por BRS com base na teoria de depolarização catódica: I dissolução ferro; II, dissociação da água; III, a redução de prótons; IV, a redução do sulfato pela bactéria e V, a precipitação de sulfeto....	26
Figura 2	Principais espécies de enxofre em diferentes estados de oxidação.....	28
Figura 3	Principais transformações do enxofre.....	29
Figura 4	Mecanismo da redução biológica do sulfato. (a) As duas formas metabólicas redutoras; (b) enzimas essenciais que participam do processo de redução.....	30
Figura 5	Metabolismo do enxofre. A via destacada é a redução assimilativa do sulfato.....	33
Quadro 1	Classificação das técnicas para determinação simultânea de cátions e ânions por CI.....	39
Figura 6	Esquema representando o sistema de cromatografia por troca iônica com supressora e detector de condutividade.....	40
Figura 7	Diagrama de supressão de eluente para cromatografia iônica.....	40
Figura 8	Sequência de etapas da metodologia abordada nesse trabalho.....	43
Figura 9	Diagrama do resumo de ensaios de cinética para BRS.....	49
Figura 10	Resumo da metodologia cinética de crescimento em meios com tratamentos diferentes.....	52
Figura 11	Esquema resumido da curva de crescimento da microbiota da amostra. Proporção inóculo/meio de cultura = 1:9.....	58
Figura 12	Esquema do procedimento para determinação de sulfeto	61
Figura 13	Cromatograma com programa de gradiente, observado na reta inclinada e descrito no eixo vertical direito, obtido pelo fabricante Dionex a partir da coluna AS11-HC, a 30°C e fluxo de 1mL/min.....	63
Figura 14	Cromatograma da injeção de água ultrapura utilizando o mesmo programa de eluição desenvolvido neste trabalho.....	64
Figura 15	Cromatograma com padrões para 17 analitos: 1 –Fluoreto- $t_R=8,18$; 2- Acetato- $t_R=9,09$; 3 –Propionato- $t_R=10,40$; 4 –não identificado- $t_R=11,40$; 5 –Butirato- $t_R=12,73$; 6 –Piruvato- $t_R=13,13$; 7 –Cloreto- $t_R=15,25$; 8 –Nitrito- $t_R=16,07$; 9 –Nitrato- $t_R=18,98$; 10 –não identificado- $t_R=19,20$; 11 –Carbonato- $t_R=19,81$; 12 –	

	Interferente- $t_R=20,46$; 13 – Sulfato- $t_R=20,86$; 14 – Oxalato- $t_R=21,75$; 15 – Tungstato- $t_R=24,53$; 16 – Molibdato – $t_R=25,98$; 17 – Fosfato- $t_R=26,81$; 18 – Sulfeto – $t_R=28,14$; 19 – não identificado – $t_R=30,06$	65
Figura 16	Comparação entre amostras (padrões) injetadas no CI. A- Padrões com 17 ânions (analitos) a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, B- Padrões a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e nitrato a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (identificado pela seta), C – Padrões $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e sulfato a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (identificado pela seta).....	66
Figura 17	Curvas de calibração no CI: A- Nitrato; B- Sulfato.....	68
Figura 18	Faixa linear entre 95% e 105%: A – Nitrato $2000\text{-}3500 \mu\text{g L}^{-1}$; B – Sulfato $2000\text{-}3500 \mu\text{g L}^{-1}$	69
Figura 19	Valores de absorvância para cada concentração de sulfato ($1\text{-}800 \text{mg L}^{-1}$). Espectrofotômetro 1- Biospectro sp22.....	70
Figura 20	Valores de absorvância para cada concentração de sulfato ($40\text{-}200 \text{mg L}^{-1}$) dentro da faixa linear de quantificação. Espectrofotômetro 1- Biospectro sp22.....	71
Figura 21	A- meio de cultura <i>Desulfovibrio</i> DSMZ-63 autoclavado com indicativo de pouca concentração de oxigênio; B – meio de cultura <i>Desulfovibrio</i> DSMZ-63 autoclavado com indicativo de ausência de oxigênio; C- meio de cultura <i>Desulfovibrio</i> DSMZ-63 após crescimento de BRS.....	72
Figura 22	Curva de crescimento (contagem direta, DO <i>versus</i> tempo de crescimento) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> em meio <i>Desulfovibrio</i> -Broth (DSMZ-63), (●) Contagem por microscopia de epifluorescência com laranja de acridina, (◆) Densidade ótica 560nm	73
Figura 23	Correlação entre contagem por Microscopia de epifluorescência com laranja de acridina (MELA) <i>versus</i> Densidade ótica (560nm).....	74
Figura 24	Curva de crescimento <i>Desulfovibrio vulgaris</i> em meio <i>Desulfovibrio</i> -Broth (DSMZ-63) com diferentes tratamentos (concentrações sulfato, nitrato e cloreto): T1- 3000mg L^{-1} [sulfato], 800mg L^{-1} [Cl ⁻] e ausência de nitrato; T2 – 3000mg L^{-1} [sulfato], 800mg L^{-1} [Cl ⁻] e 320mg L^{-1} [NO ₃ ⁻] ($\cong 5\text{mM}$); T3 – 3000mg L^{-1} [sulfato], 1000mg L^{-1} [Cl ⁻] (acrécimo de $\cong 5\text{mM}$) e sem nitrato; T4 – ausente de sulfato, 1600mg L^{-1} [Cl ⁻], 360mg L^{-1} [NO ₃ ⁻] ($\cong 5,5\text{mM}$).....	76
Figura 25	Comparação do consumo de SO ₄ ²⁻ por <i>D. vulgaris</i> em três condições distintas: T1 – meio DSMZ, 3000mg L^{-1} [SO ₄ ²⁻]; T2 – meio DSMZ e 5mM [NO ₃ ⁻]; T3 – meio DSMZ com acréscimo de 5mM [Cl ⁻]; T4 meio DSMZ sem sulfato e com nitrato a $\cong 5,5\text{mM}$. Assim como, comparação do consumo NO ₃ ⁻ para T2 e T4.....	78
Figura 26	Correlação entre o ln da população <i>D. vulgaris</i> <i>versus</i> consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 1 (Biospectro sp22).....	84

Figura 27	Correlação entre o ln da população <i>D. vulgaris</i> versus consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.....	85
Figura 28	Curva de crescimento da microbiota (BRS) da água Costa Azul em meio Postgate-modificado.....	93
Figura 29	Curva de crescimento da microbiota (BRS) da água produzida em meio Postgate-modificado.....	95
Figura 30	Microscopia de epifluorescência com laranja de acridina (MELA) de uma cultura <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , aumento 1000x, em meio <i>Desulfovibrio</i> (DSMZ-63)ausente de ferro.....	99
Figura 31	Microscopia de epifluorescência com DAPI (MEDAPI) de uma cultura <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , aumento 1000X, em meio de cultura <i>Desulfovibrio</i> (DSMZ-63) ausente de ferro	100
Figura 32	Valores da absorbância para cada concentração de sulfeto padrão (1-200 mg L ⁻¹) utilizando Leitor de ELISA Bio-Tek EL800	102
Figura 33	Valores da absorbância para cada concentração de sulfeto padrão (1-50 mg L ⁻¹) utilizando Leitor de ELISA Bio-Tek EL800	102
Figura 34	Microscopia ótica com coloração GRAM de uma cultura <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , aumento 1000X, em meio <i>Desulfovibrio</i> (DSMZ-63).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das BRS com sua determinada reação metabólica.....	27
Tabela 2	Reações das redutoras de sulfato, metanogênicas, e acetogênicas.....	31
Tabela 3	Resumo das faixas de Eh para cada metabolismo com sua reação predominante.....	32
Tabela 4	Disposição do sulfeto de hidrogênio no meio aquoso de acordo com o pH.....	32
Tabela 5	Resumo demonstrativo dos métodos utilizados para detecção e monitoramento de BRS	37
Tabela 6	Comparação entre métodos de cromatografia de íons utilizando programa de eluição por gradiente e isocrático, detector de condutividade e coluna AS11-HC (Dionex, USA).....	42
Tabela 7	Reagentes da solução condicionante	49
Tabela 8	Valores de volumes de inóculos, resuspensão e fatores de concentração do processo de concentração e diluição através da centrifugação.....	54
Tabela 9	Figuras analíticas para os 14 ânions identificados por CI-condutividade..	67
Tabela 10	Limites de detecção e quantificação de nitrato e sulfato por CI-condutividade.....	68
Tabela 11	Resumo dos resultados da concentração de sulfato dos padrões (1- 1000 mg L ⁻¹) com seus respectivos desvios.....	70
Tabela 12	Valores obtidos na curva de crescimento (contagem direta por MELA , DO versus tempo de crescimento) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> em meio Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63).....	73
Tabela 13	Parâmetros cinéticos para a curva de crescimento de <i>D.vulgaris</i> em meio DSMZ-63 a 38°C, sendo N= população final e N ₀ = população inicial.....	74
Tabela 14	Valores do limite de detecção para a DO560 de <i>D. vulgaris</i> em meio DSMZ-63.....	75
Tabela 15	Parâmetros cinéticos para as curvas de crescimento de <i>D.vulgaris</i> em meio DSMZ-63 a 38°C com diferentes tratamentos.....	77
Tabela 16	Parâmetros cinéticos comparando o crescimento de <i>D. vulgaris</i> em quatro condições distintas e os respectivos consumos de sulfato e nitrato.....	78

Tabela 17	Relação entre tratamento, densidade ótica e densidade bacteriana.....	80
Tabela 18	Concentrações iniciais e finais para cada diluição do inóculo.....	80
Tabela 19	Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de <i>D.vulgaris</i> . Estabilização após 5 dias a 38°C em meio DSMZ-63 e leituras realizadas até 13 dias.....	81
Tabela 20	Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de <i>D.vulgaris</i>	82
Tabela 21	Resultado do NMP para população de <i>D. vulgaris</i> no tempo de 1h-T1 após inóculo e o tempo de 6h –T6.....	82
Tabela 22	Resultado da concentração de sulfeto e produção para cada população da cultura de <i>D. vulgaris</i> . Determinação de sulfeto por espectrofotometria e coeficiente de correlação de 0,98.....	83
Tabela 23	Resultado da concentração de sulfato para cada população da cultura de <i>D. vulgaris</i> no tempo 1 e 6h e o consumo por hora. Determinação de sulfato com o Espectrofotômetro 1 - Biospectro sp22.....	83
Tabela 24	Dados da população de <i>D. vulgaris</i> por NMP, ln da população e consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 1 (Biospectro sp22).	84
Tabela 25	Resultado da concentração de sulfato para cada população da cultura de <i>D. vulgaris</i> no tempo 1 e 6h e o consumo por hora. Determinação de sulfato com o Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.....	85
Tabela 26	Dados da população de <i>D. vulgaris</i> por NMP, ln da população e consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.....	85
Tabela 27	Comparação das duas contagens (direta e NMP) da população de micro-organismos presente no meio de cultura DSMZ-63 no tempo 1h (T1) e tempo após 3h de incubação a 38°C (T4) e com volumes variados (20, 30 e 50% v/v) de inóculo (água produzida).....	87
Tabela 28	Comparação das duas contagens (direta e NMP) da população de micro-organismos presente no meio de cultura Postgate-modificado no tempo 1h (T1) e tempo após 3h de incubação a 38°C (T4) e com volumes variados (20, 30 e 50% v/v) de inóculo (água produzida).....	87
Tabela 29	Concentração de sulfato e cinética de consumo da cultura de água produzida em meio DSMZ-63 e com variação de inóculo (água produzida).....	88
Tabela 30	Concentração de sulfato e cinética de consumo da cultura de água produzida em meio POSTGATE-MODIFICADO e com variação de inóculo (água produzida).....	89

Tabela 31	Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para a população inicial de BRS após uma hora da inoculação (T1) presente na água Costa Azul.....	90
Tabela 32	Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para a população inicial de BRS após uma hora da inoculação (T1) presente na água produzida.....	90
Tabela 33	Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para a população inicial de BRS após uma hora da inoculação (T1) presente na água produzida concentrada.....	90
Tabela 34	Resumo do resultado do NMP para a população inicial de BRS das três culturas após uma hora da inoculação (T1).....	91
Tabela 35	Resultado da concentração de sulfato para as culturas no tempo de 1 hora- T1 e no tempo de 6 horas –T6. Determinação de sulfato com Espectrofotômetro 1 – Biospectro sp22.....	91
Tabela 36	Resumo dos resultados da concentração de sulfato das culturas em cada tempo, assim como, a diferença e o consumo após 5h de incubação.....	92
Tabela 37	Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada tempo de incubação da microbiota (BRS) presente na água Costa Azul.....	92
Tabela 38	Resultados da contagem por NMP das populações da microbiota da água Costa Azul em diferentes tempos de incubação (T0, T5, T8 e T15).	93
Tabela 39	Parâmetros cinéticos para a curva de crescimento de BRS da água Costa Azul em meio Postgate-modificado.....	94
Tabela 40	Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada tempo de incubação da microbiota (BRS) presente na água produzida.....	94
Tabela 41	Resultados da contagem por NMP das populações da microbiota da água Costa Azul em diferentes tempos de incubação (T0, T5, T8 e T15).	95
Tabela 42	Parâmetros cinéticos para a curva de crescimento de BRS da água Costa Azul em meio Postgate-modificado.....	95
Tabela 43	Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de BRS da água Costa Azul. Estabilização após 13 dias a 38°C em meio Postgate modificado e leituras realizadas até 33 dias.....	96
Tabela 44	Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de BRS da água Costa Azul em meio Postgate-modificado a 38°C	97

Tabela 45	Resultado do NMP para os dois tempos 1h-T1 e 6h-T6 da população de BRS da água Costa Azul e população considerada para o consumo de sulfato.....	97
Tabela 46	Resultado da concentração de sulfato para as culturas Costa azul no tempo de 1 hora- T1 e no tempo de 6 horas –T6. Determinação de sulfato por cromatografia íons.....	98
Tabela 47	Resultado da concentração de sulfato para cada população (FM, 1D, 2D, 3D e 4D) da cultura BRS Costa Azul no tempo 1 e 6h e o consumo por hora. Determinação de sulfato por cromatografia íons.....	98
Tabela 48	Tempo de estabilização de crescimento de BRS do número mais provável –NMP a 38°C para inóculos e meio de cultura diferentes.....	100
Tabela 49	Valores de absorvância em triplicata para cada concentração de sulfeto padrão (1-200 mg L ⁻¹) utilizando Leitor de ELISA - Bio-Tek EL800.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association Of Official Analytical Chemists</i>
AP	Água Produzida
AP-C	Água Produzida Concentrada
APS	Sulfato De Adenilil ou Adenosina Fosfosulfato
APSr	<i>Adenosine Phosphosulfate Reductase</i>
ASr	Sulfito Redutase de Assimilação
ASTM	<i>American Society For Testing and Materials</i>
BAC	Cloreto De Benzalcônio
BRN	Bactérias Redutoras de Nitrato
BRNh	Bactérias Redutoras de Nitrato Heterotróficas
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CA	Costa Azul
CI	Cromatografia De Íons
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
DAPI	4'6'-Diamidino-2- Fenilindol
DMS	Dimetilsulfeto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
DO560	Densidade Ótica a 560nm
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
Dsr	Dissimilativa Sulfito Redutase
Eh	Potencial Redox
EUK-NR	Nr Assimilativa Eucariotica
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>

FISH	<i>Fluorescent In Situ</i> Hybridization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LABEM	Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEDAPI	Microscopia de Epifluorescência com Dapi
MELA	Microscopia de Epifluorescência com Laranja de Acridina
MGD	Molibdopterina Guanina Dinucleotídeo
<i>MOC</i>	Matéria Orgânica Complexa
NAP	Nitrato Redutase Dissimilativa Periplasmática
NAR	Nitrato Redutase Respiratória
NMP	Número Mais Provável
NRases	Enzima Nitrato Redutase - Nrase
PAPS	Sulfato De 3' - Fosfoadnilil
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PEEK</i>	<i>Polyether Ether Ketone</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
THPS	Tetrakis (Hidroximetil) Fosfônio Sulfato
<i>USEPA</i>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	JUSTIFICATIVA	23
4	REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1	INDÚSTRIA DO PETRÓLEO	24
4.2	CORROSÃO MICROBIOLÓGICA INDUZIDA- CMI	24
4.3	BACTÉRIA REDUTORA DE SULFATO (BRS).....	26
4.4	SOBRE O ENXOFRE	28
4.5	ADENOSINA FOSFOSULFATO REDUTASE	33
4.6	NITRATO REDUTASE	34
4.7	CONTROLE E MONITORAMENTO DAS BRS.....	35
4.8	CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUÇÃO POR TROCA ANIÔNICA PARA QUANTIFICAR NITRATO E SULFATO	38
5	MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ANÁLISE DE ÂNIONS POR CROMATOGRAFIA	43
5.1.1	O Cromatógrafo de íons e o método	44
5.1.2	Preparo das soluções e amostra	45
5.1.3	Parâmetros analíticos	45
5.1.4	Injeção do meio de cultura e água produzida no cromatógrafo	47
5.2	DETERMINAÇÃO DE SULFATO POR ESPECTROFOTOMETRIA	48
5.3	CINÉTICA MICROBIANA	49

5.3.1	<i>D. vulgaris</i>	50
5.3.2	Consórcio de amostra ambiental	55
5.3.3	Contagem direta	60
5.3.4	NMP	60
5.3.5	Determinação de sulfeto por azul de metileno	61
5.3.6	Coloração Gram	62
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ANÁLISE DE ANIONS POR CROMATOGRAFIA	63
6.1.1	Parâmetros analíticos	64
6.2	DETERMINAÇÃO DE SULFATO POR ESPECTROFOTOMETRIA	69
6.3	CINÉTICA MICROBIANA	71
6.3.1	<i>D. vulgaris</i>	72
6.3.2	Consórcio de amostra ambiental	86
6.3.3	Contagem direta	99
6.3.4	NMP	100
6.3.5	Determinação de sulfeto por azul de metileno	101
6.3.6	Coloração Gram	103
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE A – Gráficos da cinética de consumo de nitrato e sulfato.....	116
	APÊNDICE B - Meio de cultura Desulfovibrio (DSMZ) .63 – adaptado sem ferro.....	117
	APÊNDICE C - Procedimento Lavagem de Vidraria para cromatografia de íons	118
	APÊNDICE D – Procedimento básico de Injeção de amostras no Cromatógrafo de Íons – ICS3000 – Dionex.....	119

APÊNDICE E - Procedimento de Leitura e cálculo do NMP.....	121
APÊNDICE F – Código da programação no Chromeleon para a análise de íons.....	123
APÊNDICE G - Problemas e Soluções nas análises cromatográficas.....	125
APÊNDICE H – Determinação de sulfato por espectrofotometria – Hach DR2500.....	126
ANEXO A - Meio de cultura Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63).....	127
ANEXO B - Protocolo meio de cultura Postgate-modificado.....	128

1 INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo diversificado de micro-organismos anaeróbios. As BRS utilizam principalmente o sulfato, a forma mais oxidada do enxofre, como acceptor de elétrons e, dependendo do seu metabolismo, tem como resultado a produção de sulfeto ou enxofre elementar. Esse grupo de bactérias é versátil, pois possuem a capacidade de utilizar diversas substâncias como doadores de elétrons e, em alguns casos, outros aceptores de elétrons como, por exemplo, o nitrato. Portanto, o metabolismo das BRS pode ser dividido em três grupos didáticos distintos (ALMEIDA, et al., 2006; MADIGAN, 2010):

- a) Grupo I: BRS capazes de degradar matéria orgânica complexa (não oxidantes de acetato);
- b) Grupo II: BRS capazes de degradar acetato (oxidantes de acetato);
- c) Grupo III: BRS autotróficas que utilizam hidrogênio como fonte de energia e comumente enxofre elementar como acceptor final de elétrons.

A produção de H_2S pelas BRS é responsável por significativos danos à indústria petrolífera, pois esta substância causa a corrosão de superfícies metálicas e, por isso, o desgaste de vários equipamentos. Além da produção de H_2S , as BRS podem causar corrosão através da interação direta com as superfícies de liga metálica desestruturando-a e assim liberando metais como o ferro. Portanto, os mecanismos de atuação e corrosão causada pelo crescimento das BRS acarretam em significativo impacto ao processo industrial.

O controle de BRS nos sistemas de exploração de petróleo pode ser aplicado através da combinação das técnicas de monitoramento e da introdução de biocidas (glutaraldeído, quaternário de amônio, THPS- Tetrakis (hidroximetil) fosfônio sulfato, formaldeído, metanol) (HOLMKVIST et al., 2011; WEN et al., 2012; HAMMAD e ELSHAHAWY, 2014). Porém, existem poucas variáveis de monitoramento e detecção que são capazes de definir o uso apropriado e as concentrações adequadas de biocidas *in situ*, uma vez que não se sabe a densidade desses organismos no sistema.

As BRS podem apresentar um sistema de defesa ao controle por biocidas que é a síntese de uma substância polimérica extracelular que atua na formação de biofilme que funciona como uma película protetora. Além de aumentar a resistência das bactérias, o biofilme se adere às superfícies metálicas dos sistemas de injeção causando diversos problemas tais como: (i)

entupimento do reservatório, (ii) acidificação do meio, (iii) redução do fluxo e (iv) corrosão de ligas de ferro e aço (SCHWERMER et al., 2008; COTE et al., 2013).

Atualmente o método principal de quantificação de BRS é a técnica do “Número Mais Provável” (NMP) que se baseia no crescimento de BRS em meio seletivo inoculado com uma diluição seriada da amostra original. Esse método é muito sensível, ou seja, possui baixo limite de detecção, não envolve uso de equipamentos sofisticados, porém os procedimentos de preparação e análises delongam pelo menos 15 dias (QI et al., 2014 BHAGOBATY, 2014). Outras técnicas empregadas utilizam a biologia molecular como PCR e FISH, ensaios de imunoabsorção ligados à enzima, biosensores, mas estes métodos envolvem testes complexos e de alto custo em comparação ao tradicional (WAN et al., 2009; WAN et al., 2010; ZHANG, 2011).

Um método alternativo para monitorar a presença e atividade de BRS *in situ* seria através da relação das taxas de consumo de sulfato em condições padronizadas de fonte de carbono e aceptores de elétrons. No entanto, para que tal comparação seja possível é necessário conhecer algumas variáveis básicas que modelam a cinética de crescimento das BRS. De acordo com o Modelo cinético de Monod, espera-se que a taxa de crescimento bacteriano varie de acordo com a relação dos valores de biomassa e da disponibilidade de acceptor de elétron quando a concentração de carbono se encontra cima das condições limitantes. Essa relação matemática permite comparar essas variáveis cinéticas de vários testes distintos e ao mesmo tempo. Por isso essa técnica pode ser utilizada para prever a densidade e/ou atividade de BRS, sejam elas de cultura puras ou amostras ambientais. Em outras palavras, isto significa que uma serie de bateladas experimentais testando diferentes concentrações de inoculo (biomassa de BRS) contra concentrações de sulfato e fonte de carbono padronizada podem gerar taxas de crescimento modeláveis (previsível) (MONOD, 1949). Dessa forma, esse modelo matemático pode ser utilizado para estimar densidade de BRS *in situ* através de um cálculo comparativo.

Esse procedimento cinético esbarra em dois pontos limitantes (i) algumas BRS podem utilizar nitrato ao invés de sulfato como acceptor final de elétron e (ii) as fontes de carbono podem variar muito dependendo da amostra. Portanto, para se entender os mecanismos metabólicos e assim propor soluções para esse desafio técnico é necessário fazer testes cinéticos com BRS e, nesse trabalho, a *Desulfovibrio vulgaris* foi utilizada como micro-organismo modelo para esse estudo.

Portanto, a meta desse trabalho é a de descrever as taxas de crescimento (biomassa) versus as taxas de consumo dos aceptores de elétron por *D. vulgaris* utilizando análise cromatográfica de íons, e assim sugerir um método cinético de quantificação desses microorganismos para ser usado em amostras ambientais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de detecção indireta de BRS em tempo real através das análises da cinética de consumo de sulfato e nitrato quantificados por cromatografia de íons.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Desenvolver e validar um método analítico para determinação de ânions, principalmente sulfato e nitrato, em amostras aquosas e amostras oriundas de água produzida utilizando cromatografia de íons-CI com detector de condutividade;

2.2.2 Ajustar um método analítico espectrofotométrico para determinação de sulfato, em amostras aquosas e amostras oriundas de água produzida;

2.2.3 Calcular a taxa de crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* e a sua taxa de consumo de aceptores de elétrons (sulfato e nitrato) em diferentes condições: (i) concentração de aceptores de elétrons e; (ii) inóculo inicial;

2.2.4 Estimar biomassa de BRS em amostras ambientais (água produzida) baseado na cinética de consumo de sulfato e/ou nitrato com auxílio da cromatografia de íons.

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de um novo método de monitoramento para BRS que seja eficiente e rápido é necessário para a implantação de técnicas de combate a bio-sulfetogênese. A bio-sulfetogênese é um grande problema principalmente para o setor industrial causando efeitos deletérios, como acidificação de campos de petróleo, entupimento, corrosão tubular, *pitting*, aumento do teor de enxofre nas reservas de hidrocarbonetos entre outros (BHAGOBATY, 2014).

Os procedimentos de contagem de células viáveis, geralmente, não são calculados com prontidão e precisão e as técnicas mais precisas, como o exemplo, técnicas de biologia molecular PCR e FISH, consistem na utilização de equipamentos, materiais de elevados custos e testes complexos em comparação ao método tradicional. A detecção pelo número mais provável (NMP) é o método mais tradicional, porém o resultado é obtido somente após incubação por até 15-28 dias, necessitando de ambiente anaeróbico e/ou com baixo potencial redox (TANNER, 1989). Já os kits comerciais para monitoramento em campo são relativamente caros e, muitas vezes, envolvem o uso de um componente do kit que está sobre proteção de patente e por isso torna-se um método com um valor muito mais elevado (TRAORE e JACQ, 1991).

O controle de BRS nos sistemas de exploração de petróleo é aplicado através da combinação das técnicas de monitoramento e da introdução de biocidas (VIDELA, 2002). A aplicação de uma quantidade adequada de biocida é importante por causa dos seguintes fatores: evitar o desperdício de reagentes; reduzir o custo no setor industrial; reduzir o impacto ambiental; possibilitar um maior controle das BRS não precisando, até mesmo, do uso de outros métodos de prevenção de biocorrosão.

Portanto, para determinar a dosagem correta de biocida a ser aplicada, ou para intervir com estratégias de controle da bio-sulfetogênese é preciso um método rápido e eficiente para monitorar as BRS (BHAGOBATY, 2014). Nesse âmbito, uma empresa petrolífera que possa adquirir um cromatógrafo de íons terá uma excelente oportunidade de avaliar a população de micro-organismos de interesse (BRS) indiretamente, através das análises das concentrações sulfato e/ou nitrato presente nas amostras aquosas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 INDÚSTRIA DO PETRÓLEO

Na indústria petrolífera são conhecidos três processos de recuperação de petróleo. A recuperação primária de petróleo ocorre com a pressão natural do poço, recuperando apenas 20% do óleo do reservatório. A recuperação secundária é aplicada quando a pressão natural do poço diminui, sendo injetada água ou gás para a recuperação do óleo remanescente, este processo gera uma recuperação adicional entre 45-50%. Na recuperação terciária são utilizados processos químicos e físicos, como a utilização de solventes, polímeros entre outros. Este processo gera um adicional na recuperação do óleo de 7-15% (BACHMANN et al., 2014).

No processo de exploração secundária de petróleo é gerada a “água produzida”, esse termo é empregado para descrever a água que é expelida junto com o petróleo e o gás na exploração do reservatório, seja *onshore* (exploração no continente) ou *offshore* (exploração em alto mar). Esses reservatórios, muitas vezes têm naturalmente a ocorrência de água junto com os hidrocarbonetos. Para conseguir a recuperação máxima nos campos de petróleo, injeta-se, frequentemente, água adicional para ajudar a forçar o óleo para a superfície (SCHWERMER et al., 2008). Portanto água produzida é a água trapeada em superfície e entranhada na formação rochosa do reservatório. Nela coexiste uma mistura de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, ocorrendo naturalmente nas rochas de formações subterrâneas permeada por fluídos subterrâneos como petróleo, gás, água salina e micro-organismos como as BRS (ALMEIDA et al., 2006; FAKHRU’L-RAZI et al., 2009).

4.2 CORROSÃO MICROBIOLÓGICA INDUZIDA- CMI

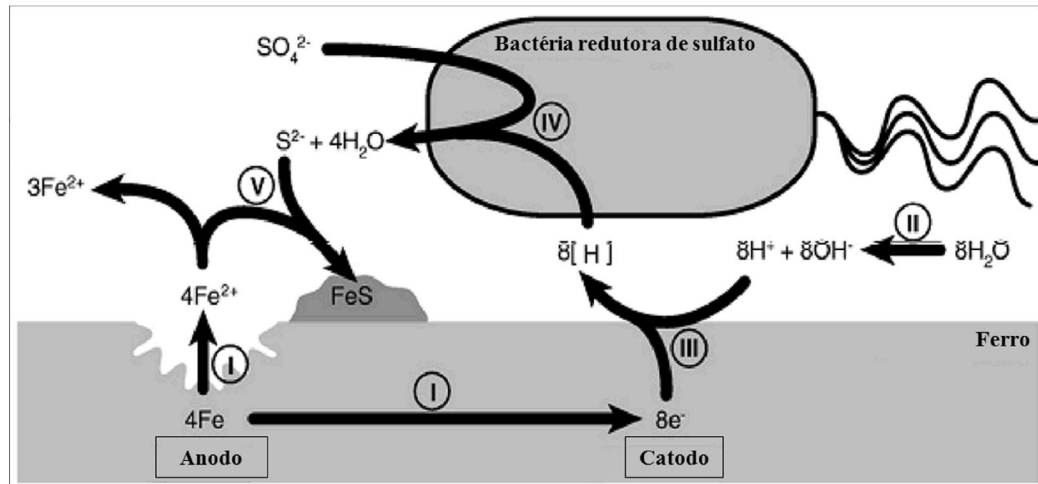
A corrosão de metais causada por micro-organismos já é descrita desde 1900, sendo denominada corrosão microbiologicamente induzida (KAKOOEI et al., 2012). A CMI é uma interação sinérgica composta por diferentes micro-organismos, que através do seu metabolismo cooperativo, são responsáveis pelo processo de corrosão (ALABBAS et al., 2013).

As BRS são os principais organismos envolvidos no processo de CMI, sendo responsável por metade dos casos ocorridos. Anualmente, cerca de 20% dos danos causados em materiais metálicos estão associados a CMI (YUAN et al., 2013). Apesar de não existirem estudos econômicos publicados sobre os gastos com a atividade microbiana, estimam-se que o prejuízo global na indústria do petróleo gerado pela atividade microbiana (processo de biocorrosão) seja maior que US \$ 100 milhões por ano (BHAGOBATY, 2014).

A biocorrosão mediada pelas BRS acontece quando três componentes estão presentes: (i) o sulfato (aceptor de elétrons); (ii) uma fonte doadora de elétrons livres (inorgânica ou orgânica) e; (iii) a água geralmente em condições anóxicas. O mecanismo teórico de corrosão induzida por BRS chamado de despolarização catódica foi proposto por Von Wolzogen Kuehr e Van der Vlugt em 1934 (Figura 1) (KAKOOEI et al., 2012). Essas bactérias podem também produzir significativas quantidades de exopolissacarídeos que causam o entupimento de vários sistemas industriais comumente conhecidos como biofilme. Em condições naturais, esse grupo de bactéria contribui para uma variedade de funções essenciais em muitos ambientes anaeróbios. As BRS são importantes reguladores de muitos processos em *wetlands* (zona úmida- pântano), inclusive no aproveitamento da matéria orgânica, biodegradação de poluentes aromáticos clorados em solos anaeróbios e sedimentos e na metilação do mercúrio (CASTRO et al., 2000). Nos sistemas industriais, no entanto, a presença dessas bactérias pode causar grande impacto nos processos de produção devido à formação de biofilmes e sulfetogênese. Portanto, várias são as estratégias utilizadas para tentar controlar a presença e o número desses organismos nos sistemas industriais de exploração (VIDELA, 2002).

Atualmente para controlar o crescimento dos biofilmes nos sistemas de injeção dos reservatórios são utilizados os biocidas. Dentre eles os utilizados são o glutaraldeído, antraquinona e THPS, Cloreto de Benzalcônio (BAC), porém a sua eficiência é dependente dos fatores como a resistência dos micro-organismos tratados, a adição freqüente e a disponibilidade de nutrientes no meio, isto é, a limitação de nutrientes e taxas de crescimento reduzidas resulta na formação de biofilmes com bactérias. Alguns biocidas, geralmente, apenas inibem o crescimento microbiano, e induzem respostas expressando genes de resistência não causando a morte das bactérias. Devido à elevada quantidade de biocidas aplicados em campos de petróleo, muitas bactérias tornam-se resistentes. Para o controle da corrosão, grupos químicos como o nitrato, fosfato, benzoato, cromatos e os boratos também são utilizados (ALMEIDA et al., 2006). Dentre esses, o nitrato é o mais usado nas injeções dos reservatórios petrolíferos.

Figura 1 - Representação da biocorrosão do ferro por BRS com base na teoria de depolarização catódica: I dissolução ferro; II, dissociação da água; III, a redução de prótons; IV, a redução do sulfato pela bactéria e; V, a precipitação de sulfeto.



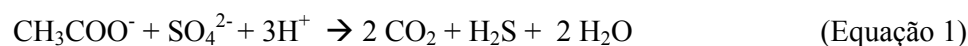
Fonte: Adaptado KAKOOEI et al., 2012

O uso do nitrato para remediar a ação de BRS nos poços na indústria do petróleo apresenta alguns mecanismos já citados na literatura: a) competição entre as BRS e as bactérias redutoras de nitrato (BRN) heterotróficas por doadores de elétrons; b) as BRN e as sulfeto oxidantes (quimiolitotróficas) removem o sulfeto gerado pelas BRS; c) a inibição das BRS pelo acúmulo de nitrito no meio (JURELEVICIUS et al., 2008; SCHWERMER et al., 2008; MUYZER e STAMS 2008; PILLAY e LIN, 2014).

4.3 BACTÉRIA REDUTORA DE SULFATO (BRS)

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo de micro-organismos filogeneticamente diversos, anaeróbias e podem ser encontradas em meio marinho e estuarino, devido a sua diversa capacidade metabólica. Podem crescer em um pH de 4,0 – 9,5, a temperatura de 25-60°C e toleram pressão de até 500atm (ALABBAS et al., 2013). Esse grupo de bactérias tem um papel importante na ciclagem de carbono e enxofre, pois realizam a redução dissimilativa de composto de enxofre, tais como: sulfato, sulfito, tiosulfato e enxofre elementar, como também redução assimilativa para alguns grupos. Os compostos piruvato, lactato e malonato são as principais fontes de carbono utilizadas pelas BRS, estes compostos são oxidados a CO₂ ou na forma incompleta (CO₂ e acetato). O Sulfeto de hidrogênio gerado durante o crescimento das BRS, ajuda na manutenção de um ambiente

anaeróbio (WIKIEL et al., 2013 ; TAO et al., 2013). Algumas BRS podem oxidar o acetato a CO₂ para obter elétrons para a redução de sulfato, gerando gás sulfídrico como exemplificado na Equação 1 (MADIGAN, 2010):



As Arquéias também estão entre os micro-organismos redutores de sulfato que utilizam acetato como fonte de elétrons e energia, gerando S⁰, ao invés de gás sulfídrico (ALMEIDA, et al., 2006). Há também as bactérias redutoras de sulfato autotróficas que através da utilização de formiato, pode-se gerar H₂ que também pode servir como fonte de elétrons para as BRS (ALMEIDA, et al., 2006; MADIGAN, 2010). A Tabela 1 resume esses três grupos de BRS com seu determinado metabolismo.

Tabela 1 – Classificação das BRS com sua determinada reação metabólica

Grupos	Descrição	Reação
Grupo I	BRS que degradam matéria orgânica complexa - MOC (não oxidantes de acetato)	$\text{MOC} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$
Grupo II	BRS que degradam acetato (oxidantes de acetato)	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$
Grupo III	BRS autotróficas que utilizam hidrogênio como fonte de energia e comumente enxofre elementar como acceptor final de elétrons.	$3 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow 4 \text{H}_2\text{O} + \text{S}^0$

Uma espécie de BRS muito utilizada experimentalmente *in vitro* é a *Desulfovibrio vulgaris*, um grupo de bactérias mesófilas do tipo bacilo Gram negativo. Estas bactérias crescem em ambientes tipicamente anóxico, embora algumas possam tolerar o oxigênio (KAKOOEI et al., 2012). Nesse grupo, a cepa *Desulfovibrio vulgaris* str. 'Miyazaki F' é

usada como referência para estudos de análises do metabolismo das BRS, em comparação com *D. vulgaris* Hildenborough, essas cepas são muito semelhantes na fisiologia e os resultados são considerados aplicáveis a todas as cepas *D. vulgaris* (HAMAP, 2013).

A *D. vulgaris*, utiliza uma ampla variedade de aceptores de elétrons, incluindo sulfato, enxofre, nitrato e nitrito. Através do seu metabolismo é possível utilizar para: (i) a remoção de metais contaminantes como o urânio (VI) de crômio (VI) e de ferro (III) presentes em efluentes, por meio da precipitação com sulfeto e; (ii) redução da acidez de águas de drenagem ácida de minas. Logo, estes micro-organismos são bons biorremediadores para tratamentos de efluentes, porém são responsáveis pela corrosão de metais, um problema que é, em parte, o resultado da atividade coletiva dessas bactérias (CABRERA et al., 2006).

4.4 SOBRE O ENXOFRE

O enxofre é um elemento essencial para a vida e no metabolismo de compostos orgânicos. Existem quatro principais estados de oxidação do enxofre variando do mais reduzido ao mais oxidado, - II, 0, +IV e + VI (sulfeto, enxofre elementar, sulfito e sulfato, respectivamente), Figura 2. Além disso, este enxofre pode estar ligado a outros átomos. Bioquimicamente, o enxofre pode fazer ligações com o hidrogênio, carbono e oxigênio, como também pontes dissulfeto (MUYZER e STAMS, 2008).

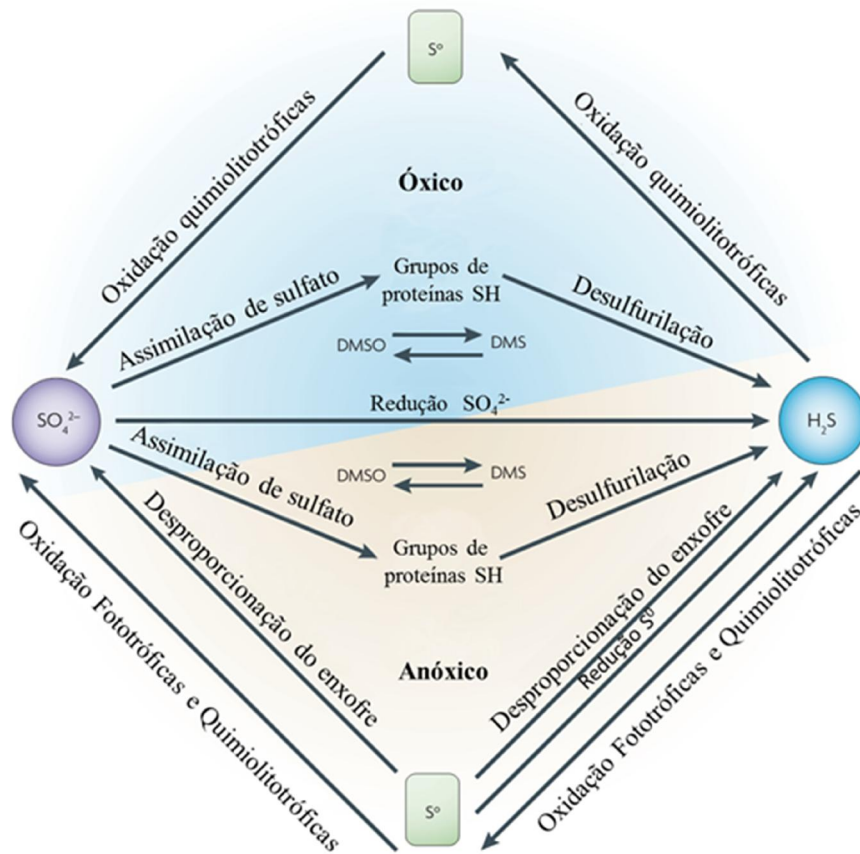
Figura 2 – Principais espécies de enxofre em diferentes estados de oxidação.

Nº oxidação do S	-II	0	+IV	+VI
Espécie	S^{-2}	S^0	SO_3^{-2}	SO_4^{-2}
	↔		↔	
	↓		↓	
	Forma mais reduzida		Forma mais oxidada	

Na natureza as BRS participam da redução do sulfato a sulfeto. O processo inverso, a oxidação do sulfeto, pode ser realizado aerobiamente por bactérias oxidantes de enxofre

Quimiolitotróficas (por exemplo, *Thiobacillus* ou *Beggiatoa*) ou aerobiamente por bactérias de enxofre fototróficas (por exemplo, *Chlorobium*) transformando enxofre elementar (S^0) em SO_4^{2-} . Outras transformações, são realizadas por grupos de micro-organismos específicos, resultam na redução de enxofre (por exemplo, *Desulfuromonas*) e desproporcionamento do enxofre (*Sulfodismutans*, *Desulfovibrio*) (MUYZER e STAMS, 2008). Compostos orgânicos de enxofre, tais como o dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser transformado em dimetilsulfeto (DMS) e vice-versa, por vários grupos de micro-organismos. A Figura 3 resume as principais reações apresentadas das transformações do enxofre.

Figura 3 – Principais transformações do enxofre.

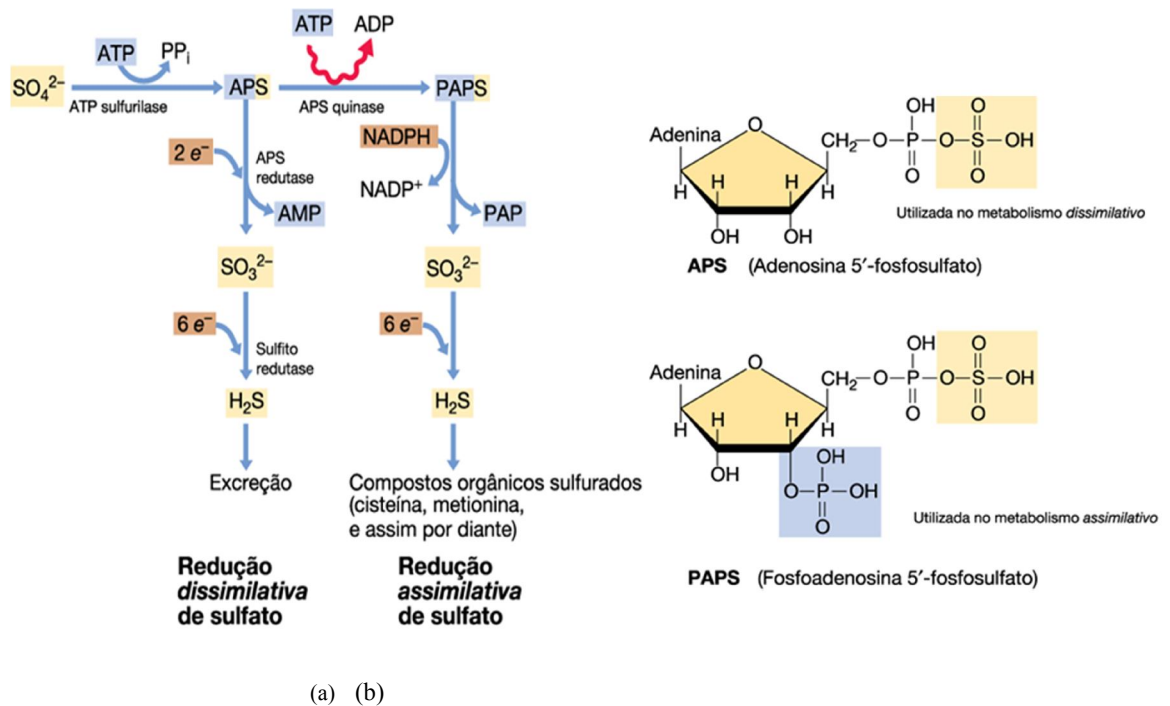


Fonte: adaptado MUYZER e STAMS, 2008.

O sulfato é a espécie de enxofre mais estável termodinamicamente. A redução biológica do sulfato pode ser de duas formas: i) redução assimilativa, neste processo o enxofre é incorporado pelo organismo, ou seja, é aproveitado para a biossíntese de componentes

citoplasmáticos compondo estruturas químicas de aminoácidos, ácidos nucleicos e em alguns cofatores, tal como a biotina (POSTGATE, 1979); ii) redução dissimilativa, envolve especialmente as BRS e as arqueias anaeróbias obrigatórias, nesta forma, o sulfato ou o enxofre elementar é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória e ocorre grande produção de sulfeto de hidrogênio H_2S . A Figura 4 (a) representa o mecanismo metabólico dessas duas vias.

Figura 4 - Mecanismo da redução biológica do sulfato. (a) As duas formas metabólicas redutoras; (b) enzimas essenciais que participam do processo de redução.



Fonte: adaptada MADIGAN et al., 2010.

As duas principais enzimas envolvidas no processo de redução dos compostos sulfurados é a APS redutase ou adenosina fosfosulfato redutase (APSR) e a APS quinase as quais estão presente, respectivamente, na via de redução dissimilativa do sulfato e na redução assimilativa do sulfato, ver Figura 4 (b).

As bactérias redutoras de sulfato, a depender do gênero, podem realizar redução assimilativa e/ou dissimilativa e são capazes de utilizar, além do sulfato, sulfitos, tiosulfato, enxofre ou nitrato como aceptores de elétrons alternativos (GREIN et al., 2013). A principal

fonte doadora de elétrons para a obtenção da energia é o hidrogênio H_2 , porém outras fontes são utilizadas. O ideal é utilizar como fonte de carbono compostos simples, pois a utilização de compostos orgânicos mais complexos envolve um gasto energético maior para a metabolização ou a dependência de outras bactérias para degradar o substrato, exemplo, as acetogênicas (MUYZER e STAMS, 2008). A fonte de carbono que tem maior potencial de utilização é o lactato, já que fornece energia mais do que suficiente para redução de sulfato, isto pode ser facilmente observada pela baixa energia livre de Gibbs das reações de redução sulfato com cada fonte de carbono, ver Tabela 2, (OKABE, 1995; MUYZER e STAMS, 2008; OYEKOLA, 2012).

Tabela 2 - Reações das redutoras de sulfato, metanogênicas, e acetogênicas.

Equação	ΔG° (kJ/reação)*
Reação redução de sulfato	
$4 H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4 H_2O$	-151.9
$Acetato^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2 HCO_3^- + HS^-$	-47.6
$Propionato^- + 0,75 SO_4^{2-} \rightarrow Acetato^- + HCO_3^- + 0,75 HS^- + 0,25 H^+$	-37.7
$Butirato^- + 0,5 SO_4^{2-} \rightarrow 2 Acetato^- + 0,5 HS^- + 0,5 H^+$	-27.8
$Lactato^- + 0,5 SO_4^{2-} \rightarrow Acetato^- + HCO_3^- + 0,5 HS^-$	-80.2
Reações acetogênicas	
$Propionato^- + 3 H_2O \rightarrow Acetato^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76.1
$Butirato^- + 2 H_2O \rightarrow 2 Acetato^- + H^+ + 2 H_2$	+48.3
$Lactato^- + 2 H_2O \rightarrow Acetato^- + HCO_3^- + H^+ + 2 H_2$	-4,2
Reações metanogênicas	
$4 H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3 H_2O$	-135.6
$Acetato^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0
Reações homoacetogênicas	
$4 H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow Acetato^- + 4 H_2O$	-104.6
$Lactato^- \rightarrow 1,5 Acetato^- + 0,5 H^+$	-56.5

Fonte: Adaptado MUYZER e STAMS, 2008.

No meio contendo BRS, as análises de pH e Eh auxiliam para avaliar as condições (solubilidade de espécies, acidez, oxidação) desse meio e poder identificar, preliminarmente, a presença dessas bactérias como método indireto. Durante o crescimento bacteriano, o pH e o potencial do meio se modificam, o pH aumenta devido a formação de íons OH^- e o potencial redox diminui devido ao consumo de elétrons. Cada micro-organismo apresenta uma forma de curva do potencial redox (Eh). As BRS crescem em meios com o Eh variando entre -100 e -500 mV e entre -100 a -200 mV há o predomínio da redução de sulfato. A Tabela 3 resume as principais faixas de Eh para cada metabolismo e suas principais reações. O sulfeto dissolvido

no meio pode estar presente nas formas S^{2-} , HS^- , ou H_2S , a forma de sulfeto encontrada será determinada pelo pH do meio. Dependendo do valor de potencial redox no meio, o enxofre pode estar nas formas SO_4^{2-} , S^0 , HSO_4^- , entre outras. Em valores de pH levemente básico a forma predominante do sulfeto é HS^- , em pH ácidos predomina a forma H_2S , em pH mais elevado (acima de 8) ocorre o predomínio da concentração de S^{2-} e em pH 7 existe frações iguais de HS^- e H_2S , ver Tabela 4 . Desta forma os valores de pH e o Eh da solução estão diretamente associados a espécie predominante encontrada no meio. Um outro fator que também pode determinar a forma de enxofre encontrada no meio, é a temperatura. Este fator dependerá da atividade metabólica do micro-organismo encontrado no meio como também o coeficiente de absorção do sulfeto ao meio (SOUZA et al., 2010; BERNARDEZ et al., 2012).

Tabela 3-Resumo das faixas de Eh para cada metabolismo com sua reação predominante.

Tipo de metabolismo	Valores de Eh	Principais transformações
Respiração aeróbia	≥ 300 mV	Redução do O_2
Respiração anaeróbia facultativa	100 a 300 mV -100 a 100 mV	Redução do NO_3 Redução Fe e Mn
Respiração anaeróbia	-200 a -100 mV ≤ -200 mV	Redução do SO_4^{2-} Formação de metano

Fonte: Adaptado MOREIRA e SIQUEIRA (2006).

Tabela 4 – Disposição do sulfeto de hidrogênio no meio aquoso de acordo com o pH.

pH	Formas do sulfeto em soluções aquosas
< 7	H_2S
7	H_2S (50%) e HS^- (50%)
> 7	HS^-

Fonte: Adaptado SOUZA, (2010).

4.6 NITRATO REDUTASE

A maioria das BRS podem também reduzir o nitrito e/ou nitrato (MARIETOU et al., 2005). A redução do nitrato é promovida pela nitrato redutase. O nitrato é reduzido a amônia- NH_3 por alguns gêneros de BRS (*Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*) através da respiração anaeróbia (DALSGAARD e BAK, 1994). A Nitrato redutase da *Desulfovibrio vulgaris str. 'Miyazaki F'* corresponde a enzima transcrita pelo gene DvMF_1484 da *Desulfovibrio vulgaris str. 'Miyazaki F'* que teve seu genoma sequenciado por Lucas et al., (2008). Esta enzima apresenta 739 aminoácidos – aa, com sítios ligantes a metais, ferro, ferro-enxofre e molibdênio. Enquadra-se na função molecular oxireductase e apresenta semelhança na estrutura de muitas nitrato redutase das BRS (UNIPROT, 2013).

A redução do nitrato NO_3^- compreende um processo muito importante do ciclo do nitrogênio na natureza e está relacionada com a primeira etapa do processo de desnitrificação. As principais funções podem ser: i) uso do nitrato como fonte de nitrogênio; ii) aquisição de energia metabólica quando utiliza o NO_3^- como aceptor final de elétrons; iii) dissipa o excesso de energia redutora para manter o balanço redox. Essa redução do nitrato, a princípio, transformando a nitrito é catalisada por uma enzima nitrato redutase - NRase (NRases (MORENO-VIVIÁN et al., 1999; MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007).

São conhecidas, basicamente, quatro tipos de nitrato redutase-NR: i) a NR assimilativa Eucariótica (EUK-NR) e; ii) três enzimas procarióticas, (1) a nitrato redutase respiratória (NAR), associada à membrana, está envolvida na produção de energia metabólica, (2) a NR assimilativa (NAS) localizada no compartimento citoplasmático e participa da assimilação do nitrogênio, e (3) a nitrato redutase dissimilativa periplasmática (NAP) a qual dissipa o excesso de energia redutora para manter o balanço redox (dissimilação de nitrato) (MORENO-VIVIÁN et al., 1999; CAMPBELL, 1999; RICHARDSON et al., 2001; MOROZKINA e ZVYAGILSKAYA, 2007). Apesar de possuírem muitas semelhanças, os quatro tipos de NR apresentam em sua estrutura cofator molibdênio, as NR bacteriana contêm como cofator dois grupos molibdopterina guanina dinucleotídeo (MGD) coordenados a um átomo de molibdênio (RICHARDSON et al., 2001; MOROZKINA e ZVYAGILSKAYA, 2007).

4.7 CONTROLE E MONITORAMENTO DAS BRS

Para o controle da formação de colônias de BRS utilizam-se métodos físicos como ultravioleta-UV, ultra-som, radiação ionizante, raios-x etc., podendo inibir ou eliminar micro-organismo. Porém os métodos químicos são os mais simples e eficazes na indústria, principalmente pela adição de biocidas e inibidores (ZHANG et al., 2011).

Os biocidas são compostos individuais ou uma mistura de compostos utilizados para inibir o crescimento microbiano. Compostos biocidas podem ser inorgânicos tais como ozônio, cloro, bromo, etc.; ou orgânicos tais como isotiazolinonas, amônia quaternária, glutaraldeído, acroleína, formol e etc. (VIDELA, 2002). O glutaraldeído é um biocida não oxidante muito utilizado para eliminar as BRS. Este é uma substância ativa sobre uma ampla gama de temperaturas e valores de pH. O grupo funcional do glutaraldeído reage com constituintes básicos das proteínas (por exemplo, grupos tais como: OH⁻, NH₂⁻, ⁻COOH e ⁻SH) que estão presentes nas membranas celulares, paredes celulares e no citoplasma. O glutaraldeído é solúvel em água e insolúvel em óleo, e é por isso que, nas formulações dos biocidas, podem conter água, metanol, isopropanol ou várias combinações desses últimos. Estes álcoois são adicionados para aumentar a capacidade de penetração do glutaraldeído e evitar a sua solidificação durante o armazenamento. Cabe salientar também que a concentração máxima determinada pela agência de proteção ambiental nos Estados Unidos da América (USEPA) é de 50 ppm de glutaraldeído (VIDELA, 2002).

Existem outros métodos de controle das BRS um deles é a exclusão biocompetitiva, a adição de nitrato estimula o crescimento das bactérias redutoras de nitrato (BRN), este processo pode gerar a competição entre as Bactérias redutoras de nitrato heterotróficas (BRNh) e as BRS heterotróficas por compostos orgânicos (doadores de elétrons) (LAMBO et al., 2008; SOUZA et al., 2010). Gana et al., (2011) cita que poucos testes relacionados a exclusão biocompetitiva se mostraram eficientes, em que as taxas de corrosão foram reduzidas em torno de 50%.

O monitoramento das populações de BRS pode ser feito através de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos de contagem relacionam diretamente com a população bacteriana. Em sua maioria são testes com o uso de técnicas de biologia molecular como, por exemplo, PCR (CASTRO et al., 2000; MENERT et al., 2004; BAHR et al., 2005) e ainda, métodos utilizando microscopia como detecção por fluorescência em hibridização *in situ*

(FISH) em que possui uma boa acurácia e ampla especificação para detectar BRS (SANTOS et al., 2010).

Os métodos indiretos são aqueles que medem a variação da produção de H₂S ou consumo de sulfato e ou da densidade desses micro-organismos que são aferidas através de meios de cultivo. O meio de cultivo mais comum é o Postgate B que é utilizado como base para a estratégia de cultivo em tubos múltiplos (POSTGATE, 1979; PARKES et al., 1995). Esse método, no entanto, depende de vários dias de cultivo para a obtenção dos resultados. Zhang (2011) resumiu os métodos que atualmente são mais utilizados para monitorar BRS (Tabela 5).

O controle de BRS nos sistemas de exploração de petróleo é atingido através da combinação das técnicas de monitoramento e da introdução de biocidas (VIDELA, 2002).

Porém, existem poucas variáveis de monitoramento e detecção que são capazes de definir o uso correto e concentrações adequadas de biocidas *in situ*.

Tabela 5- Resumo demonstrativo dos métodos utilizados para detecção e monitoramento de BRS

Métodos	Classificação	Características de comparação
Métodos tradicionais	Cultura	<p>1. O método de diluição seletivo é simples e fácil de contar, porém apresenta um período de cultura longo e os resultados são sempre mais baixos.</p> <p>2. Teste em frasco é um método direto, evitando a contaminação e interferências, melhora consideravelmente a precisão e confiabilidade, mas o tempo de espera é longo.</p>
	Método de contagem por microscopia	Este método pode calcular a quantidade total de bactérias, mas não o valor total da BRS, de modo que o valor do resultado é maior. A menos que utilize FTTC e IFA juntos.
	Determinação quantitativa de produtos metabólicos	Este método é indireto e está relacionado com a quantidade de sulfeto produzido para detectar BRS. É fácil e dedutivo.
Métodos de determinação direta	Determinação usando um sensor	Com este método é possível calcular a quantidade de BRS em água do mar de forma rápida, por meio de um sensor.
	Imunoensaio	Com este método é possível calcular a quantidade de BRS em 15-20 min. É um método de fácil detecção e adequado para utilizar no campo. O resultado obtido é preciso porém o custo de aplicação é muito elevado.
	Hibridização in situ de fluorescência	O tempo de teste e análise deste método é curto, e a sensibilidade é alta. É um método capaz de detectar mais tipos e quantidades de BRS. Contudo, os instrumentos são caros e difíceis de utilizar.
	PCR	A sensibilidade é duas ordens de grandeza mais elevadas do que os métodos de cultura tradicionais, o custo é elevado e exige de recurso humano qualificado e laboratório equipado.

Fonte: Adaptado ZHANG, 2011.

4.8 CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUÇÃO POR TROCA ANIÔNICA PARA QUANTIFICAR NITRATO E SULFATO

A Cromatografia por troca aniônica é um tipo de cromatografia de íons (CI). A cromatografia de íons- CI ou iônica foi denominada assim em 1975 por SMALL et al., (1975) que descreveu em seu trabalho um sistema cromatográfico para determinar pequenos íons inorgânicos utilizando uma coluna com resina de baixa capacidade de troca iônica como fase estacionária, um detector de condutividade e um coluna supressora para remover a condutividade do eluente a fim de reduzir *Background*. Em seguida, Gjerde et al., (1979) desenvolveram uma técnica de cromatografia por troca aniônica sem o uso de coluna supressora, apenas com eluentes de baixa condutividade.

A CI pode ser de quatro tipos, varia com o mecanismo de separação dos íons: i) de troca iônica, interação eletrostática entre os íons de uma amostra e grupos funcionais com cargas opostas presente na coluna fase estacionária; ii) exclusão de íons, diferentemente da troca iônica, o sistema baseia-se na repulsão entre íons analitos com as cargas presentes na coluna (fase estacionária), essa técnica é amplamente utilizada para separar os compostos iônicos a partir de compostos não- iônicos e para separar misturas de ácidos ou bases (GÓD, 1997); iii) cromatografia de quelação iônica, nesse sistema a fase estacionária apresenta propriedades quelantes para alguns íons, isto é, a fase estacionária realiza múltiplas ligações coordenadas com o analito, e é utilizado para separar cátions inorgânicos; iv) cromatografia de íons Zwitterion ou anfótero, nesse sistema ocorre separação de íons que apresentam regiões positivos e negativos, a fase estacionária apresenta grupos zwitterions e esta cromatografia é muito eficiente na separação de aminoácidos (JACKSON, 2000; BHATTACHARYYA, 2012; FANALI et al., 2013). NESTERENKO, (2001) resumiu no Quadro 1 um esquema de classificação para as diferentes possibilidades de CI. Esta classificação foi acarretada a partir da interpretação de métodos adequados para a determinação simultânea de cátions e ânions por CI em uma única injeção de um volume da amostra. Porém as primeiras tentativas de determinação simultânea de cátions e ânions foram direcionadas para uma combinação de dois cromatógrafos de íons em uma mesma unidade. Isto poderia ser realizada utilizando colunas em paralelo ou em série ou com um sistema de comutação entre as colunas. (NESTERENKO, 2001).

Quadro 1- Classificação das técnicas para determinação simultânea de cátions e ânions por CI.

SEPARAÇÃO			
I-Técnicas de Multi-colunas			
Sistemas Multi-eluentes		Sistemas Mono-eluentes	
Colunas Paralelas	Colunas em Série	Colunas comutáveis	
II-Técnicas com uma Única Coluna			
Cromatografia por troca de cátions e por exclusão de íons			
Separação em colunas zwitteriônicas			
Colunas de leito misto	Colunas de partículas esféricas	Moléculas zwitteriônicas imobilizadas	Camadas mistas
III-Cromatografia por troca de ânions e complexos metálicos carregados negativamente			
DETECÇÃO			
Sistema de detecção único		Sistema de detecção múltiplo	

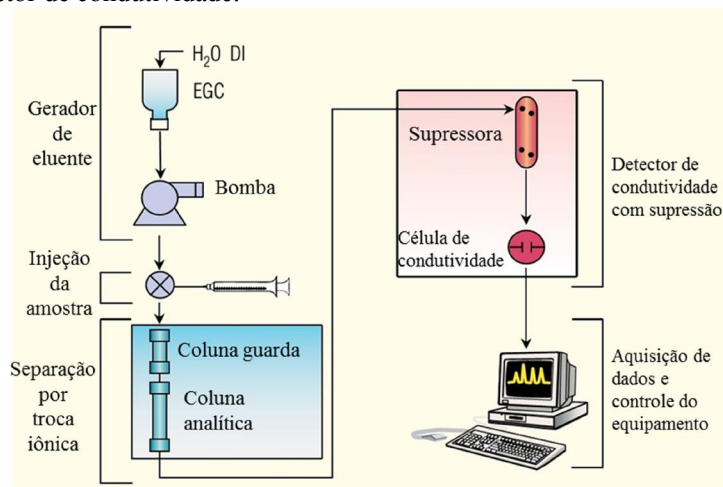
Fonte: NESTERENKO, (2001).

Neste trabalho o modo de separação é por troca iônica, mais especificamente, separação por troca aniônica. Nesse sistema tem o módulo gerador de eluente (KOH) que carreará a amostra pela coluna de separação, a coluna carregada levemente positiva retêm os ânions da amostra injetada, porém o eluente quando eluido pela coluna arrasta o analito que possui maior interação consigo. O tempo de retenção é variado para cada analito e dependerá da interação com a fase estacionária e fase móvel. Após a separação na coluna, a mistura é passada pela supressora a fim de eliminar o *background* do eluente no detector. O sinal é transmitido e as informações são processadas no computador, ver Figura 6. Na supressora, por um processo eletroquímico, os cátions são substituídos por íons de hidrogênio e a hidroxila do eluente é neutralizada transformando em água, Figura 7.

Atualmente pode considerar a CI em um tipo de HPLC- *High-performance liquid chromatography*, podendo ser em fase reversa ou em normal. A fase reversa consiste de uma fase estacionária de pouca polaridade e uma fase móvel de alta polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas (TONHI et al., 2002). Porém algumas características diferem a CI da HPLC, o sistema cromatográfico por onde passa o líquido, normalmente, é constituído de um polímero inerte, tal como Politetrafluoretileno (PTFE) ou, mais

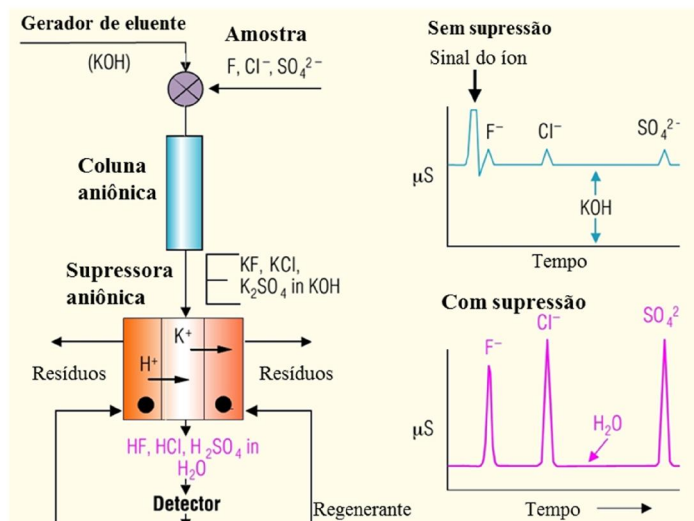
comumente, *Polyether ether ketone (PEEK)*, oposto ao HPLC em que, comumente, usa aço inox. Os eluentes utilizados em CI são, geralmente, ácidos e bases fortes que podem contribuir para um maior desgaste, caso utilizasse o aço inox (HADDAD e JACKSON, 1990). Outra diferença, na CI o detector primário mais utilizado é o de condutividade ou amperométrico e para o HPLC convencional é o UV / VIS. A detecção de condutividade pode ser operado no modo direto (ou não reprimida) ou com o uso de dispositivo baseado na troca iônica, denominado de supressora, que é inserida entre a coluna de troca iônica e o detector de condutividade (JACKSON et al., 2004).

Figura 6– Esquema representando o sistema de cromatografia por troca iônica com supressora e detector de condutividade.



Fonte: Adaptada Dionex.

Figura 7 - Diagrama de supressão de eluente para cromatografia iônica.



Fonte: Adaptada Dionex.

Considerando que a CI é uma técnica de cromatografia líquida aplicada especialmente para determinar solutos iônicos e que, geralmente, não exige muitos tratamentos na amostra, pode-se inferir como uma técnica rápida, confiável e precisa para a determinação simultânea de diversos íons (GROS,2013; JACKSON et al., 2004). Dentre as aplicações a ser utilizada para a determinação de solutos iônicos, são: ânions inorgânicos; cátions inorgânicos incluindo metais alcalinos, alcalino-terrosos, metal de transição e os íons de terras raras; ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, ácidos orgânicos fosfônicos e sulfônicos, incluindo detergentes; carboidratos; bases orgânicas de baixo peso molecular; álcoois de açúcar, aminoglicosídeos, aminoácidos, proteínas, glicoproteínas e; complexos de metais iônicos (JACKSON, 2000; KARMARKAR et al., 2004; BHATTACHARYYA, 2013). Nesse sentido por ser já bem estabelecida, a CI é empregada para análise de espécies iônicas como método padrão em muitos órgãos, tais como ASTM (*American Society for Testing and Materials*), AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), e USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) (JACKSON, 2000).

Desde então tem sido utilizado na análise de muitos analitos da área ambiental, nas indústrias químicas e petroquímicas, semicondutores, aplicações de água de alta pureza, aplicações para análise de alimentos e bebidas, indústrias farmacêuticas e clínicas, na mineração e metalurgia, na biotecnologia, em indústrias agrícolas e entre outras. Porém, apesar da grande variedade de analitos e tipos de amostras atualmente analisadas por CI, a análise ambiental ainda continua sendo a maior área de aplicação. (JACKSON, 2000; BHATTACHARYYA, 2012).

Ao buscar na literatura métodos com parâmetros coluna AS11-HC (Dionex, USA) e detector de condutividade foram selecionados os principais artigos para a construção da tabela comparativa, Tabela 6.

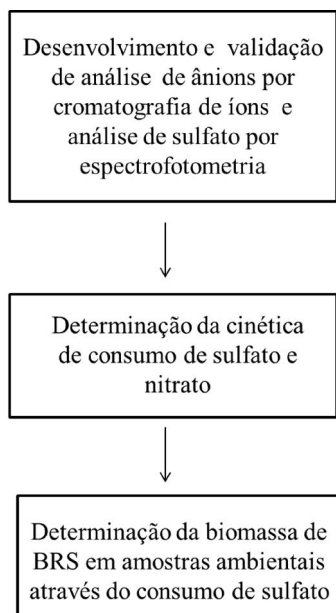
Tabela 6– Comparação entre métodos de cromatografia de íons utilizando programa de eluição por gradiente e isocrático, detector de condutividade e coluna AS11-HC (Dionex, USA).

Tipo de amostra	Detector	Eluente	Espécies químicas	Referência
Água subterrânea e solo	Condutividade	NaOH	I ⁻ , NaOH em metanol-água	TUCKER.; FLACK, 1996.
Leite	Condutividade	NaOH	Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ e alguns ácidos orgânicos.	GAUCHERON. Et al., 1996.
Beterraba	Condutividade	NaOH	Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , e alguns ácidos orgânicos.	MAGNE et al., 1998.
Água de chuva	Condutividade	NaOH	Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻	MORALES et al., 1998.
Produtos alimentícios	Condutividade	Gerador eluente KOH em gradiente	Fosfatos, ortofosfato, pirofosfato, polifosfato.	SEKIGUCHI et al., 2000
Água do mar	Condutividade	Gerador eluente KOH em gradiente	6 ânions(ácidos orgânicos de cadeias curtas)	MILLER e SCHNUTE, 2012.
Ambientais partículas no ar e água	Condutividade	Gerador eluente KOH em gradiente	14 ânions (inorgânicos e ácidos orgânicos de cadeias curtas)	DOMINGOS, et al., 2012
Partículas na atmosfera, aerosol	Condutividade	Glioxal e H ₂ O ₂	9 ânions(ácidos orgânicos de cadeias curtas)	TAN et al., 2009, 2010
Amostras de banho de texturização ácida	Condutividade	Gerador eluente KOH em gradiente	Fluoreto e nitrato	ZIMMER et al., 2009
Amostras aquosas	Condutividade	Gradiente NaOH	5 ânions (nitrato, nitrito, sulfato e cloreto e peroxidissulfato)	KHAN e ADEWUYI, 2011
Efluentes	Condutividade	KOH isocrático	4 anions (nitrato, acetato, propionato e butirato)	XIE et al., 2012
Amostras aquosas	Condutividade	Carbonato de sódio e NaOH	7 anions (F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ²⁻ and SO ₄ ²⁻)	ZATIRAKHA et al., 2014
Ambientais partículas no ar e na água	Condutividade	NaOH	6 ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ e NO ₂ ⁻)	SEN et al., 2014

5 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia desse trabalho foi dividida em três etapas conforme Figura 8.

Figura 8 – Sequência de etapas da metodologia abordada nesse trabalho.



5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ANÁLISE DE ÂNIONS POR CROMATOGRAFIA

A análise de cromatografia de alta resolução por troca aniônica foi realizada em três etapas:

(i) Após levantamento bibliográfico foram selecionadas os métodos descritos por Christison et al., (2011), Miller e Schnute, (2012) e Domingos et al., (2012), dos quais foram utilizadas como referências para o desenvolvimento de novos protocolos a serem utilizados como parâmetros de análises em cromatografia de troca iônica.

(ii) O método adotado foi adaptado ao método do protocolo da Dionex.

(iii) Validação do método elaborado.

5.1.1 O Cromatógrafo de íons e o método

O Cromatógrafo de íons é um Dionex ICS-3000 com duas bombas, isto é, contém dois sistemas de análise em paralelo: i) uma coluna analítica Dionex IonPac AS11-HC 4 × 250mm e coluna guarda Dionex IonPac AG11-HC 4 × 50mm acoplado com um detector condutimétrico e supressora ASRS- ANION SELF-REGENERATING SUPPRESSOR – 4mm e possuindo gerador de eluente de KOH –RFIC-EG ; ii) uma coluna analítica Dionex IonPac AS7 4 × 250mm e coluna guarda Dionex IonPac AG7- 4 × 50mm acoplado com um detector eletroquímico ou amperométrico pulsado –ED40 – Dionex. O equipamento também apresenta acoplado, um amostrador automatizado AS40 – Dionex para vial de 5mL.

Nesse trabalho o método descrito é para a determinação de ânions utilizando o sistema com gerador de Eluente (KOH) e a coluna analítica AS11-HC. O tipo de corrida é pelo modo gradiente do eluente KOH e com um tempo de 45 min, tendo a seguinte descrição: primeiro 1mmol L⁻¹ de 0-9min, seguindo por 1- 15mmol L⁻¹ de 9-15min, 15-30 mmol L⁻¹ de 15-28min, 30-63 mmol L⁻¹ de 28-38min, e finalizando 1mmol L⁻¹ de 38-45min. O sistema foi instalado para injetar 50µL (volume do *loop*).

O método foi desenvolvido a partir do aperfeiçoamento do programa de gradiente fornecido pelo fabricante do equipamento (Dionex-USA) em relação à coluna AS11-HC. Pesquisou-se na literatura um novo método já estabelecido considerando parâmetros de eluição, detector, espécies separadas e o tipo de amostra escolhendo-se o método que se enquadrava com o equipamento e os recursos existentes no laboratório. Foram realizados testes preliminares até atingir a uma boa separação e daí seguir para os testes de validação. A programação do método no *software* do Chromeleon segue no APÊNDICE F.

Nesse programa de gradiente foi injetada uma solução com mistura de 17 analitos (padrões) em diferentes concentrações (10, 50, 100, 300, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500 µg L⁻¹) para a construção da curva analítica. Depois foi realizada a leitura de cada cromatograma contendo a mistura de ânions a 100 µg L⁻¹ e tendo uma espécie com uma concentração muito elevada (1000 µg L⁻¹) para identificar o ânion específico (em maior concentração) no cromatograma (RIBANI et al., 2004).

5.1.2 Preparo das soluções e amostra

Os reagentes utilizados para preparar as soluções padrões da curva de calibração para o cromatógrafo possuíam grau analítico acima de 99% (adquiridos pela Merck, Sigma Aldrich e J. T. Baker) e a água como solvente era ultrapura com resistividade maior que 18,2 M Ω cm a 25°C oriunda do sistema de purificação Milli-Q Biocel (Millipore Corporation, U.S.A.). As soluções padrões estoque foram condicionadas em geladeira a 4°C por até dois meses.

As vidrarias utilizadas para o preparo das soluções padrões estoque foram previamente, limpas, imergindo-as em recipiente contendo detergente Neutro EXTRAN (MERCK) e sonicando por 15 minutos em banho ultra-som seguindo por enxágüe por 6 vezes com água ultrapura.

Cada amostra para análise era filtrada com o auxílio de seringa descartável acoplada com filtro de 0,22 μ m. As amostras de água produzida, além de filtradas em filtros de 0,22 μ m, também eram filtradas em seringa acoplada a cartucho (OnGuard II RP Dionex) a fim de evitar entupimentos com hidrocarbonetos na coluna analítica quando amostras de água produzida eram analisadas. Após o tratamento, as amostras eram armazenadas sob refrigeração a -20°C.

5.1.3 Parâmetros analíticos

Para a validação do método de separação (CI), foram determinados os parâmetros analíticos ou características de desempenho: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; limite de detecção e; limite de quantificação (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

5.1.3.1 Seletividade

O parâmetro analítico seletividade de um método instrumental de separação está associado com a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias (analitos) na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra

complexa. A seletividade foi determinada comparando a matriz isenta das espécies de interesse e a mesma matriz com adições destas substâncias (padrões). Nesse processo nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse, que deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra (RIBANI et al., 2004).

5.1.3.2 Curva analítica, limite detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A curva analítica ou curva de calibração foi definida pela relação matemática entre o sinal (área ou pico obtido pelo detector) e a concentração ou massa da espécie de interesse. Essa relação é determinada empiricamente, a partir dos sinais medidos pelo equipamento referente a cada concentração conhecida dessa espécie (RIBANI et al., 2004; NETO et al., 2002).

Para a construção da curva recomenda-se a medição de no mínimo 5 pontos, ou melhor, medir cinco concentrações diferentes, a fim de diminuir o erro no processo. Os valores desses dados experimentais foram correlacionados fazendo um tratamento por regressão linear e foi obtida equação simples do tipo $y = ax + b$ com coeficiente de correlação r , sendo “a” e “b” os coeficientes de regressão, “x” a concentração e “y” o sinal.

O *Software* Microsoft Excel[®] foi utilizado para plotar os dados e determinar os parâmetros de correlação. O valor de “R²” obtido, ao adicionar “linha de tendência” no gráfico plotado no Microsoft Excel[®], corresponde ao quadrado do coeficiente de correlação e quando multiplicado por 100, significa a porcentagem do quanto o modelo (equação) é adequado para descrever o fenômeno ou a correspondência entre as variáveis (PETERNELLI, 2007; RIBANI et al., 2004). Para a ANVISA, (2003) e o INMETRO, (2003) esse coeficiente deverá ser superior aos valores 0,99 e 0,90, respectivamente, para que um método de separação seja validado (RIBANI et al., 2004).

O Limite de detecção (LD) a qual corresponde a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo equipamento foi determinado baseando-se nos parâmetros da curva analítica. Já o limite de quantificação-LQ, representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida foi determinado pela mesma curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O LD e o LQ de cada curva analítica foram calculados de acordo com as equações (2) e (3) descritas:

$$LD = 3,3x \frac{s}{S} \quad \text{Equação (2)}$$

$$LQ = 10 x \frac{s}{S} \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo, s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser o coeficiente linear da equação obtida pela regressão linear e S é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da equação.

5.1.3.3 Curva de calibração, LD, LQ e faixa linear para o nitrato e sulfato

Para as análises de concentração de sulfato e nitrato da cinética microbiana, foi avaliado os parâmetros analíticos: curva de calibração, LD, LQ e faixa linear conforme descrito no item anterior.

O parâmetro de linearidade também foi analisado para as determinações de nitrato e sulfato. A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser constante. Essa faixa foi determinada pela divisão dos valores do sinal detectado pelo cromatógrafo (área do pico) pelas suas respectivas concentrações, fornecendo as respostas relativas e, em seguida, um gráfico foi construído com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x (RIBANI et al., 2004).

5.1.4 Injeção do meio de cultura e água produzida no cromatógrafo

Todas as amostras (meio de cultura e água produzida) antes de serem injetadas no cromatógrafo –CI sofreram um pré-tratamento, conforme descrito no item 5.1.2. As amostras eram descongeladas a temperatura ambiente e diluídas 500X e/ou 1000X com água ultrapura e, em seguida, injetada no CI utilizando o amostrador automático acoplado no equipamento.

Para a injeção das amostras no CI, foi realizada, previamente, a etapa de estabilização do equipamento a fim de obter uma linha de base estável. O procedimento de operação do cromatografo é descrito com maiores detalhes nos Apêndices D e F.

Neste trabalho todos os programas de injeções de amostras foram padronizados pelo método de padronização externa. Esse método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão (RIBANI et al., 2004). O padrão utilizado em cada seqüência de injeções foi o fornecido pela Dionex (USA) com sete ânions (Seven Anion Standard II P/N 057590).

5.2 DETERMINAÇÃO DE SULFATO POR ESPECTROFOTOMETRIA

A concentração de sulfato no meio de cultura foi determinada por método espectrofotométrico proposto por KOLMERT et al., (2000). Amostras foram filtradas em filtro 0,22 μ m e diluídas 25 vezes em água Milli-Q (Biocell) e o volume de 1,0 mL foi misturado a 1mL do solução condicionante. Em seguida, misturou-se 70mg de BaCl₂.2H₂O a amostra e agitou durante 30 segundos em agitador de tubos tipo Vortex (2500 rpm). Imediatamente foi medida a absorbância a 420nm.

Foi construída uma curva de calibração com pontos variando de 1 a 1000mg L⁻¹ em triplicata, utilizando-se como padrão Na₂SO₄ preparado em solução estoque a 1000mg L⁻¹ e um padrão comercial Dionex (*Combined Seven Anion Standard II P/N 057590*). Nesta calibração foi comparado dois espectrofotômetros (Biospectro SP22 e o HACH DR-2500) para a realização da leitura das amostras e o “branco” foi preparado seguindo o mesmo procedimento substituindo a amostra por água ultra-pura (Mili-Q).

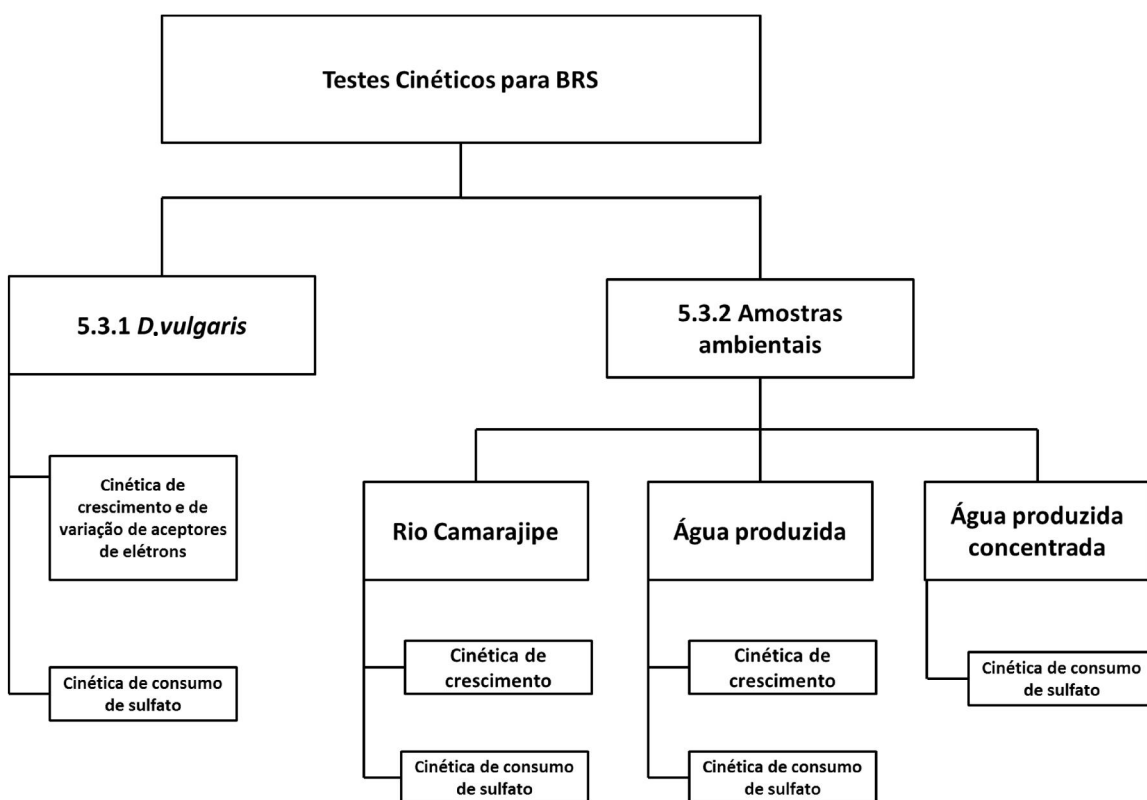
A solução condicionante foi preparada contendo os reagentes descritos na Tabela 7 e utilizando água ultra pura.

Tabela 7- Reagentes da solução condicionante

Solução Condicionante	
Reagente	Quantidade
NaCl P.A.	150 g
Glicerol P.A.	100mL (196g)
HCl P.A.	60mL
Etanol 95% IMPM	200mL

5.3 CINÉTICA MICROBIANA

A cinética microbiana foi dividida em ensaios para a cepa *Desulfovibrio vulgaris* e amostras ambientais, o diagrama representado na Figura 9 resume esses ensaios de cinética.

Figura 9- Diagrama do resumo de ensaios de cinética para BRS

5.3.1 *D. vulgaris*

Nos experimentos foi utilizado uma cepa de BRS modelo, a *Desulfovibrio vulgaris* (ATCC29579, DSMZ-644) pertencente a coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos – LABEM, adquirida da coleção de cultura DSMZ (*Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*). Esta cepa foi cultivada em meio Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63), ver ANEXO A, conservada em glicerol a 20% e armazenadas em criotubos à -70°C em ultra-freezer.

5.3.1.1 *Cinética de crescimento e de consumo de aceptores de elétrons (nitrato e sulfato) por Desulfovibrio vulgaris*

Para avaliar a cinética do consumo de nitrato e sulfato foram realizadas curvas de crescimento com a cepa *Desulfovibrio vulgaris* em meio de cultura DSMZ-63, porém com o sulfato de ferro substituído por sulfato de sódio para não prejudicar as análises de densidade ótica e cromatográfica.

Os cultivos anaeróbios foram realizados em frascos de vidro penicilina de 10mL e 50mL hermeticamente lacrados com tampas de borracha butílica e selo de alumínio. Os frascos contendo o meio Desulfovibrio-broth foram esterilizados por autoclavação a 121°C por 15 minutos. O corante rezaurina (agente redutor) contido no meio de crescimento Desulfovibrio foi utilizado como indicador de condições anóxicas (ATLAS e BARTHA, 1998; MADIGAN et al., 2010).

Foram realizadas quatro curvas de crescimento para o *D. vulgaris* utilizando quatro diferentes tratamentos: i) tratamento 1–T1 (sulfato) utilizando meio de cultura DSMZ- 63; ii) tratamento 2 – T2 (sulfato + nitrato) , meio de cultura DSMZ- 63 com adição de nitrato 320mg L⁻¹ (\cong 5mmol L⁻¹); iii) tratamento 3 – T3 (sulfato + cloreto), meio cultura DSMZ- 63 com adição de cloreto 200mg L⁻¹ (\cong 5mmol L⁻¹); iv) tratamento 4 –T4 (cloreto + nitrato), meio cultura DSMZ- 63 ausente de sulfato (substituído por Cl⁻) e com nitrato a 360mg L⁻¹ (\cong 5mmol L⁻¹).

Para esses experimentos, seguiram-se as seguintes etapas:

- a) reativação da cepa – a cepa conservada em -70°C foi mantida a temperatura ambiente por 45 min e inoculada em meio DSMZ-63 com proporção 1:9 (10% inóculo/v) a 38°C por 48h;
- b) repique da cepa a 10% (v/v) de inóculo e incubada por 12h a 38°C;
- c) inoculação em 30 frascos com auxílio de seringas estéreis descartáveis – 0,5 ml de suspensão bacteriana (pré-inóculo) em 45,5 ml de meio *Desulfovibrio* e incubado a 38°C;
- d) retirada de alíquotas em triplicata de cada tempo de incubação: 0h, 3h, 5h, 8h, 10h, 12h, 16h, 24h, 36h e 48h e posteriormente realizadas as análises de densidade bacteriana por espectrofotometria (densidade ótica a 560nm - DO560) no espectrofotômetro DR2500 (Hach company) tendo como branco o meio de cultura e contagem por microscopia de epifluorescência com laranja de acridina (MELA) conforme descrito por Alef e Nannipieri, (1995) (KAMARASWAMY et al., 2011; ALEF e NANNIPIERI, 1995). A análise cromatográfica de íons foi realizada conforme descrito no item 5.1.4 .

Para o pré-inóculo seguiram-se os itens “a” e “b” descritos acima e o mesmo foi realizado da mesma forma para todas as curvas de crescimento da *D. vulgaris*.

Foi realizada uma correlação entre contagem direta por MELA e DO560 com os pontos da curva de crescimento.

A Figura 10 resume a metodologia experimental para estudo da cinética de crescimento de *D. vulgaris* com diferentes aceptores de elétrons no meio de cultura.

Para cada curva de crescimento em determinado meio com tratamento, foi calculado os parâmetros de crescimento celular: o tempo de duração da fase de crescimento exponencial, o tempo de geração, o número de gerações e coeficiente de crescimento específico. Sabendo-se que as bactérias crescem por fissão binária, a fórmula que expressa o crescimento exponencial é dada:

$$N = N_0 2^n \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

N= número final de células;

N₀= número inicial de células;

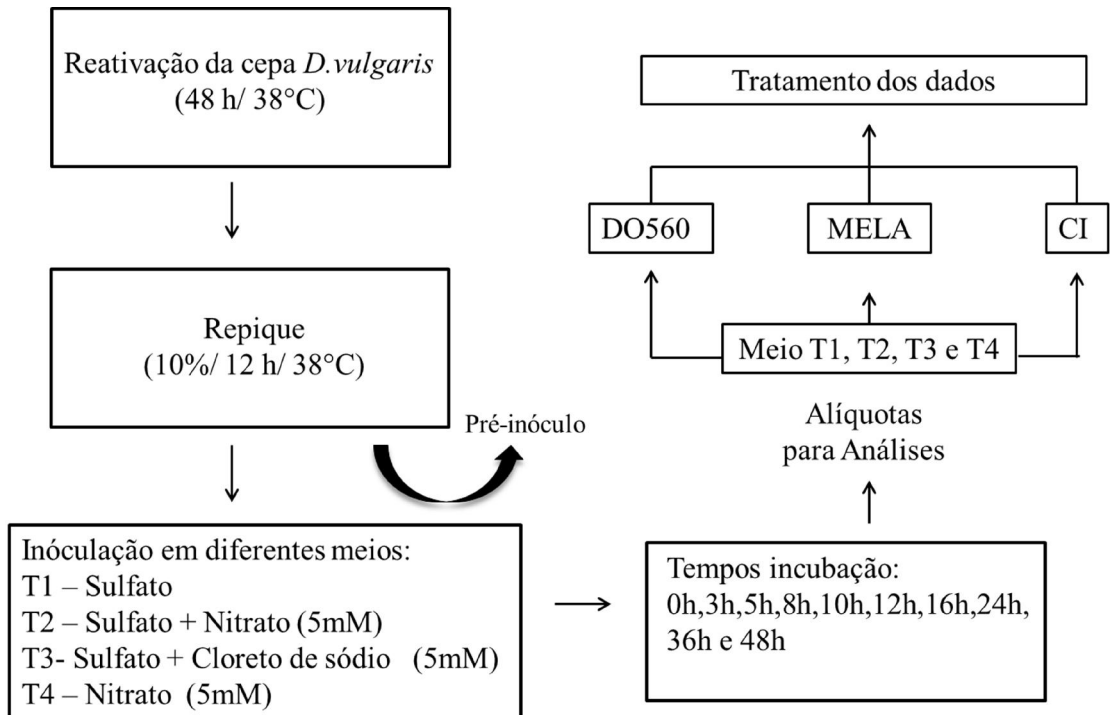
n= número de gerações que ocorrem na fase exponencial.

Os cálculos referentes ao tempo de geração “g” da população celular foram calculados durante o período da fase exponencial da curva, através da população inicial e final e do período da exponencial, conforme segue nos cálculos das equações (Equação 5) e (Equação 6)

$$g = t / n \quad \text{(Equação 5)}$$

onde: t = tempo em horas de crescimento exponencial e; n= número de gerações durante esta fase. Dessa forma conhecendo-se os parâmetros “N” e “N₀” na fase de crescimento exponencial é possível calcular “n” e, a partir de “n” e do tempo “t”, calcula-se o tempo de geração “g” (MURRAY et al., 1980; MADIGAN, 2010)

Figura 10 – Resumo da metodologia cinética de crescimento em meios com tratamentos diferentes.



A Equação 4 pode ser reescrita em termos de n:

$$\log N = \log N_0 + \log 2$$

$$n = 3,3 (\log N - \log N_0) \quad \text{(Equação 6)}$$

A partir dos dados da DO e MELA correlacionou as duas técnicas através da análise do coeficiente de correlação do gráfico plotado tendo DO *versus* contagem direta.

O coeficiente de crescimento ou velocidade específica de crescimento (μ) foi calculado a partir dos logaritmos natural dos valores da população na fase exponencial de cada curva quando são plotados e se obtém a regressão linear dos pontos. Esse coeficiente foi obtido a partir do coeficiente angular da função linear ($y=ax+b$). Uma outra forma de calcular o “ μ ” é pela divisão $\ln 2$ sobre o tempo de geração.

5.3.1.2 *Cinética do consumo de sulfato em amostras padronizadas com variação de biomassa inicial de D. vulgaris*

A comparação da cinética de consumo de sulfato por diferentes densidades iniciais de biomassa (população bacteriana) de *D. vulgaris* foi realizada em um período de 3h 45min a 38°C para evitar significativas variações no número de micro-organismos. Este processo experimental pode ser descrito em três etapas: i) preparação do pré-inóculo e inóculo; ii) inoculação e incubação das amostras com biomassa de concentrações diferentes a 38°C; iii) Avaliação da variação do consumo de sulfato comparando-se as concentrações após a inoculação (tempo inicial) e as 3h 45min de incubação(tempo final).

- i) primeiramente, foi preparado o pré-inóculo, conforme descrito na alínea “a)” e “b)” do item 5.4.1, posteriormente inoculou-se em meio DSMZ-63 10% (v/v) e incubou-se a 38°C por 48 horas. Em seguida foi realizada uma nova inoculação a 10% (v/v) em um novo meio DSMZ-63 e incubação por 12 horas a 38°C. Após o período de incubação mediu-se a densidade ótica –DO560 para determinar a quantidade de células através da correlação da absorbância com a contagem direta de células por epifluorescência/acridina realizada previamente quando da determinação da curva de crescimento. A variação da biomassa foi determinada nas amostras submetendo-as à centrifugação (10min a 12857x G) e preparo de diversas concentrações conforme Tabela 8. Depois do processo de centrifugação, mediu-se por DO560 a absorbância de cada inóculo com diferentes populações bacterianas;

Tabela 8 – Valores de volumes de inóculos, resuspensão e fatores de concentração do processo de concentração e diluição através da centrifugação.

Volume inóculo centrifugado	Volume ressuspensão	Fator de concentração em relação ao inóculo
200 mL	20 mL	10x
100 mL	20 mL	5x
50 mL	20 mL	2,5x
25 mL	20 mL	1,25x
12,5 mL	20 mL	0,625x
6,25 mL	20 mL	0,3125x

- ii) foi realizada uma inoculação a 10% (v/v) para cada concentração de biomassa, em triplicata, e a seguir, alíquotas foram retiradas para análises cromatográficas (tempo 0 h), seguida da incubação, a estufa 38°C por 3h45min(tempo 3,75h), quando novamente foram retiradas alíquotas para análises cromatográficas a fim de avaliar o consumo de sulfato ocorrido no período .
- iii) a avaliação do consumo de sulfato (concentração de sulfato inicial – concentração de sulfato final) foi correlacionada com a população inicial de bactérias (inóculo).

5.3.1.3 Cinética do consumo de sulfato em condições padronizadas e com variação de biomassa de *D. vulgaris* em um período de 6h

Neste ensaio a cinética de consumo de sulfato foi avaliada para diferentes densidades iniciais de *D. vulgaris* como inóculo em um período de 6 horas a 38°C. A concentração de sulfato foi padronizada a 3000mg L⁻¹.

O meio de cultura utilizado foi o DSMZ-63 sem sulfato e sem ferro, esterilizado em autoclave. A solução de sulfato (sulfato de sódio e sulfato de magnésio) foi preparada em separado, aquecida até a fervura e em seguida foi esterilizada por filtração utilizando filtro com membrana de 0,22 µm. Adicionou-se a solução ainda quente no meio de cultura de modo

que ao final o meio ficasse com uma concentração padronizada de 3000 mg L⁻¹. Neste ensaio o volume do inóculo foi padronizado a 10%.

O inóculo com concentrações diferentes de *D.vulgaris* foi preparado a partir do pré-inóculo conforme descrito no item 5.3.1.1. Este pré-inóculo continha uma população estimada de $\cong 10^9$ bactérias/mL, baseando-se na curva de crescimento realizada no item 5.3.1.1. Logo em seguida, foi realizada diluições decimais seriadas a fim de obter inóculos com populações de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^9 para que ao inocular a 10% v/v essa população inicial no meio de cultura fossem obtidas concentrações finais de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^8 bactérias/mL.

O experimento de consumo de sulfato foi executado para cada inóculo em triplicata contendo determinada concentração de bactéria no meio DSMZ-63 já com a concentração de sulfato corrigida a 3000mg L⁻¹. Em seguida efetuaram-se os experimentos conforme abaixo:

- a) Foi feito inóculo das bactérias, sendo cada concentração em triplicata;
- b) O meio ficou em repouso por 1 hora e fez-se a retirada de alíquotas para efetuar as contagens das bactérias pela técnica do número mais provável (NMPINGRAHAM, 2011; FENG e WEAGANT, 2002), ver (APENDICEE E), e pela técnica direta por microscopia de epifluorescência com DAPI (MEDAPI) (KEPNER e PRATT, 1994). As mesmas amostras foram também submetidas às análises de sulfato, por espectrofotometria e, de sulfeto por colorimetria;
- c) As culturas em triplicata foram incubadas a 38°C e a 120 rpm por 5h;
- d) As alíquotas foram retiradas, novamente, das culturas para as análises descritas na alínea “b”;
- e) Os dados foram tratados e os resultados avaliados.

5.3.2 Consórcio de amostra ambiental

O consórcio consiste na microbiota presente na amostra de água produzida de um poço produtor de petróleo do recôncavo Baiano e da água coletada na foz do Rio Camarajipe da região Costa Azul da cidade Salvador- BA. Entretanto as amostras de água produzida foram de dois tipos: original (coletada e sem pré-tratamento de amostra) e; a pré-concentrada (passada por um pré-tratamento).

5.3.2.1 Cinética do consumo de sulfato por BRS em amostra de água produzida da indústria de petróleo

A amostra de água produzida (AP) foi coletada em 10 de abril de 2014 em um poço de petróleo na região do Recôncavo Baiano com histórico de *souring* e imediatamente acondicionada em recipiente de vidro âmbar e contendo uma solução constituída de 0,5% Tiosulfato de sódio, 0,1% Sulfito de sódio e 0,1% Tween por volume de amostra para neutralizar os biocidas usualmente empregados na indústria de petróleo. O frasco contendo os neutralizantes foi previamente esterilizado por autoclavação a 121°C por 20 minutos. Após a coleta, a amostra foi armazenada a 4°C e transportada ao laboratório.

Para a realização do ensaio de consumo do sulfato pela microbiota sulfetogênica naturalmente presente na água produzida, inocularam-se, em triplicatas, diferentes volumes da amostra em dois meios de cultura para BRS, o meio Postgate modificado (CARVALHO, 2010) (ANEXO B) e o meio DZMZ 63 (ANEXO A). Os meios de cultura (Postgate-modificado e DSMZ-63) foram preparados em três fatores de concentrações (1,25x; 1,43x; 2x) e sem a presença de ferro. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 38°C por 4 horas. O experimento de consumo de sulfato foi executado para cada meio de cultura da seguinte forma:

- a) realizou-se inóculo de 20% v/v de água produzida para o meio concentrado 1,25x, 30% v/v para o meio 1,43x e 50% v/v para o meio 2x. Sendo cada concentração da inoculação feita em triplicata;
- b) posteriormente, repousou os frascos por uma hora e retirou alíquotas dos frascos inoculados para serem feitas as análises de contagem por NMP, MELA e concentração de sulfato por cromatografia de íons;
- c) após retirada de alíquotas levou-se os frascos para serem incubados na estufa incubadora a 38°C, 120rpm por 3 horas;
- d) após o período de incubação, retirou as alíquotas para realizar as mesmas análise descritas na alínea “b)”
- e) enfim foi tratado os dados e comparado o consumo de sulfato com porcentagem de inóculos diferentes, como também a influencia de um meio de cultura diferente.

5.3.2.2 *Cinética do consumo de sulfato por diferentes densidades de BRS crescidas em consórcios obtidos de amostras ambientais*

Esse experimento foi realizado com culturas de BRS isoladas de amostras ambientais. Uma mistura de BRS foi obtida através da coleta no Rio Camarajipe localizado na região metropolitana de Salvador conhecida como Costa Azul. Esse rio recebe uma contaminação substancial de dejetos de esgoto doméstico (ROSSI et al., 2012) e, na sua foz no mar, este rotineiramente exala um cheiro característico de sulfeto indicando a presença significativa de BRS. A segunda cultura foi obtida através do isolamento de BRS presentes em água produzida de petróleo (AP). Essas misturas de BRS, ou consórcios, foram mantidos em laboratório através de repiques a cada 72 horas em meio Postgate B.

A terceira mistura de BRS ambiental refere-se ao teste feito diretamente com a água de produção da indústria de petróleo- água produzida concentrada (AP-C). Como o objetivo de avaliar o consumo de sulfato em curto período de tempo e o de indicar a densidade de BRS nas amostras, foi testada uma amostra ambiental para qual essa técnica teria utilidade prática. Sabe-se da existência de BRS na água de produção de petróleo, e a sua densidade é rotineiramente avaliada através de métodos de cultivo. Juntamente com o método de cultivo, amostras de água de produção foram submetidas aos testes de consumo de sulfato. Para padronizar o experimento, uma vez que a densidade de BRS nas amostras coletadas é geralmente baixa (± 100 células/ml), foi feita uma concentração prévia de células através de centrifugação. Dessa forma, a densidade de BRS nas amostras de água produzida foi concentrada em 20 vezes. A centrifugação foi feita a $12857\times G$ por 10min e a $4^{\circ}C$. O experimento de consumo de sulfato foi, portanto, executado para cada inóculo citado da seguinte forma:

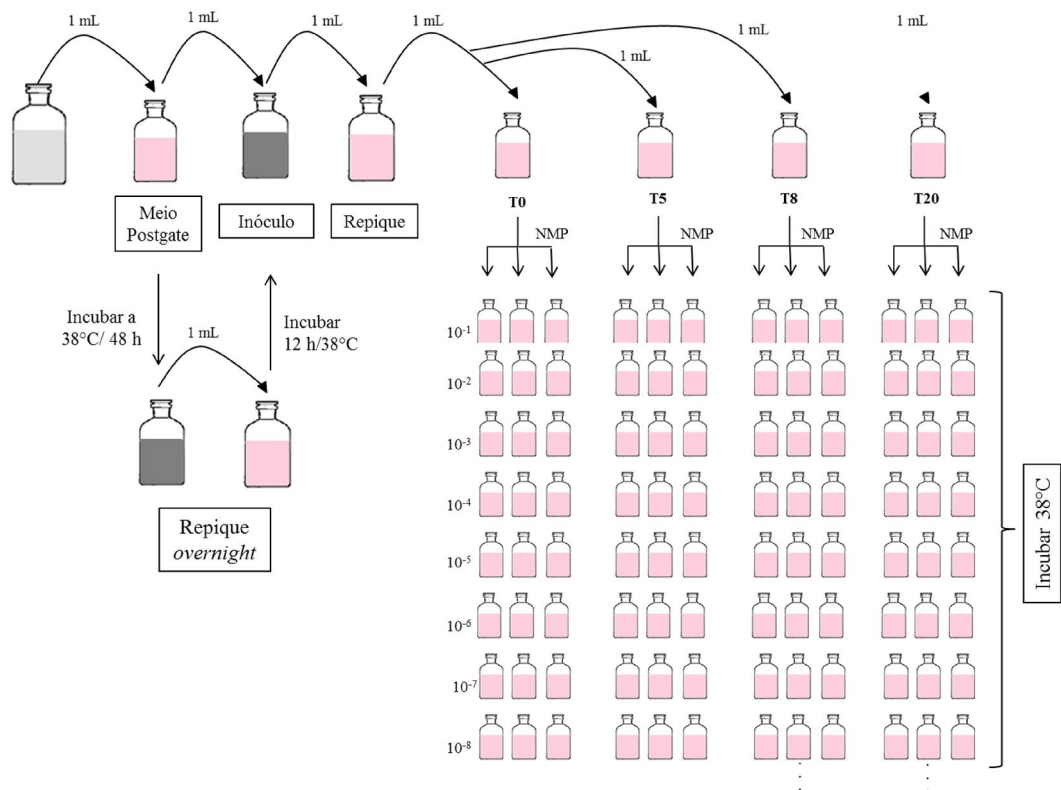
- a) realizou-se inóculo de 50% v/v de cada amostra (AP e AP-C) para o meio de cultura concentrado 2,08X,. Sendo cada inoculação feita em triplicata;
- b) em seguida, os frascos ficaram em repouso por uma hora, quando então foram retiradas alíquotas dos mesmos para serem feitas as análises de contagem por NMP e concentração de sulfato por espectrofotometria (KOLMERT et al., 2000)
- c) após a retirada de alíquotas levou-se os frascos para serem incubados em estufa a $38^{\circ}C$ e 120 rpm por 3 horas;

- d) depois de incubadas, foram retiradas as alíquotas para realizar as mesmas análises descritas na alínea “b”);
- e) Por fim, os dados foram tratados e o consumo de sulfato foi comparado para os dois inóculos com concentrações diferentes (AP e AP-C).

5.3.2.3 Comparação da cinética de crescimento entre o consórcio oriundo da água produzida e a coletada no Rio Camarajipe

A cinética de crescimento das microbiotas de água do Rio Camarajipe - Costa Azul (CA) e água produzida (AP) foram realizadas a partir do processo de repique *overnight* e em seguida avaliou o crescimento por NMP nos tempos 0h (T0), 5h (T5), 8h (T8), 15h (T15) para AP e CA e 20h (T20) somente para (AP). O meio de cultura utilizado foi o Postgate-modificado e o inóculo foi padronizado em 10%, a Figura 11 resume o procedimento realizado.

Figura 11 - Esquema resumido da curva de crescimento da microbiota da amostra. Proporção inóculo/meio de cultura = 1:9.



Através do resultado da contagem por NMP foi plotado o gráfico tendo nos eixos Tempo x ln população e foi calculado os parâmetros da curva conforme descrito no item 5.3.1.1 para as duas curva de crescimento.

5.3.2.4 Cinética do consumo de sulfato com variação de biomassa microbiana de uma amostra do rio Camarajipe

O experimento consistiu inicialmente no aproveitamento da população microbiana presente em cada amostra, ambiental de água do rio Camarajipe - Costa Azul (CA) e água produzida (AP) para avaliar o consumo de sulfato em cada população inicial variada por diluição seriada.

As amostras (CA e AP) que estavam armazenadas a 4°C foram colocadas a temperatura ambiente por 10 min e inoculadas no meio de cultura Postgate-modificado e incubadas a 38°C por 48 horas. Após o período de incubação foi realizado um repique, de cada cultura, em um meio Postgate modificado novamente e, em seguida, foram incubadas por 12h. A partir dessa cultura incubada, foi realizado um NMP para quantificar a população microbiana.

Através dos resultados do NMP pós 12h foi possível quantificar a população e em seguida fazer as diluições seriadas para obter amostras com populações: 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cel/mL. Como o inóculo será de 10%, estima-se que a população microbiana passará para 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 cel/mL no meio de cultura que será avaliado o consumo de sulfato. As amostras foram identificadas como, frasco mãe (inóculo com 14h de incubação)-FM, primeira diluição do inóculo-1D, segunda diluição do inóculo-2D, terceira diluição do inóculo- 3D e quarta diluição do inóculo-4D. Portanto foi avaliado o consumo de sulfato para cada população inicial de micro-organismos no meio de cultura DSMZ 63 com concentração de sulfato corrigido para 3000mg L^{-1} e adição de $1\text{mmol/L Na}_2\text{S}$ (sulfeto de sódio) em dois períodos 1h após o inóculo -T1 e 6h após inóculo T6 com período de incubação entre 1h e 6h a 120rpm a 38°C. A sequência experimental do consumo segue da mesma forma que descrito nas alíneas “a)” até “e)” do item 5.3.1.3, porém o tempo de incubação foi de 6h e as análises restringiram-se em NMP e análise de sulfato por cromatografia.

5.3.3 Contagem direta

A contagem direta por contagem por microscopia de epifluorescência foi realizada com dois tipos de corantes seja laranja de acridina (MELA) ou DAPI (MEDAPI) os procedimentos foram seguidos conforme descrito por Kepner e Pratt,(1994).

5.3.4 NMP

Para a realização da contagem das células viáveis foi utilizada a técnica de número mais provável (NMP). O meio de cultura utilizado na técnica foi o Postgate-modificado. Este meio é eletivo para as BRS e quando existe crescimento o meio passa a ficar preto devido a formação do sulfeto de ferro (precipitado negro). O NMP baseia-se na técnica de diluições seriadas até o último frasco que não apresenta crescimento. O NMP foi realizado em triplicata para cada série de diluição e o fator de diluição foi de 10x, isto é, o volume de inóculo foi de 10% para cada diluição. O procedimento detalhado é descrito na sequência:

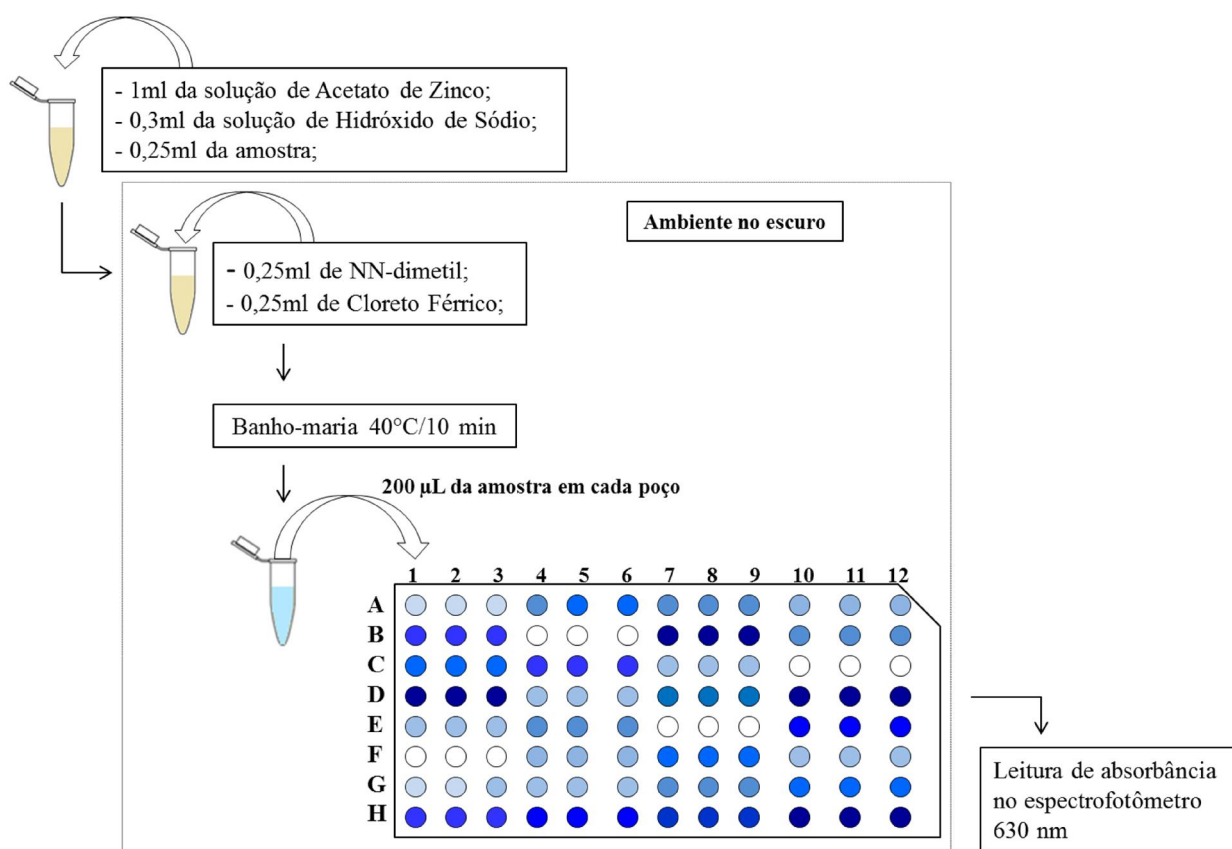
1. Com o auxílio de uma seringa estéril adicionar 1mL do inóculo em um frasco de pecinilina da primeira diluição (10^{-1}) contendo o meio de cultura específico, seguir com a mesma seringa para as réplicas;
2. Homogeneizar a amostra;
3. Posteriormente, com uma seringa estéril, retirar um 1mL do frasco (10^{-1}) e injetar no próximo frasco da diluição seriada (10^{-2}), repetir esse procedimento até a última diluição;
4. Na última diluição retirar 1mL com auxílio de uma seringa estéril e descartar a alíquota.
5. Incubar a 38°C, por 28 dias;
6. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar ou zona asséptica do bico de Bunsen;
7. Para o padrão de crescimento são considerados positivos os frascos que apresentarem coloração negra.

A leitura do NMP consiste na avaliação do número de frascos positivos (frascos com o meio de cultura negro) das três últimas séries de triplicatas da diluição e com um auxílio de uma tabela, ver o procedimento detalhado em APÊNDICE E.

5.3.5 Determinação de sulfeto por azul de metileno

A determinação de sulfeto foi realizada pelo método colorimétrico baseando-se na formação do azul de metileno como produto de reação (CARVALHO, 2010). O espectrofotômetro utilizado foi o Bio-Tek EL800 – do tipo Leitor de ELISA e o comprimento de onda de 630nm. Um esquema resumido é descrito na Figura 12.

Figura 12 – Esquema do procedimento para determinação de sulfeto



5.3.6 Coloração Gram

Para a caracterização morfotitorial, foi utilizada a técnica de coloração de Gram a partir de um kit fornecido pela empresa “Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda”.

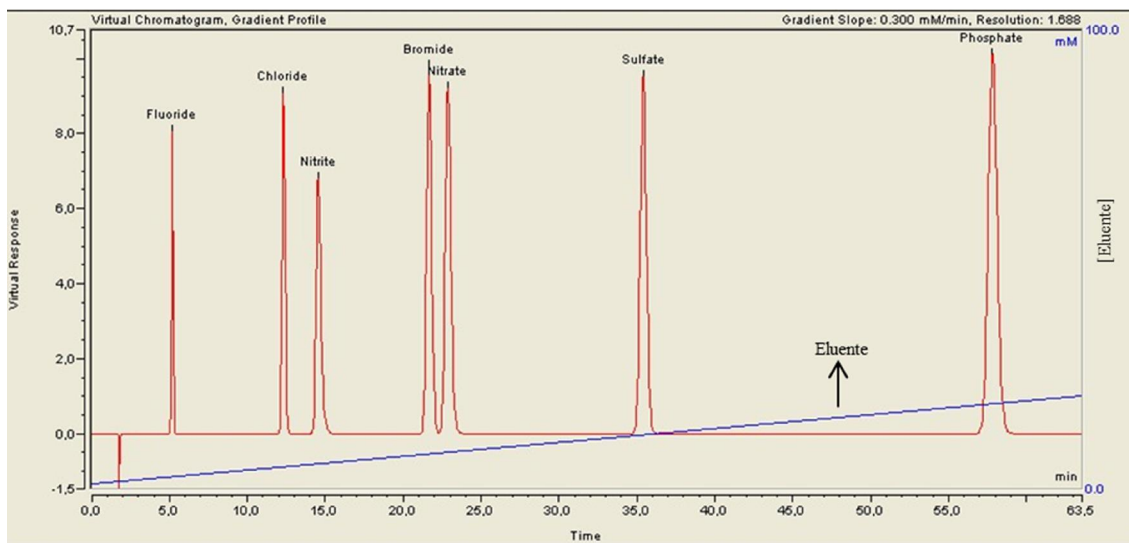
As amostras analisadas foram preparadas em lâminas de vidros e fixadas, posteriormente submetidas à coloração utilizando os corantes na seguinte forma: violeta, lugol, descorando com álcool acetona e posteriormente contracorando com fucsina (MAHON e MANUSELIS, 1997).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ANÁLISE DE ANIONS POR CROMATOGRAFIA

Com a injeção da solução estoque 17 ânions (tungstato, sulfeto, fosfato, molibdato, oxalato, sulfato, nitrato, nitrito, cloreto, piruvato, butirato, propionato, acetato, fluoreto, formiato, succinato e citrato) foi possível separar e identificar todos os ânions. Nessa separação, o tempo de corrida foi de 45 minutos, isto é, uma quantidade muito maior de ânions detectados e separados em um tempo de corrida menor quando comparado com o método fornecido pelo fabricante, Figura 13, e outros autores (MILLER e SCHNUTE, 2012; DOMINGOS et al., 2012; XIE et al., 2012). Uma boa reprodutibilidade do método foi verificada, em todas as análises, quando eram injetados os padrões para construir a curva analítica.

Figura 13 – Cromatograma com programa de gradiente, observado na reta inclinada e descrito no eixo vertical direito, obtido pelo fabricante Dionex a partir da coluna AS11-HC, a 30°C e fluxo de 1mL/min.

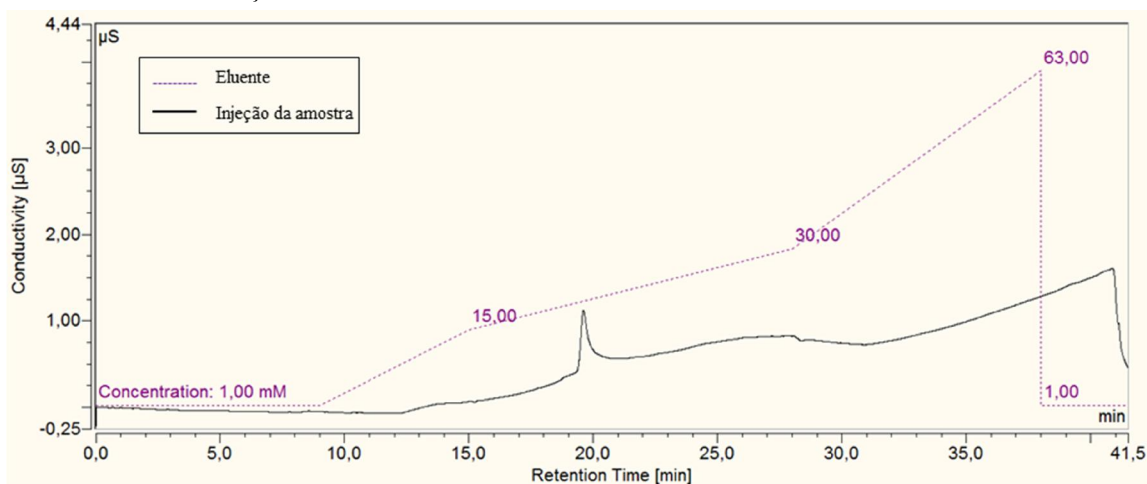


6.1.1 Parâmetros analíticos

6.1.1.1 Seletividade

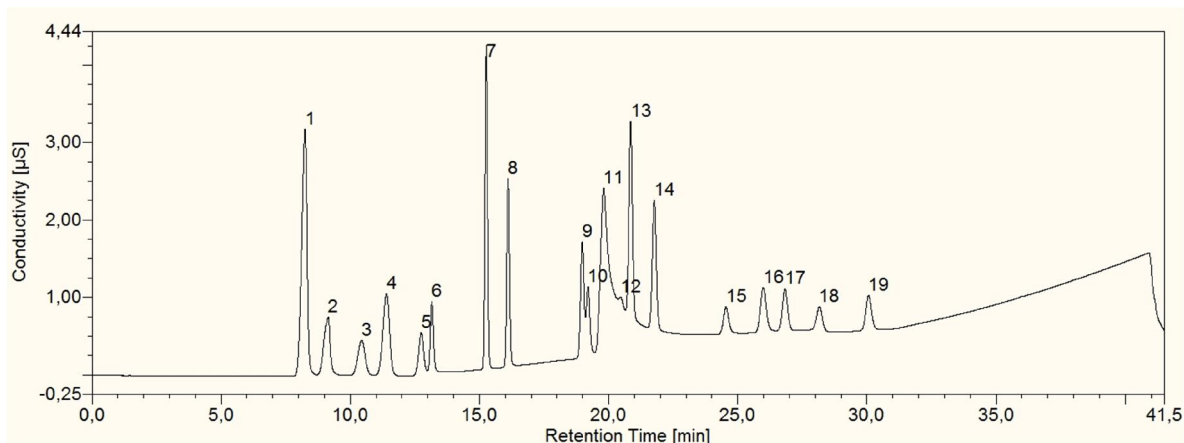
A seletividade foi avaliada através do diferencial entre os cromatogramas obtidos da água ultrapura e os obtidos da solução com os analitos. O resultado foi comparado com o método proposto pelo fabricante no qual apresenta uma separação de sete ânions, Figura 13, como também a de outros autores Domingos, et al., (2012), 14 ânions e Christison et al., (2011), 16 ânions. O método desenvolvido foi muito seletivo, tendo pouco espúrio ou ruído na linha de base durante a injeção da água ultrapura, Figura 14, e obtendo 19 picos, Figura 15. A identificação dos picos de cada analito foi realizada através da avaliação dos *outliers* induzida quando era adicionado uma quantidade maior do analito de ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) interesse para cada corrida cromatográfica.

Figura 14 – Cromatograma da injeção de água ultrapura utilizando o mesmo programa de eluição desenvolvido neste trabalho.



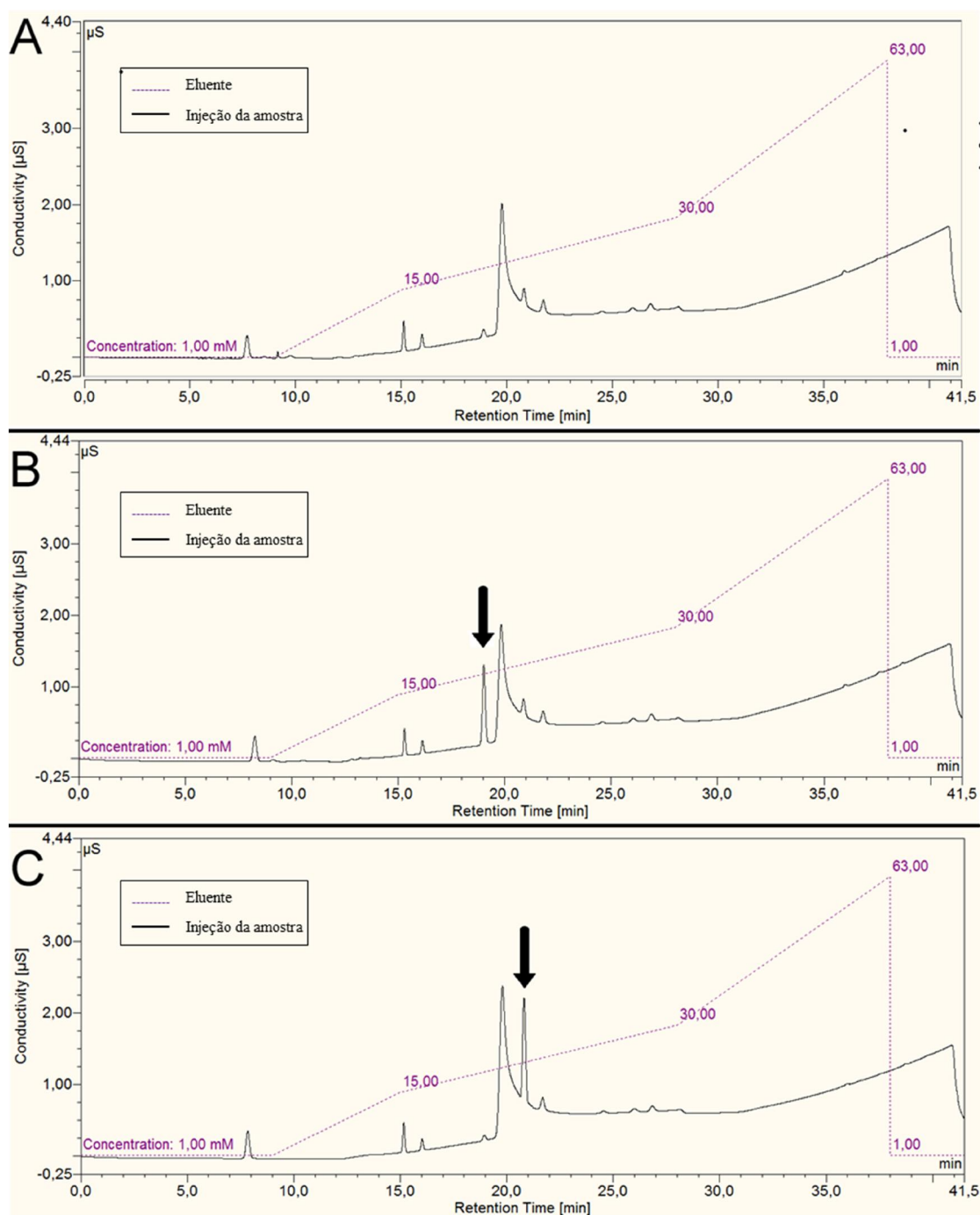
Entre os 19 picos obtidos, Figura 15, o pico nº11 com tempo de retenção- $t_R = 19,81$ min corresponde ao carbonato gerado pelo sistema de supressão de íons do equipamento. O pico nº12 pode estar associado a espúrio ou ruído e dentre os outros 17 picos, foram identificados 14 e os outros três picos (nº4, nº10 e nº19) não foram identificados. Logo, desta forma não foi possível distinguir os ânions succinato, formiato e o citrato e possivelmente coeluiu com o pico 9, Figura 15.

Figura 15 – Cromatograma com padrões para 17 analitos: 1 –Fluoreto- $t_R=8,18$; 2- Acetato- $t_R=9,09$; 3 –Propionato- $t_R=10,40$; 4 –não identificado- $t_R=11,40$; 5 –Butirato- $t_R=12,73$; 6 –Piruvato- $t_R=13,13$; 7 –Cloreto- $t_R=15,25$; 8 –Nitrito- $t_R=16,07$; 9 – Nitrato- $t_R=18,98$; 10 –não identificado- $t_R=19,20$; 11 –Carbonato- $t_R=19,81$; 12 –interferente- $t_R=20,46$; 13 –Sulfato- $t_R=20,86$; 14 –Oxalato- $t_R=21,75$; 15 –Tungstato- $t_R=24,53$; 16 – Molibdato – $t_R=25,98$; 17 –Fosfato- $t_R=26,81$; 18 –Sulfeto – $t_R=28,14$; 19 – não identificado – $t_R=30,06$.



A identificação dos picos (sinais) sulfato e nitrato foram significativamente notáveis quando comparado os cromatogramas da água ultrapura com o da água ultrapura + analito, Figura 16. O método foi muito eficiente na separação entre esses dois analitos não apresentando coeluição e tornando muito viável para as determinações em soluções aquosas realizadas neste trabalho de dissertação. A linha de base para o pico do sulfato representado pela seta “C” da Figura 15 está representada com um pouco de inclinação pois a concentração medida é de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, valor abaixo do limite de quantificação ($1740 \mu\text{g L}^{-1}$), Tabela 9. As análises de sulfato foram realizadas com concentrações acima do limite de quantificação.

Figura 16 – Comparação entre amostras (padrões) injetadas no CI. A- Padrões com 17 ânions (analitos) a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, B- Padrões a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e nitrato a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (identificado pela seta), C – Padrões $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e sulfato a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (identificado pela seta).



6.1.1.2 Curva analítica, limite detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Nesse trabalho foi determinada a curva analítica para cada espécie química identificada no cromatograma com o auxílio do *software* Microsoft Excel[®]. Os valores do coeficiente de correlação constatou que o método atende as normas de validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA para a maioria das espécies e para todas as espécies detectadas, bem como atende a validação pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO, Tabela 9.

Baseando-se na curva de calibração para cada ânion detectado, foram calculados os LD e LQ de cada uma das espécies. Tal método é muito sensível para detectar oxalato, fluoreto e fosfato apresentando valores para LD 19,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, 54,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 62,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, Tabela 9. O desvio padrão também foi verificado para os tempos de retenção.

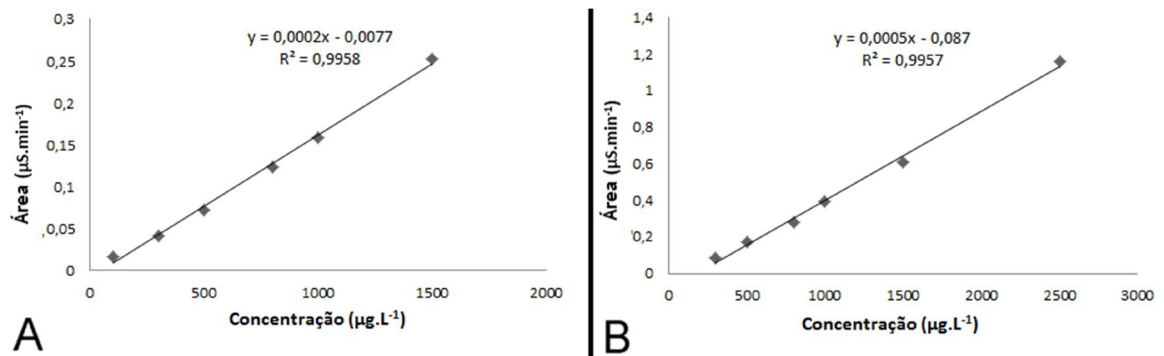
Tabela 9 – Figuras analíticas para os 14 ânions identificados por CI-condutividade

Pico	Íons	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linearidade- curva analítica	Coefficiente de correlação (R^2)	t_R (min)	Desv. Padrão t_R
1	Fluoreto	54,9	166,3	$y = 0,0008x - 0,0133$	0,9991	8,18	0,103
2	Acetato	85,8	260	$y = 0,0002x - 0,0052$	0,9893	9,09	0,083
3	Propionato	661,7	2005	$y = 0,0002x - 0,0401$	0,9775	10,40	0,073
5	Butirato	739,2	2240	$y = 0,0001x - 0,0224$	0,9775	12,73	0,043
6	Piruvato	306,9	930	$y = 0,0001x - 0,0093$	0,9999	13,13	0,051
7	Cloreto	113,5	344	$y = 0,0005x - 0,0172$	0,9992	15,25	0,025
8	Nitrito	169,4	513,3	$y = 0,0003x - 0,0154$	0,9994	16,07	0,055
9	Nitrato	127,1	385	$y = 0,0002x - 0,0077$	0,9958	18,98	0,005
13	Sulfato	574,2	1740	$y = 0,0005x - 0,087$	0,9957	20,86	0,009
14	Oxalato	19,8	60	$y = 0,0003x + 0,0018$	0,9998	21,75	0,021
15	Tungstato	83,3	252,5	$y = 0,00008x + 0,0020$	0,9995	24,53	0,022
16	Molibdato	716,1	2170	$y = 0,0001x + 0,0217$	0,9984	25,98	0,008
17	Fosfato	62,7	190	$y = 0,0001x + 0,0019$	0,9947	26,81	0,026
18	Sulfeto	591,3	1792	$y = 0,00005x + 0,0089$	0,9922	28,14	0,021

6.1.1.3 Curva de calibração, LD, LQ e faixa linear para o nitrato e sulfato

A curva de calibração do nitrato e sulfato foram obtidas por regressão linear e utilizadas para a determinação das concentrações de nitrato e sulfato nas análises do consumo pela *D. vulgaris*, Figura 17.

Figura 17 – Curvas de calibração no CI: A- Nitrato; B- Sulfato.



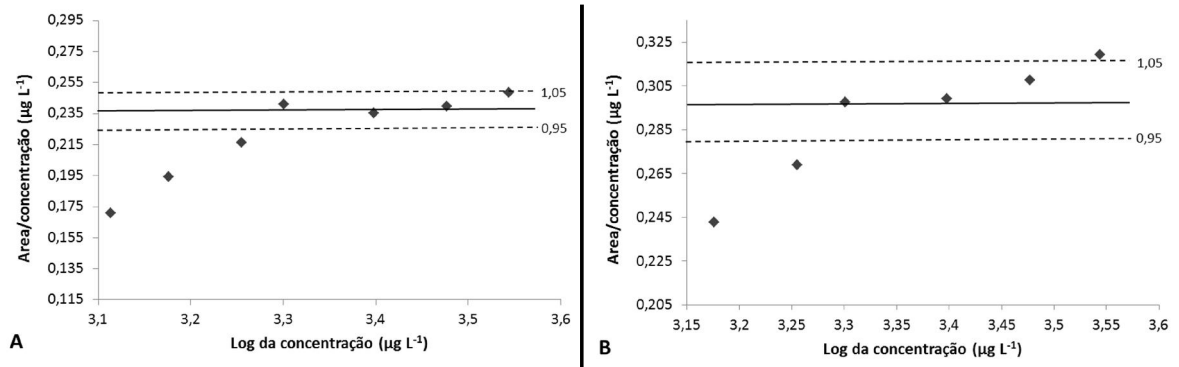
Os limites de detecção para o nitrato e sulfato foram, respectivamente, 0,127 mg L⁻¹ e 0,574 mgL⁻¹ e os LQ 0,385 e 1,74 mg L⁻¹, Tabela 10. A quantificação das concentrações das amostras foi ajustada por diluições a fim de serem determinadas acima dos LQ.

Tabela 10– Limites de detecção e quantificação de nitrato e sulfato por CI-condutividade.

Íons	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Nitrato	0,12705	0,385
Sulfato	0,5742	1,74

A linearidade apresentada no método foi avaliada num intervalo de 95% e 105% para as concentrações de nitrato entre 2000-3500 µg L⁻¹ e para sulfato 2000-3500 µg L⁻¹, Figura 18.

Figura 18 – Faixa linear entre 95% e 105%: A – Nitrato 2000-3500 $\mu\text{g L}^{-1}$; B – Sulfato 2000-3500 $\mu\text{g L}^{-1}$.



6.2 DETERMINAÇÃO DE SULFATO POR ESPECTROFOTOMETRIA

Com os dados da absorvância dos padrões de sulfato, verificou-se desvios elevados entre 1 a 20mg L^{-1} , ver Tabela 11. A faixa ideal é onde ocorre menor desvio e apresenta boa linearidade, ótima faixa de dinâmica linear compreende entre 40 e 200 mg L^{-1} para os dois espectrofotômetros (1- Biospectro sp22 e 2- Hach Dr2500), ver Tabela 11 e Figura 19 .

Ao adotar a faixa de quantificação entre 40 e 200 mg L^{-1} para o espectrofotômetro 1, foi obtido uma reta por regressão linear, $y=0,0052x-0,1022$, e coeficiente de correlação 0,9959, sendo y = valor da absorvância e x = concentração em mg L^{-1} , ver Figura 20. De forma análoga foi obtido resultados semelhantes para o espectrofotômetro 2, APÊNDICE H, isto indica que as análises podem ser feitas pelos dois espectrofotômetros e com ótima correlação. Essa faixa foi utilizada, pois correspondia os menores valores de desvio padrão entre as triplicatas, Tabela 11, e uma faixa linear observada no gráfico, Figura 19. Para análises entre 300- 800 mg L^{-1} é recomendado utilizar uma outra equação que melhor represente a curva analítica garantindo a linearidade pois, nesta faixa, existe uma mudança no coeficiente de inclinação, Figura 19.

Tabela 11 – Resumo dos resultados da concentração de sulfato dos padrões (1- 1000 mg L⁻¹) com seus respectivos desvios.

Amostra Padrão	Absorbância						Desvio triplicatas %	
	R1		R2		R3		1	2
	1	2	1	2	1	2		
1 mgL ⁻¹ dionex	0,005	-0,001	0,017	-0,005	0,014	0,011	52,0	499,6
5 mgL ⁻¹ dionex	0,011	0,011	0,006	0,007	0,006	0,005	37,7	39,8
10 mgL ⁻¹ dionex	0,022	0,021	0,013	0,022	0,022	0,027	27,3	13,8
20 mgL ⁻¹ dionex	0,039	0,033	0,078	0,080	0,040	0,046	1,8	23,3
20 mgL ⁻¹ Lab	0,124	0,115	0,041	0,033	0,048	0,042	11,1	17,0
40 mgL ⁻¹ dionex	0,126	0,098	0,098	0,089	0,110	0,093	12,6	4,8
40 mgL ⁻¹ Lab	0,111	0,094	0,114	0,107	0,130	0,130	8,6	16,5
50 mgL ⁻¹ dionex	0,142	0,142	0,149	0,135	0,142	0,130	2,8	4,4
50 mgL ⁻¹ Lab	0,147	0,131	0,153	0,139	0,150	0,138	2,0	3,2
70 mgL ⁻¹ LAB	0,234	0,224	0,247	0,227	0,268	0,241	6,9	3,9
80 mgL ⁻¹ LAB	0,307	0,281	0,303	0,288	0,317	0,288	2,3	1,4
100 mgL ⁻¹ LAB	0,427	0,401	0,403	0,373	0,415	0,380	2,9	3,8
120 mgL ⁻¹ LAB	0,523	0,507	0,541	0,501	0,552	0,529	2,7	2,9
140 mgL ⁻¹ LAB	0,655	0,625	0,652	0,627	0,658	0,629	0,5	0,3
150 mgL ⁻¹ LAB	0,714	0,686	0,734	0,713	0,678	0,649	4,0	4,7
175 mgL ⁻¹ LAB	0,824	0,791	0,827	0,790	0,800	0,767	1,8	1,7
200 mgL ⁻¹ LAB	0,910	0,892	0,884	0,873	0,920	0,895	2,1	1,3
300 mgL ⁻¹ LAB	1,130	1,141	1,235	1,241	1,263	1,264	5,8	5,4
400 mgL ⁻¹ LAB	1,412	1,461	1,368	1,388	1,361	1,378	2,0	3,2
500 mgL ⁻¹ LAB	1,494	1,522	1,606	1,583	1,615	1,685	4,3	5,2
700 mgL ⁻¹ LAB	1,827	1,927	1,827	1,936	1,778	1,859	1,6	2,2
800 mgL ⁻¹ LAB	1,870	1,993	1,884	1,990	1,947	2,049	2,2	1,7
1000 mgL ⁻¹ LAB	out	2,302	out	2,658	out	2,655	--	8,1

Figura 19 – Valores de absorbância para cada concentração de sulfato (1-800 mg L⁻¹). Espectrofotômetro 1- Biospectro sp22.

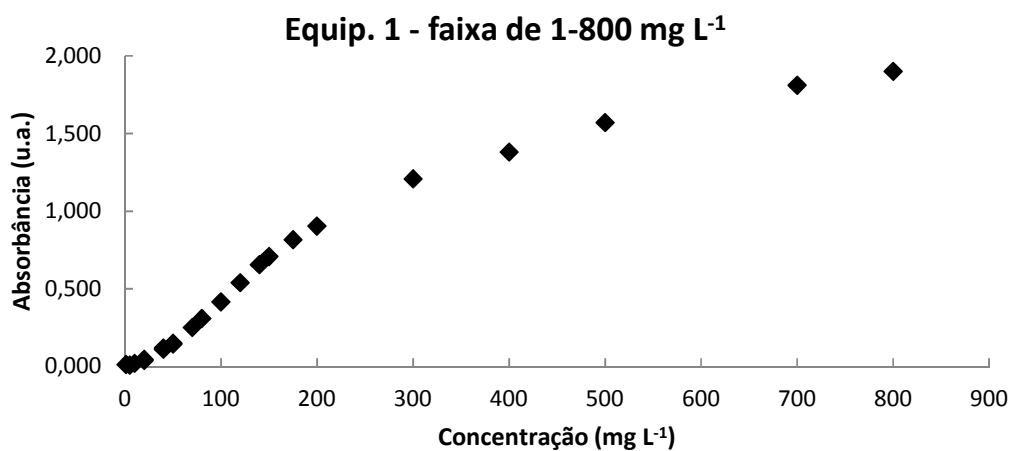
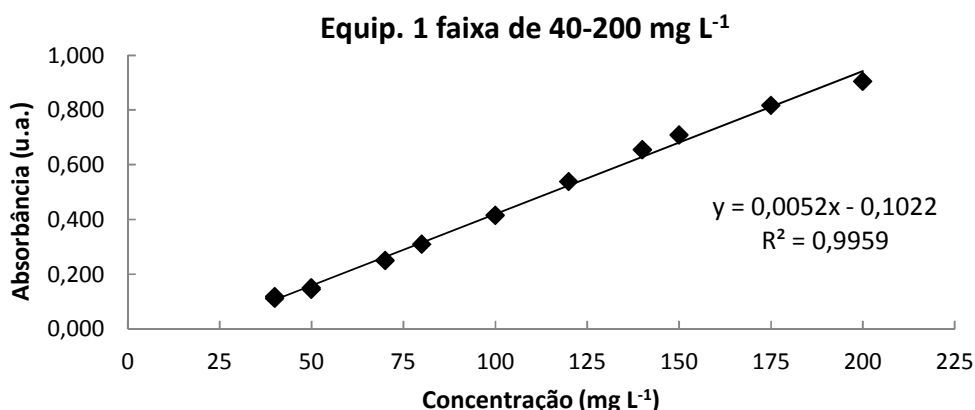


Figura 20 – Valores de absorvância para cada concentração de sulfato (40-200 mg L⁻¹) dentro da faixa linear de quantificação. Espectrofotômetro 1- Biospectro sp22.



6.3 CINÉTICA MICROBIANA

O conhecimento sobre a cinética das BRS (crescimento e consumo) é muito importante para entender os mecanismos de produção de sulfeto. A quantificação dessas bactérias até o presente é pelo método convencional, NMP. Este método é confiável e tem uma boa sensibilidade, porém o resultado do ensaio emana muito tempo, pelo menos 15 dias (QI et al 2014), por isso, essa dissertação tem um objetivo de desenvolver um método mais fácil e com um resultado mais rápido a fim de conhecer a quantidade populacional e/ou comportamento das BRS para que possa tomar as medidas necessárias.

Para entender a cinética das BRS foram realizados ensaios com a cepa *D. vulgaris* (referência em estudos de BRS) para compreender o comportamento perante aceptores de elétrons diferentes como também espécies químicas e meio que podem influenciar no crescimento e consumo de sulfato e nitrato da cepa. Esse entendimento ajudou para delimitar boas condições (meio de cultura, concentração de espécies químicas) para verificar consumo de aceptor de elétrons.

Diante de alguns dados sobre o comportamento da cepa, foi necessário o ajuste de outros parâmetros (procedimentos de contagem, controle e o preparo de diluição e concentração de inóculo, tempo de incubação) a fim de estabelecer um método em uma condição ótima para que a cepa consumisse o aceptor de elétrons sem que houvesse crescimento bacteriano. Essa estratégia segue os estudos de processos fermentativos na qual determinada cepa é submetida a uma condição de cultivo, o seu comportamento de

crescimento e consumo de metabólito é característico e pode ser reproduzido a fim de obter o mesmo resultado, comumente conhecido como modelo de Monod (MONOD, 1949).

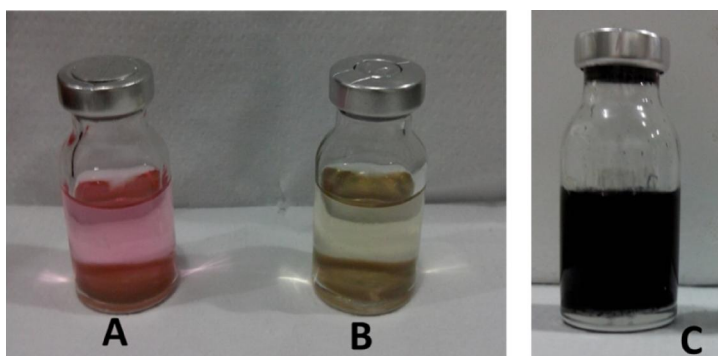
Neste trabalho a espécie consumida e avaliada nos ensaios foi o ânion sulfato (aceptor de elétrons das BRS). Este íon é muito estável em soluções aquosas ao ser comparado com o sulfeto (produto resultante do metabolismo das BRS). O consumo de sulfato foi relacionado com a população inicial (inóculo), isto é, para cada população de bactérias *D. vulgaris* foi obtido um consumo diretamente proporcional e com isto foi estabelecido um modelo expresso numa equação. A partir da equação é possível prever a população de células viáveis baseando-se no consumo.

6.3.1 *D. vulgaris*

6.3.1.1 *Cinética de crescimento e de consumo de aceptores de elétrons (nitrato e sulfato) por Desulfovibrio vulgaris*

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), quando ativas, reduzem o sulfato a H_2S que reage com o ferro presente no meio DSMZ- 63 gerando a coloração negra $FeS_{(s)}$ (Figura 21).

Figura 21 – **A**- meio de cultura Desulfovibrio DSMZ-63 autoclavado com indicativo de pouca concentração de oxigênio; **B** - meio de cultura Desulfovibrio DSMZ-63 autoclavado com indicativo de ausência de oxigênio; **C**- meio de cultura Desulfovibrio DSMZ-63 após crescimento de BRS.



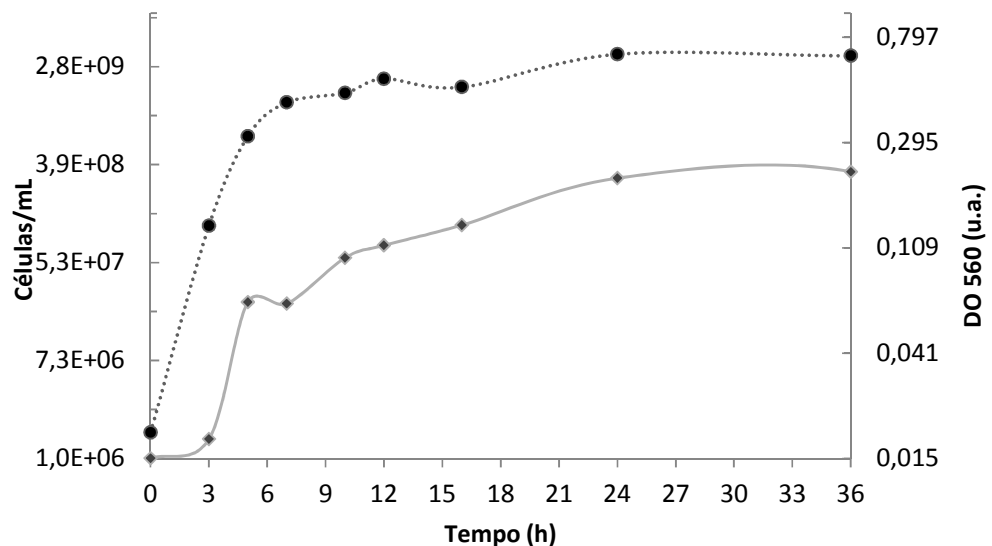
Através da curva de crescimento *Desulfovibrio vulgaris* em meio DSMZ- 63 foi possível avaliar o crescimento das bactérias e verificar que em menos de 12 horas com

inóculo a 1% (v/v) e incubada a 38°C, a cultura *D. vulgaris* já alcançou o fim da fase exponencial. Nessa fase, o meio de cultura apresentou uma população de aproximadamente 2×10^9 células/mL por contagem direta (Tabela 12 e Figura 22). O aumento do valor de densidade ótica após 12h de crescimento da *D. vulgaris* pode estar associado com a produção de biopolímero ou substâncias que influenciam positivamente na absorbância.

Tabela 12- Valores obtidos na curva de crescimento (contagem direta por MELA , DO *versus* tempo de crescimento) *Desulfovibrio vulgaris* em meio Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63).

Amostra	Tempo(h)	DO	Células/mL
T0	0	0,015	1,69E+06
T3	3	0,018	1,12E+08
T5	5	0,0655	6,86E+08
T8	7	0,0645	1,36E+09
T10	10	0,0995	1,66E+09
T12	12	0,112	2,20E+09
T16	16	0,1355	1,86E+09
T24	24	0,211	3,63E+09
T36	36	0,224	3,51E+09

Figura 22 – Curva de crescimento (contagem direta, DO *versus* tempo de crescimento) *Desulfovibrio vulgaris* em meio Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63), (●) Contagem por Microscopia de epifluorescência com laranja de acridina, (◆) Densidade ótica 560 nm.



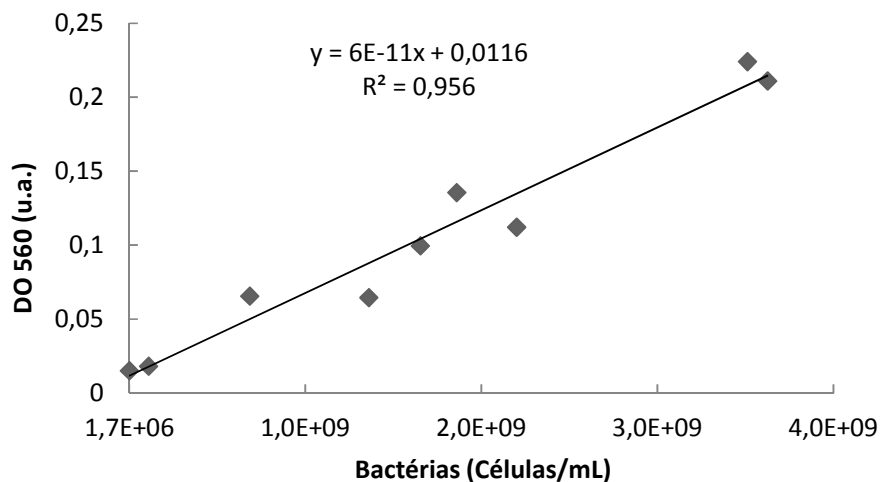
O tempo de geração de $\cong 1\text{h}$ foi calculado a partir da fase exponencial observada na contagem direta entre o período de 3- 7h de incubação, Tabela 13. Para esse mesmo período, o coeficiente de crescimento específico é de $0,62\text{ h}^{-1}$. Os parâmetros foram avaliados através da contagem direta, pois pela densidade ótica houve um *outlier* no tempo de “7h” que compreendia a fase exponencial (3-7h). O período entre 5-10h também foi avaliado, porém o resultado não pode ser considerado, pois corresponde a fase de desaceleração ou fim da fase exponencial (TORTORA et al., 2012; MADIGAN, 2010), apresentado um tempo de geração maior (4h) e um coeficiente de crescimento muito menor ($0,17\text{ h}^{-1}$) em relação ao período de 3-7h.

Nesta curva de crescimento foi possível correlacionar os dados da contagem por MELA com os dados obtidos da DO, e obter um gráfico com um “ $R^2=0,956$ ” e a equação “ $y= 6 \cdot 10^{-11}x + 0,0116$ ”, sendo “y” correspondendo a população de bactérias (*D. vulgaris*) em cel/mL e “x” como a DO, ver Figura 23. O intervalo de tempo utilizado para plotar o gráfico dessa correlação foi entre 0-36h da curva de crescimento.

Tabela 13- Parâmetros cinéticos para a curva de crescimento de *D.vulgaris* em meio DSMZ-63 a 38°C , sendo N= população final e N_0 = população inicial.

Fase crescimento	N ($10^6 \times$ Células/mL)	N_0 ($10^6 \times$ Células/mL)	Tempo geração- g	Coefficiente de crescimento específico- $\mu(\text{h}^{-1})$
3 -7 h	111,84	1363,2	1h7min	0,62

Figura 23– Correlação entre contagem por microscopia de epifluorescência com laranja de acridina (MELA) versus Densidade ótica (560nm).



Através dessa correlação o limite de detecção da DO para essa cultura de *D. vulgaris* foi calculado conforme a Equação 2 e está descrita na Tabela 14. Esse limite de detecção está relacionado ao equipamento espectrofotômetro HACH DR-2500.

Tabela 14- Valores do limite de detecção para a DO560 de *D. vulgaris* em meio DSMZ-63

Limite de detecção – LD	
(Células/mL)	Sinal (absorbância)
$6,38 \cdot 10^8$	0,050

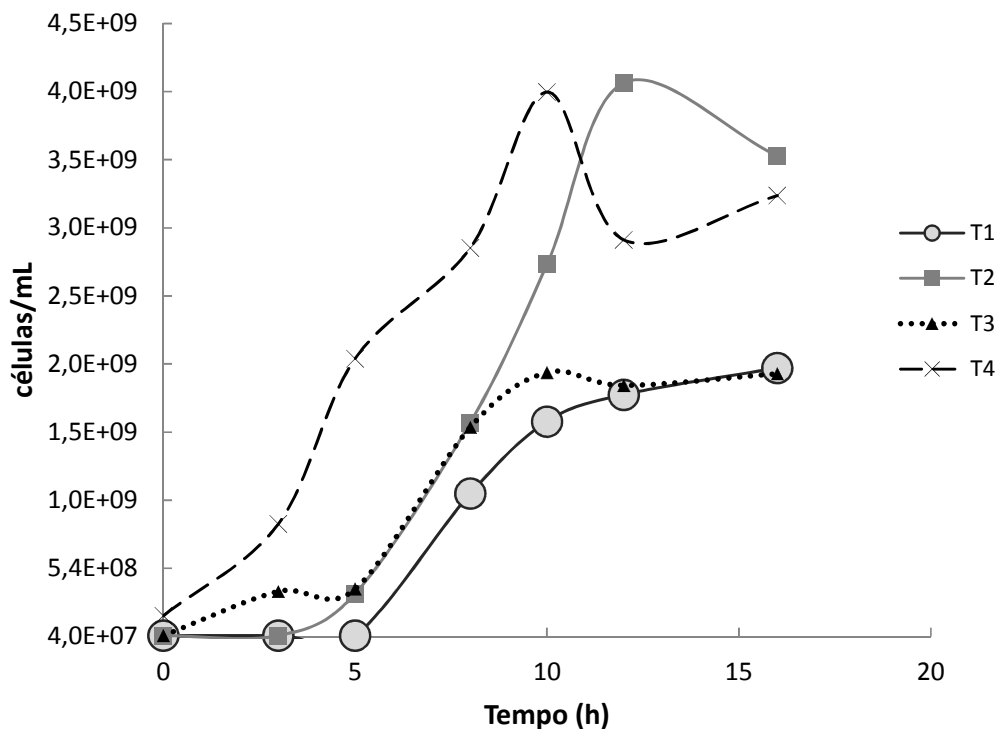
Essa curva de crescimento foi realizada para avaliar o comportamento da *D. vulgaris* no meio, DZMZ-63. Este meio de cultura foi escolhido, pois é o mais indicado (coleção de cultura DSMZ) para desenvolvimento dessa cepa.

Para as outras curvas de crescimento, comparou-se o crescimento da *D. vulgaris* em quatro tratamentos diferentes modificando o meio Desulfobrevibrio (DSMZ-63): i) comparando o efeito do nitrato em meio contendo sulfato, T1 (sulfato) e T2 (sulfato + nitrato); ii) comparando o efeito do acréscimo de cloreto (efeito osmótico) em meio com sulfato, T1 (sulfato) e T3 (sulfato + acréscimo de cloreto); iii) comparando o efeito do sulfato em meio com presença de nitrato, T2 (Sulfato e nitrato) e T4 (nitrato). A concentração de nitrato foi aproximadamente 5 mmol L^{-1} para os dois tratamentos (T2 e T4), pois essa é a comumente utilizada nas injeções nos poços de petróleo (DAVIDOSA et al., 2001).

i) O efeito do nitrato nas culturas influencia no crescimento da *D. vulgaris* como também no metabolismo de consumo de sulfato. A população da bactéria no meio com tratamento T1 chegou à fase estacionária com aproximadamente $2 \times 10^9 \text{ cel/mL}$ e em T2 foi $4 \times 10^9 \text{ cel/mL}$, isto é, uma concentração de aproximadamente 5mM de nitrato no meio propiciou o dobro do crescimento de *D. vulgaris* até a fase estacionária, ver Figura 24. Ao avaliar o tempo de geração (g) das células para T1 e T2 verificou-se que o nitrato diminui a velocidade de crescimento, tendo em T1 $\rightarrow g=1\text{h}$, e em T2 $\rightarrow g=1\text{h } 40\text{min}$, ver Tabela 15. Como também o coeficiente de crescimento específico é menor em presença de nitrato, sendo em T1 $\rightarrow \mu= 0,74\text{h}^{-1}$ e em T2 $\rightarrow \mu=0,42\text{h}^{-1}$, Tabela 16. O consumo de sulfato em T1 foi de $33\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e em T2 foi de $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Tabela 16. Logo o nitrato retarda o consumo de sulfato como também o crescimento das células, porém a população dessa bactéria na fase estacionária é o dobro em relação ao meio com tratamento sem nitrato, considera-se que ao esgotar o nitrato no meio, haverá um grande consumo de sulfato e conseqüentemente uma alta

produção de sulfeto devido à alta atividade dessas bactérias. Portanto, a adição de nitrato inibe o consumo do sulfato, pois, essa cepa tem a capacidade de utilizar o nitrato como acceptor final de elétrons.

Figura 24 – Curva de crescimento *Desulfovibrio vulgaris* em meio Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63) com diferentes tratamentos (concentrações sulfato, nitrato e cloreto): **T1**- 3000 mg L⁻¹ [sulfato], 800 mgL⁻¹ [Cl⁻] e ausência de nitrato; **T2** – 3000 mgL⁻¹ [sulfato], 800 mgL⁻¹ [Cl⁻] e 320 mgL⁻¹ [NO₃⁻] (≅5mM); **T3** – 3000 mg.L⁻¹ [sulfato], 1000 mgL⁻¹ [Cl⁻] (acréscimo de ≅5mM) e sem nitrato; **T4** – ausente de sulfato, 1600 mgL⁻¹ [Cl⁻], 360 mgL⁻¹ [NO₃⁻] (≅5,5mM).



ii) Avaliando a curva de crescimento é possível inferir que o tratamento com adição de cloreto, T3, não favoreceu o crescimento microbiano em relação ao tratamento T1 (meio DSMZ), tendo tempo de geração $g=2h10min \rightarrow T3$ e $g=1h \rightarrow T1$, Tabela 15, e os coeficientes específicos $\mu=0,34 h^{-1} \rightarrow T3$ e $\mu=0,74 h^{-1} \rightarrow T1$, Tabela 16, assim como, contribuiu para um menor consumo de sulfato ($16mg L^{-1}h^{-1}$) nas primeiras horas da curva de crescimento, Tabela 16. Apesar de o cloreto influenciar no metabolismo dessas bactérias, elas conseguem ficar metabolicamente ativas, porém com um rendimento menor. Essa tolerância ao cloreto também foi descrito por Zhou, 2013 para essa mesma bactéria em que, ao ser submetida a um estresse salino começa a se adaptar. Na adaptação as células começam a expressar genes que permite acúmulo de solutos orgânicos osmoprotetores (glutamato, glutamina, glicina e glicinabetaína)

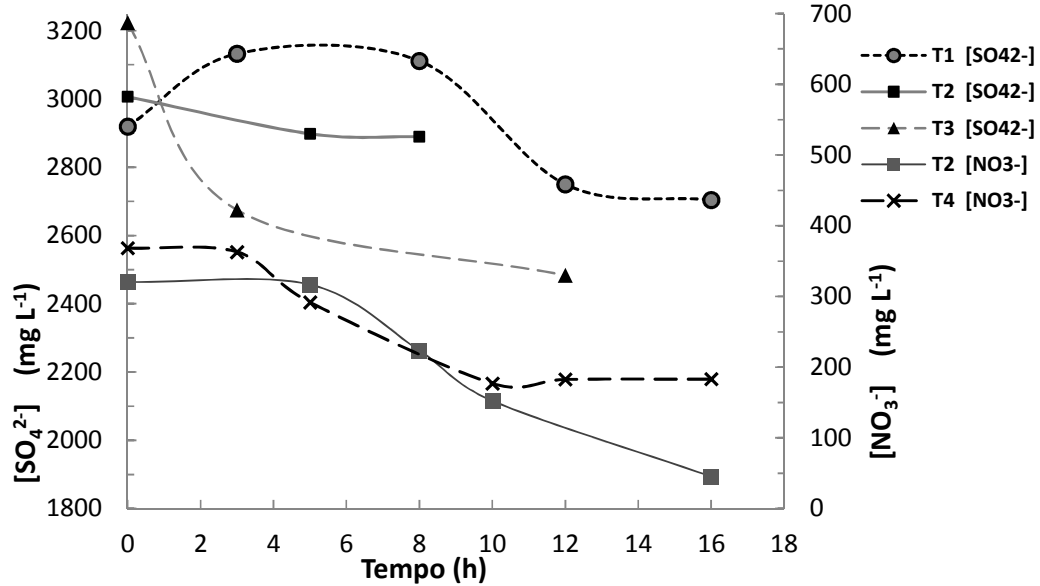
o aumento da fluidez da membrana, diminuição da motilidade celular, maior potência para exclusão de íon de sódio e aumento do metabolismo da célula (ZHOU et al., 2013).

Tabela 15- Parâmetros cinéticos para as curvas de crescimento de *D. vulgaris* em meio DSMZ-63 a 38°C com diferentes tratamentos.

Tratamento (mg L⁻¹)	Fase crescimento	Tempo geração – g
T1- [Sulfato]=3000	5 – 10h	1h
T2- [Sulfato]= 3000 + [Nitrato]= 320	5 – 10h	1h40min
T3- [Sulfato]= 3000 +[Cl ⁻]]=1000	5 – 10h	2h10min
T4- [Nitrato]=360	5 – 10h	5h15min

iii) Observa-se que no tratamento T4 meio DSMZ sem sulfato e com 5mM de nitrato, apresenta um decréscimo da população bacteriana após 10 horas de crescimento, assim como em T2, após 12h de crescimento, Figura 24. Essa diminuição da população está relacionada com o consumo de nitrato e formação de nitrito gerado pelo seu metabolismo (detectado pelo CI porém não apresentado nesse trabalho). O consumo do nitrato para esse tratamento é verificado entre 5-10h com uma taxa de $\cong 22 \text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$, Tabela 16. Essa cepa reduz o nitrato devido à presença da enzima nitrato redutase. O nitrato é um ótimo acceptor de elétrons em comparação ao sulfato, o seu alto potencial de redução (mais positivo) favorece o fornecimento energético para a célula e por isso que, mesmo em presença de sulfato, tratamento T2, há um consumo de nitrato pelas *D. vulgaris* $\cong 33 \text{mg L}^{-1}$, Figura 25 e Tabela 16. Sabe-se que o nitrito e os derivados da redução do nitrato são tóxicos para as BRS por dois fatores: inibição da enzima dissimilativa sulfito redutase – Dsr e; morte devido a presença de óxido nitroso no meio (ALASVAND et al., 2014). A população em T2 e em T4 são muito próximas, em torno de $4 \times 10^9 \text{cel/ mL}$ porém o tempo de geração são diferentes, $g=1\text{h } 40\text{min}$ em T2 e $g=5\text{h } 15\text{min}$ em T4, Tabela 15, novamente é verificado que o nitrato retarda, aumentando, o tempo de geração das bactérias. Também foi verificado que o meio contendo nitrato na ausência de sulfato (T4) possui um consumo de nitrato menor ($22 \text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) em relação a T2 ($33 \text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Figura 25– Comparação do consumo de SO_4^{2-} por *D. vulgaris* em três condições distintas: **T1** – meio DSMZ, $3000 \text{ mg.L}^{-1} [\text{SO}_4^{2-}]$; **T2** – meio DSMZ e $5\text{mM} [\text{NO}_3^-]$; **T3** – meio DSMZ com acréscimo de $5\text{mM} [\text{Cl}^-]$; **T4** meio DSMZ sem sulfato e com nitrato a $\cong 5,5\text{mM}$. Assim como, comparação do consumo NO_3^- para T2 e T4.



O consumo de sulfato e nitrato pode ser verificado com mais detalhe no APENDICE A.

A Tabela 16 foi construída a partir dos dados obtidos nas curvas de crescimento apresentados na Figura 24. Os valores de coeficiente de crescimento foram calculados pelo coeficiente angular da reta, resultante da regressão linear de “ln da população (cel ml^{-1}) de *D. vulgaris*” pelo “tempo de crescimento” para cada tratamento na fase exponencial entre 5-10h.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos comparando o crescimento de *D. vulgaris* em quatro condições distintas e os respectivos consumos de sulfato e nitrato.

Tratamento (mg L^{-1})	Coefficiente de crescimento específico - $\mu(\text{h}^{-1})$	Fase de crescimento (h)	Consumo SO_4^{2-} entre 5-10h ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Consumo NO_3^- entre 5-10 horas ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	População Inicial-final (células ml^{-1})
T1- [Sulfato]=3000	0,74	5-10	33	-----	$4,6. 10^7$ - $1,6. 10^9$
T2-[Sulfato]= 3000 + [Nitrato]= 320	0,42	5-10	2	33	$3,5. 10^8$ - $2,7 10^9$
T3 [Sulfato]= 3000 + [Cl ⁻]=1000	0,34	5-10	16	-----	$3,9. 10^8$ - $2. 10^9$
T4 [Nitrato]=360	0,13	5-10	----	22	$2. 10^9$ - $4. 10^9$

Ao avaliar o coeficiente de crescimento específico da *D. vulgaris* para os quatro tratamentos observam-se valores em ordem decrescente de T1 a T4, ver Tabela 16. Nota-se que a adição de cloreto no meio sem nitrato (meio- T3) reduz pela metade o coeficiente de crescimento, como também o consumo de sulfato, em comparação ao meio T1, Tabela 16. Tal consequência pode ser explicada pelo efeito osmótico na célula, isto é, a alta concentração de sal no meio externo desidrata mais as células influenciando no seu metabolismo.

A taxa de consumo de nitrato pela *D. vulgaris* foi menor ($22\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para o meio somente com nitrato (T4) em relação a taxa ($33\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para o meio com sulfato e nitrato (T2), isto é, apesar da bactéria consumir o sulfato (utilizando como aceptor de elétrons) a $2\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$, ela consome o nitrato (aceptor de elétrons mais energético) a uma taxa maior que se estivesse no meio com somente nitrato, ver Tabela 16. Tal resultado indica que o sulfato, quando presente nessas concentrações, influencia no consumo de nitrato.

6.3.1.2 Cinética do consumo de sulfato em amostras padronizadas com variação de biomassa inicial de *D. vulgaris*

Este foi o primeiro ensaio a fim de correlacionar a biomassa de *D. vulgaris* com o consumo de sulfato no tempo de 3h e 45 minutos. O tempo foi escolhido com base na Tabela 15 descrito no item 6.3.1.1 a partir de um valor abaixo da fase de crescimento (5-10h) e onde observa-se um consumo de sulfato significativo.

O tempo de incubação curto é importante, pois o crescimento microbiano interfere na relação densidade de biomassa versus consumo de sulfato correspondente a essa biomassa (Modelo de Monod). Portanto, observou-se que o tempo ideal está após o período de adaptação ao meio de cultura e antes do início da fase de crescimento (fase lag).

Para obter a variação inicial de biomassa foi utilizado uma cultura de *D. vulgaris* contendo $2,9 \times 10^9 \text{ cel mL}^{-1}$ (O.D. de 0,178) que foi centrifugada para ser ajustada a uma maior densidade celular e diluições para obter menor densidade celular, Tabela 17.

De acordo com os ensaios, foi determinada a concentração de sulfato antes da incubação (tempo zero) e após incubação (3,75h). Essa concentração de sulfato foi calculada por cromatografia de íons e a curva analítica dos padrões teve uma correlação de "0,99". O consumo de sulfato de cada tratamento esta resumido na Tabela 18.

Tabela 17 - Relação entre tratamento, densidade ótica e densidade bacteriana.

Tratamento	D.O560 (u.a)	Densidade bact. (cel mL ⁻¹)
10x	0,23	3,81E+09
5x	0,15	2,44E+09
2,5x	0,09	1,41E+09
1,25x	0,08	1,24E+09
0,62x	0,06	9,01E+08
0,31x	0,04	5,59E+08

Tabela 18 – Concentrações iniciais e finais para cada diluição do inóculo.

Tempo (h)	Concentração sulfato (mg. L ⁻¹) em cada diluição inóculo					
	10x	5x	2,5	1,25	0,62x	0,31X
0	1904,7	2117,2	1783,6	1766,3	1724,9	1923,7
3,75	1885,2	2033,7	1924,5	2056,2	1978,2	2076,0
Consumo de SO₄²⁻ (mg L⁻¹ h⁻¹)	5,2	22,3	-37,6	-77,3	-67,5	-40,6

A tabela 18 mostra que o consumo de sulfato só foi significativo para os tratamentos de 10x (população de 3,81E+09) e 5x (2,44E+09), tendo valores negativos para os outros tratamentos. Estes valores negativos indicam que a concentração de SO₄²⁻ após 3,75h é maior que a concentração no tempo 0h. Além de problemas técnicos de manuseio, tal fenômeno pode também estar associado a oxidação do sulfeto para sulfato (SARTI, 2007), devido ao processo de centrifugação e o baixo consumo de sulfato nesse período de avaliação (3,75h).

Por causa do descrito acima o método foi reavaliado e os experimentos posteriores foram realizados com algumas alterações: i) foi evitada a centrifugação no processo de concentração das amostras para não permitir maior oxigenação no meio; ii) foi avaliado o tempo de consumo de sulfato em um tempo maior de incubação (4h e 5h); iii) foi realizado o teste de consumo de sulfato para dois meios diferentes (Postgate-modificado e DSMZ-63); iv) foi realizado um ensaio com concentração maior de sulfato (3000 mg L⁻¹) e inoculando solução fervente através do filtro 0,22µm após autoclavação do meio de cultura afim de evitar variação da concentração do sulfato e evitar oxigenação.

6.3.1.3 Cinética do consumo de sulfato em condições padronizadas e com variação de biomassa de *D. vulgaris* em um período de 6h

Nesse ensaio foi modificado o tempo de incubação, o procedimento de preparo do inóculo (variação da população), mas, padronizou-se a concentração de sulfato para que este não seja um fator limitante no experimento.

A população de *D. vulgaris* foi quantificada por NMP e o consumo de sulfato foi avaliado entre um período de 1h e 6h após o inóculo. Nesse período de incubação de 5h a 38°C, portanto, foi medido crescimento celular e consumo de sulfato para cada cultura com diferente biomassa como inóculo inicial.

O preparo do inóculo foi modificado para diluição seriada, pois a centrifugação não correspondeu com os resultados esperados em outros experimentos. A concentração de sulfato foi padronizada a um valor de 3000 mg L⁻¹, semelhante a concentração de sulfato da água do mar que é injetada em poços de petróleo.

NMP foi realizado em todas as culturas para verificar a densidade celular dos inóculos (10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁸ cel/mL). Os valores de densidade obtidos através do processo de diluição a partir de uma cultura de 10⁹ de *D. vulgaris* foi o que mais se aproximou ao esperado (meio DSMZ-63), ver Tabela 19 e 20.

Tabela 19 – Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de *D.vulgaris*. Estabilização após 5 dias a 38°C em meio DSMZ-63 e leituras realizadas até 13 dias.

NMP- <i>Desulfovibrio vulgaris</i>										
Diluição	LEITURA DAS CULTURAS									
	T1	T1	T1	T1	T1	T6	T6	T6	T6	T6
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁸	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁸
10 ⁻¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁻²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁻³	+ - -	+++	+++	+++	+++	+ + -	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁴	NHD	+ - -	+++	+++	+++	NHD	+ - -	+++	+++	+++
10 ⁻⁵	NHD	NHD	+ - -	+++	+++	NHD	NHD	+ - -	+++	+++
10 ⁻⁶	NHD	NHD	NHD	+ + -	+++	NHD	NHD	NHD	+ + -	+++
10 ⁻⁷	NHD	NHD	NHD	NHD	+++	NHD	NHD	NHD	- - -	+++
10 ⁻⁸	NHD	NHD	NHD	NHD	+++	NHD	NHD	NHD	NHD	+++
10 ⁻⁹	NHD	NHD	NHD	NHD	+ - -	NHD	NHD	NHD	NHD	+ + -

+ Frasco positivo, - Frasco negativo, NHD Não houve diluição.

Com este experimento também foi possível verificar que neste intervalo de tempo de 6h após inoculação, não foi verificado uma variação significativa da densidade celular, ou melhor, não ocorreu crescimento significativo entre as populações 10^3 , 10^4 e 10^5 cel/mL, ver Tabela 21. A população de 10^2 cel/ mL houve pequena variação de 540 NMP cel/ mL e a população de 10^8 cel/ mL apresentou uma variação de $5,4 \cdot 10^8$ cel/mL, ver Tabela 21.

Tabela 20 – Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de *D.vulgaris*.

NMP- <i>D. vulgaris</i>		
Amostras	Combinação de tubos positivos	Valor NMP (células/ mL)
T1 10^2	3 -3 -1	$4,6 \times 10^2$
T1 10^3	3 -3 -1	$4,6 \times 10^3$
T1 10^4	3 -3 -1	$4,6 \times 10^4$
T1 10^5	3 -3 -2	$1,0 \times 10^6$
T1 10^8	3 -3 -1	$4,6 \times 10^8$
T6 10^2	3 -3 -2	$1,0 \times 10^3$
T6 10^3	3 -3 -1	$4,6 \times 10^3$
T6 10^4	3 -3 -1	$4,6 \times 10^4$
T6 10^5	3 -2 -0	$9,3 \times 10^5$
T6 10^8	3 -3 -2	$1,0 \times 10^9$

Tabela 21 – Resultado do NMP para população de *D. vulgaris* no tempo de 1h-T1 após inóculo e o tempo de 6h –T6.

Etapa	População de <i>D. vulgaris</i> por NMP cel/mL				
	Identificação				
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^8
T1	4,6E+02	4,6E+03	4,6E+04	1,0E+06	4,6E+08
T6	1,0E+03	4,6E+03	4,6E+04	1,0E+06	1,0E+09
Diferença	540	0	0	0	5,4E+08

A técnica utilizada para medir sulfeto não gerou valores confiáveis (de 0 mg L^{-1}) exceto para a cultura com população de 10^8 cel/ mL, ver Tabela 22 . Tal fato pode ser explicado, pois os valores $[S^{2-}]$ estava próximo do limite de detecção do método e não foi possível verificar variação da concentração de sulfeto. É importante salientar que o sulfeto é um composto muito volátil em pH próximo ou abaixo do neutro, condições da cultura, e muito pode ter sido perdido durante o processo de manipulação. Por isso, a determinação de sulfeto não é um

parâmetro eficiente para avaliar a cinética de BRS. Este gás possui uma solubilidade maior quando o pH do líquido é maior que o valor de 8.

Tabela 22 – Resultado da concentração de sulfeto e produção para cada população da cultura de *D. vulgaris*. Determinação de sulfeto por espectrofotometria e coeficiente de correlação de 0,98.

Leitor de ELISA - Bio-Tek EL800-					
Tempo após inóculo	Concentração de sulfeto (mg L⁻¹)				
	Culturas				
	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁸
T1	6,5	8,2	9,6	9,9	36,2
T6	6,4	6,2	7,5	9,0	120,5
Diferença 5h	-0,1	-2	-2,1	-0,9	84,3
Produção mg L⁻¹.h⁻¹	0,0	-0,4	-0,4	-0,2	16,9

A concentração de sulfato foi determinada por dois espectrofotômetros 1 e 2, respectivamente, Biospectro- sp22 e Hach- Dr2500. Ao avaliar essa concentração das culturas de *D. vulgaris* com o espectrofotômetro 1, constata-se a variação de sulfato e conseqüentemente o consumo de sulfato para todas as culturas do experimento, ver Tabela 23.

Tabela 23 – Resultado da concentração de sulfato para cada população da cultura de *D. vulgaris* no tempo 1 e 6h e o consumo por hora. Determinação de sulfato com o Espectrofotômetro 1 - Biospectro sp22.

Espectrofotômetro 1 =Biospectro sp22					
Tempo após inóculo	Concentração Sulfato (mg L⁻¹)				
	Culturas				
	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁸
T1	3782,2	3779,8	4028,2	3770,2	3380,8
T6	3729,3	3719,7	3935,3	3568,3	3068,3
diferença em 5h	52,9	60,1	92,9	201,9	312,5
Consumo mg L⁻¹.h⁻¹	10,5	12,0	18,5	40,3	62,5

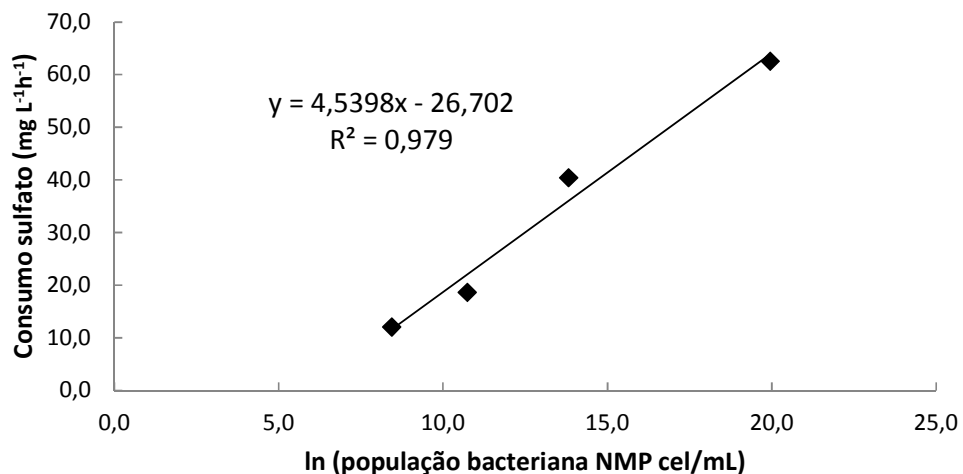
A Tabela 24 mostra os valores calculados para construir o gráfico da Figura 26, em que mostra a correlação entre densidade celular de *D. vulgaris* (expressa em valores de logaritmo neperiano) com o respectivo consumo de sulfato (mg/L) como prevê o modelo de Monod (R^2

de 0,98 e função linear $y = 4,5398x - 26,702$). Os resultados obtidos com o experimento contendo o inóculo inicial de 10^2 cel/mL não foram incluídos no gráfico. Nesse experimento a baixa concentração celular resultou em grande variação no consumo de sulfato.

Tabela 24 – Dados da população de *D. vulgaris* por NMP, ln da população e consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 1 (Biospectro sp22).

População (NMP cel/ mL)	ln população	Consumo SO_4^{2-} ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
4,60E+02	6,1	10,6
4,60E+03	8,4	12,0
4,60E+04	10,7	18,6
1,00E+06	13,8	40,4
4,6E+08	19,9	62,5

Figura 26– Correlação entre o ln da população *D. vulgaris* versus consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 1 (Biospectro sp22).



Comparando-se os mesmos resultados de consumo de sulfato para o espectrofotômetro 2, Hach Dr2500, observou-se valores diferentes dos obtidos com o espectrofotômetro 1, Tabela 23 e 25. Por outro lado, embora os valores tenham sido diferentes, a correlação medida pela função linear foi idêntica a obtida com o espectrofotômetro 1 ($y = 4,54x - 26,70$). O coeficiente de correlação, no entanto, foi mais baixo, 0,8525, ver Figuras 28 e 29, tal correlação está associada a baixa estabilização do equipamento durante as análises. Portanto o equipamento 1 - Espectrofotômetro Biospectro sp22 apresentou melhor eficiência para este trabalho.

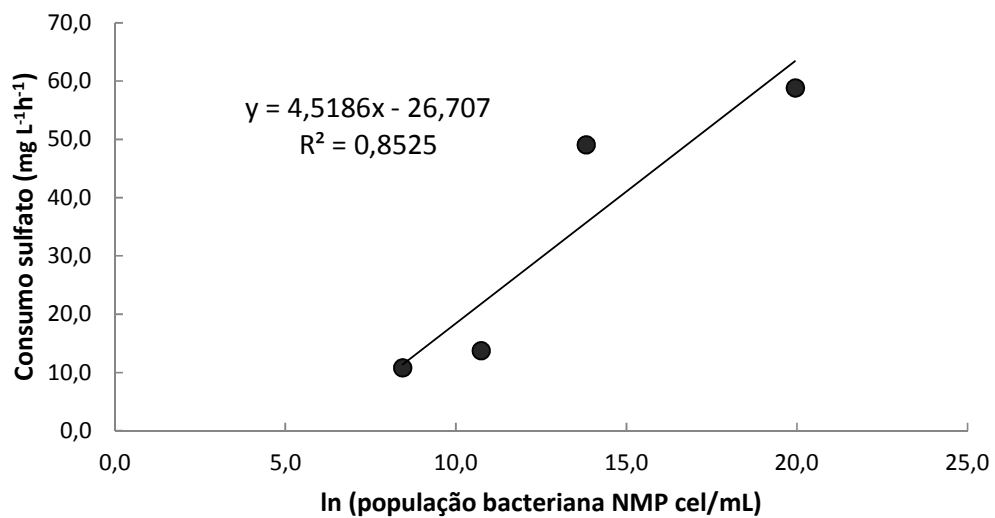
Tabela 25– Resultado da concentração de sulfato para cada população da cultura de *D. vulgaris* no tempo 1 e 6h e o consumo por hora. Determinação de sulfato com o Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.

Espectrofotômetro 2= Hach Dr2500					
Tempo após inóculo	Concentração Sulfato (ppm)				
	Amostras				
	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁸
T1	3850,5	3818,6	4079,2	3816,2	3355,4
T6	3759,8	3764,7	4010,6	3571,1	3061,3
diferença em 5h	90,7	53,9	68,6	245,1	294,1
Consumo mg L⁻¹h⁻¹	18,1	10,8	13,7	49,0	58,8

Tabela 26 – Dados da população de *D. vulgaris* por NMP, Ln da população e consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.

População (cel/ mL)	ln população	Consumo no Espectrofotômetro 2 (mg L⁻¹ h⁻¹)
4,60E+02	6,1	18,1
4,60E+03	8,4	10,8
4,60E+04	10,7	13,7
1,00E+06	13,8	49,0
4,6E+08	19,9	58,8

Figura 27– Correlação entre o ln da população *D. vulgaris* versus consumo de sulfato utilizando o Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.



Esse experimento demonstra que, em condições padronizadas de sulfato e fonte de carbono, é possível quantificar a densidade celular de *D. vulgaris* apenas através da medida do consumo de sulfato. Tal método de quantificação pode ser realizado utilizando um espectrofotômetro para as determinações de sulfato, assim como, utilizando um cromatógrafo de íons. O período necessário para realizar toda a análise, incluindo o cultivo, é de aproximadamente 12h. Portanto, este método é o mais rápido já descrito na literatura para quantificação de *D. vulgaris*. Esse método funciona em uma faixa populacional entre 10^3 a 10^8 cel/mL.

6.3.2 Consórcio de amostra ambiental

6.3.2.1 Cinética do consumo de sulfato por BRS em amostra de água produzida da indústria de petróleo

O experimento do item 6.3.3 foi repetido alterando o inóculo, ou seja, esse experimento visou avaliar o consumo de sulfato de uma microbiota de BRS presente em água produzida coletada. O volume do inóculo foi variado a fim de verificar qual o volume é melhor para ser trabalhado como método de quantificação de BRS em amostras de água produzida. Foi adicionado o ensaio com o outro meio de cultura (Postgate-modificado) para comparar o melhor desempenho de consumo das BRS dessa água nos dois meios de cultura.

Adotou-se um tempo de uma hora de repouso após a inoculação para que as bactérias presentes no inóculo pudessem se readaptar ao meio de cultura onde foram inoculadas.

A população de micro-organismos presente nos meios (DSMZ-63 e Postgate-modificado) após o inóculo de água produzida contados por MELA foi de aproximadamente 10^4 cel/mL. Considerando as frações de inóculos como 50%, 30% e 20% estima-se que para a população de 100% (água produzida coletada), a população é entre $1,5 \cdot 10^4$, porém, é possível que nem todas as células sejam viáveis, ver Tabela 27 e 28.

A população viável das BRS e a total bacteriana na água produzida foram calculadas através das técnicas de NMP e MELA, respectivamente. Sabendo-se que com 50% de inóculo (água produzida) resultou em 4 células NMP/mL para os dois meios de cultura estudados, então a população de BRS na água produzida era em torno de 8 células NMP/mL,

ver Tabela 27 e 28. Essa população de células viáveis registrada no experimento é menor que a contagem por MELA e tal resultado sugere que durante as condições de armazenamento e manipulação foi perdida uma grande parte desta população. Acredita-se que a população resultante possa vir a ser as células mais resistentes à oxigenação do meio e a condições nutricionais limitantes, características da água produzida.

Tabela 27 – Comparação das duas contagens (direta e NMP) da população de micro-organismos presente no meio de cultura DSMZ-63 no tempo 1h (T1) e tempo após 3h de incubação a 38°C (T4) e com volumes variados (20, 30 e 50% v/v) de inóculo (água produzida).

Meio de cultura Desulfobivrio DSMZ-63						
Técnica	T4 20%	T4 30%	T4 50%	T1 20%	T1 30%	T1 50%
Contagem direta	3,2 x10 ⁴	3,2 x10 ⁴	2,1 x10 ⁴	2,6 x10 ³	8 x10 ³	1,6 x10 ⁴
Contagem NMP/mL	-	-	9	-	-	4

Tabela 28 – Comparação das duas contagens (direta e NMP) da população de micro-organismos presente no meio de cultura Postgate-modificado no tempo 1h (T1) e tempo após 3h de incubação a 38°C (T4) e com volumes variados (20, 30 e 50% v/v) de inóculo (água produzida).

Meio de cultura Postgate-modificado						
Técnica	T4 20%	T4 30%	T4 50%	T1 20%	T1 30%	T1 50%
Contagem direta (cel/mL)	1,6 x10 ⁴	3,5 x10 ⁴	2,9 x10 ⁴	1,6 x10 ⁴	1,3x10 ⁴	1,0 x10 ⁴
Contagem NMP/mL	-	4	-	4	-	4

Para a avaliação da cinética de consumo de sulfato foi quantificado a concentração de sulfato no tempo de 1h após o inóculo e no tempo de 4h, ou seja, alíquotas retiradas após o inóculo e incubada por 3h. A Tabela 29 resume esses valores para o meio DSMZ. Podemos observar que para o inóculo de 20% não houve consumo de sulfato. Diferentemente, acontece na cultura com 50% de inóculo, em que apresentou maior consumo de sulfato. Logo para

avaliar o consumo de sulfato de amostras de água produzida, é melhor utilizar um inóculo maior ou igual a 50%. O consumo de sulfato para o inóculo 30% foi muito semelhante ao consumo do inóculo 50%, apesar de apresentarem população total semelhante (10^4 cel/mL), o consumo com inóculo a 30% obteve um desvio maior no tempo inicial 1h (T1).

Tabela 29 – Concentração de sulfato e cinética de consumo da cultura de água produzida em meio DSMZ-63 e com variação de inóculo (água produzida).

Concentração sulfato real (mg L⁻¹) –DSMZ-63						
Tempo	Inóculo 20%		Inóculo 30%		Inóculo 50%	
	média	desvio %	média	desvio %	Média	desvio %
T1	2001,47	5,6	1703,97	8,4	1470,67	5,9
T4	2134,91	6,3	1601,83	1,5	1360,72	3,3
Consumo (mg L⁻¹ h⁻¹)	-44,5		34,0		36,7	

Quando se avalia a cinética de consumo de sulfato para o meio Postgate-modificado, constata-se que o consumo é muito baixo em comparação ao meio DSMZ-63, como também a concentração de sulfato neste meio é mais baixa (aproximadamente metade), ver Tabela 30. Esse baixo consumo está associado a pequena população ativa de BRS a qual não chega a 10^1 cel NMP/mL. Esse resultado foi importante para padronizar, nos próximos ensaios, a concentração de sulfato no meio para 3000 mg L^{-1} . Essa padronização com uma concentração muito maior é importante para que este aceptor de elétrons não seja limitante no metabolismo de consumo pelas BRS. O valor de 3000 mg L^{-1} corresponde a concentração aproximada dos teores de sulfato dos oceanos, a qual, geralmente, utiliza-se esta água como fluido de injeção nos poços de petróleo.

Tabela 30 – Concentração de sulfato e cinética de consumo da cultura de água produzida em meio POSTGATE-MODIFICADO e com variação de inóculo (água produzida).

Concentração sulfato real (mg L⁻¹)- Postgate-MODIFICADO						
Tempo	Inóculo 20%		Inóculo 30%		Inóculo 50%	
	média	desvio %	média	desvio %	Média	desvio %
T1	1085,37	3,8	890,03	2,9	680,35	2,6
T4	1077,94	3,1	926,51	1,6	762,01	2,7
Consumo (mg L⁻¹ h⁻¹)	2,5		-12,2		-27,2	

6.3.2.2 *Cinética do consumo de sulfato por diferentes densidades de BRS crescidas em consórcios obtidos de amostras ambientais*

Este ensaio foi programado para testar se a taxa de consumo de sulfato também se correlaciona com a densidade celular de um consórcio de BRS obtido de amostras ambientais. Para os testes, foram utilizados dois consórcios diferentes, um obtido em coleta do Rio Camarajipe - Costa Azul (CA) e outro com células isoladas de água de produção da indústria de petróleo. Para esse último foram utilizadas duas técnicas de padronização da densidade celular do inóculo identificada como: (i) Água produzida-AP e; (ii) APC concentrada através do processo de centrifugação.

O resultado do NMP para as três culturas após o tempo de estabilização (1h) aparece resumido nas Tabelas 31, 32 e 33, tendo uma população aproximadamente 10⁴ cel/ mL para a cultura com 50% de inóculo água Costa Azul- CA e 10¹ cel/ mL para as culturas com 50% de inóculo de água produzida-AP e água produzida concentrada- APC. Para uma melhor avaliação segue na Tabela 34 um resumo das populações das três culturas. Foi possível observar que o procedimento de centrifugação não foi suficiente para concentrar 20x as BRS, ou melhor, este processo reduziu a população de BRS, Tabela 34.

Tabela 31 – Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para a população inicial de BRS após uma hora da inoculação (T1) presente na água Costa Azul.

NMP - EM Postgate_MODIFICADO			
Diluições	COSTA AZUL (CA) –T1	Combinação de tubos positivos	Valor NMP
10 ⁻¹	+++		
10 ⁻²	+++		
10 ⁻³	+++		
10 ⁻⁴	+++	3- 3- 1	4,6 x 10 ⁴ células / mL
10 ⁻⁵	+- -		
10 ⁻⁶	---		
10 ⁻⁷	---		
10 ⁻⁸	---		

Tabela 32 – Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para a população inicial de BRS após uma hora da inoculação (T1) presente na água produzida.

NMP - EM Postgate_MODIFICADO			
Diluições	ÁGUA PRODUZIDA (AP) –T1	Combinação de tubos positivos	Valor NMP
10 ⁻¹	+++		
10 ⁻²	+- -		
10 ⁻³	+- -		
10 ⁻⁴	---	3- 1- 1	7,5 x10 ¹ células/ mL
10 ⁻⁵	---		
10 ⁻⁶	---		
10 ⁻⁷	---		
10 ⁻⁸	---		

+ Frasco positivo, - Frasco negativo.

Tabela 33 – Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para a população inicial de BRS após uma hora da inoculação (T1) presente na água produzida concentrada.

NMP - EM Postgate_MODIFICADO			
Diluições	ÁGUA PRODUZIDA CONCENTRADA (APC) –T1	Combinação de tubos positivos	Valor NMP
10 ⁻¹	++ -		
10 ⁻²	+- -		
10 ⁻³	---		
10 ⁻⁴	+- -	1- 0- 1	7 x 10 ¹ células/ mL
10 ⁻⁵	---		
10 ⁻⁶	---		
10 ⁻⁷	---		
10 ⁻⁸	---		

+ Frasco positivo, - Frasco negativo.

Tabela 34– Resumo do resultado do NMP para a população inicial de BRS das três culturas após uma hora da inoculação (T1).

RESUMO CONTAGEM - NMP	
ENSAIO	Valor NMP (células/ mL)
Costa Azul (CA)	$4,6 \times 10^4$
Água produzida (AP)	$7,5 \times 10^1$
Água produzida concentrada (APC)	7×10^1

As análises de concentração de sulfato mostram que houve um pequeno desvio ($\cong 3\%$) entre as réplicas das culturas de AP e APC, porém, quando se comparam as réplicas da cultura CA observa-se uma variação maior que 50% em algumas condições, ver Tabela 35. Este valor crescente de concentração está relacionado a uma falha na sequência de inoculação, pois foi obedecida a sequência de injeção do inóculo de R1 a R3.

Tabela 35 – Resultado da concentração de sulfato para as culturas no tempo de 1 hora- T1 e no tempo de 6 horas –T6. Determinação de sulfato com Espectrofotômetro 1 - Biospectro sp22.

Amostra	Concentração de sulfato (mg L⁻¹)					
	Réplicas			média	desvio	desvio %
	R1	R2	R3			
CA T1	1606	2714	4670	2997	1551,3	51,8
CA T6	1690	3141	4812	3214	1562,6	48,6
APC T1	3753	3856	3915	3842	81,9	2,1
AP T1	3665	3793	3812	3757	79,8	2,1
APC T6	4028	3842	4043	3971	112,0	2,8
AP T6	3636	3837	3891	3788	134,3	3,5

Nesse experimento também foi observado uma concentração de sulfato maior após o tempo de incubação (T6) para a maioria das réplicas das culturas e conseqüentemente o consumo foi negativo, Tabela 36. Tal fenômeno pode ser justificado pela oxigenação do meio de cultura que favorece a oxidação do sulfeto. Essa oxigenação do meio de cultura impede a repetibilidade dos ensaios por dois motivos: i) o oxigênio afeta diretamente o metabolismo das BRS diminuindo a taxa de redução de sulfato; ii) o oxigênio dissolvido, mesmo em pequenas concentrações ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), pode proporcionar a oxidação de sulfeto a sulfato (POL et al., 1998) e por isso, às vezes, a concentração de sulfato é maior após o tempo de incubação. Para solucionar esta oxigenação foi adicionado 1 mmol/L de Na_2S à solução de sulfato e conseqüentemente ao meio de cultura (BARTON, 1995).

Tabela 36 – Resumo dos resultados da concentração de sulfato das culturas em cada tempo, assim como, a diferença e o consumo após 5h de incubação.

Tempo após inoculação	Concentração de Sulfato (mg L ⁻¹)								
	Costa Azul - CA			Água produzida - AP			Água produzida concentrada- APC		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1 h	1606	2714	4670	3665	3793	3812	3753	3856	3915
6 h	1690	3141	4812	3636	3837	3891	4028	3842	4043
Diferença em 5h	-83	-427	-142	29	-44	-78	-275	15	-128
Consumo (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	-17	-85	-28	6	-9	-16	-55	3	-26

6.3.2.3 Comparação da cinética de crescimento entre o consórcio oriundo da água produzida e a coletada no Rio Camarajipe

A cinética de crescimento da microbiota (BRS) da água produzida e da água Costa Azul foi realizada com o intuito de conhecer o seu perfil de crescimento.

O NMP referente aos pontos (T0, T5, T8 e T15) da curva de crescimento da microbiota da água Costa Azul estabilizou com 9 dias de incubação no meio postgate-modificado a 38°C e as leituras foram realizadas até 16 dias de incubação. A Tabela 37 representa os valores de frascos positivos das triplicatas do NMP de cada tempo de incubação.

Tabela 37 – Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada tempo de incubação da microbiota (BRS) presente na água Costa Azul.

COSTA AZUL (NMP)- MEIO POSTGATE-MODIFICADO				
Diluições	LEITURA DAS TRIPLICATAS			
	T0	T5	T8	T15
10 ⁻¹	+++	+++	+++	+++
10 ⁻²	+++	+++	+++	+++
10 ⁻³	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁴	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁵	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁶	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁷	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁸	---	+++	+++	+++
10 ⁻⁹	---	---	-+-	---
10 ⁻¹⁰	---	---	---	---
10 ⁻¹¹	NHD	---	---	---
10 ⁻¹²	NHD	---	---	---

+ Frasco positivo, - Frasco negativo, NHD Não houve diluição

Ao avaliar o resultado da leitura do NMP para a água Costa Azul verifica-se que existe uma boa homogeneidade da diluição das réplicas com ausência de flutuações. Após procedimento de contagem verificou-se que a fase exponencial ocorre entre 0-5h. A fase estacionária ocorre em 8h de incubação e após 15h de incubação já era notado a fase de morte celular, ver Tabela 38 e Figura 28. O tempo de geração desta microbiota foi de $g=1h\ 30min$ e um coeficiente de crescimento específico de $\mu=0,46\ h^{-1}$, Tabela 39. Tais características se assemelham muito ao comportamento da *D. vulgaris* quando submetida ao tratamento T2 (Sulfato a $3000mg\ L^{-1}$, nitrato a $320mg\ L^{-1}$), ver Figura 24, Tabela 15 e Tabela 16 do item 6.3.1.1.

Tabela 38 - Resultados da contagem por NMP das populações da microbiota da água Costa Azul em diferentes tempos de incubação (T0, T5, T8 e T15).

NMP - EM MEIO POSGATE-MODIFICADO		
Identificação	Combinação de tubos positivos	Valor NMP (células/ mL)
T0	3 -3 -0	$2,4 \times 10^7$
T5	3 -3 -0	$2,4 \times 10^8$
T8	3 -3 -1	$4,6 \times 10^8$
T15	3 -3 -0	$2,4 \times 10^8$

Figura 28– Curva de crescimento da microbiota (BRS) da água Costa Azul em Postgate-modificado.

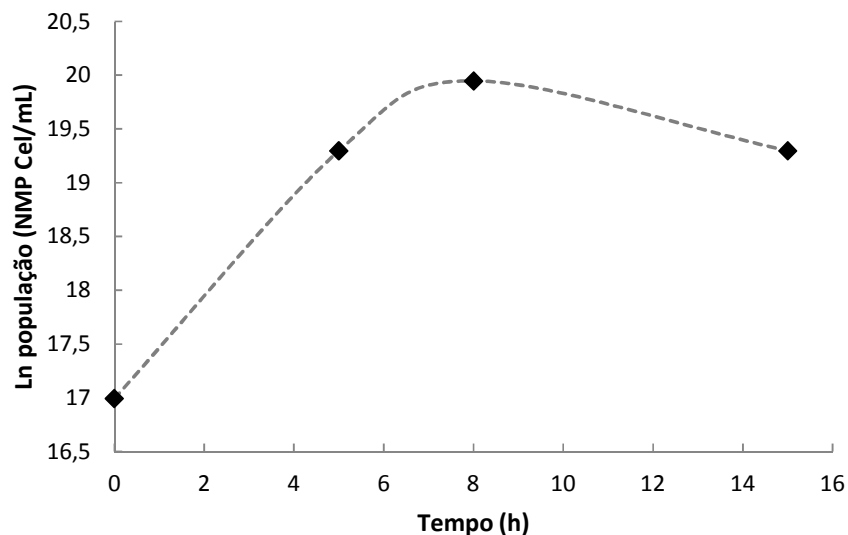


Tabela 39 - Parâmetros cinéticos para a curva de crescimento de BRS da água Costa Azul em meio Postgate-modificado.

Fase crescimento	Tempo geração- g	Coefficiente de crescimento específico- μ (h^{-1})
0 -5 h	1h 30min	0,46

Ao avaliar o resultado da leitura de NMP para as amostras contendo água produzida como inóculo verifica-se uma população inicial de BRS (T0), população ausente em (T5) e uma flutuação (T15) Tabela 40, resultado muito diferente ao apresentado com as amostras contendo água Costa Azul, Tabela 37, pois se esperava um aumento populacional de BRS à medida que aumentasse o tempo de incubação para essas amostras contendo AP. Este baixo crescimento e a não coerência de aumento populacional está relacionado ao perfil da microbiota (BRS) presente na água produzida a qual é mais sensível à oxigenação e, também, está mais adaptada a um meio contendo frações de hidrocarbonetos. O frasco que recebeu o inóculo e foi incubado por 5h (T5) não apresentou crescimento e por isso não foi considerado no ponto da curva de crescimento, a Tabela 41 resume a população em cada ponto da curva e a Figura 29 demonstra a curva de crescimento desconsiderando o ponto T5.

Tabela 40– Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada tempo de incubação da microbiota (BRS) presente na água produzida.

AGUA PRODUZIDA- (NMP)- EM MEIO POSTGATE-MODIFICADO					
Diluições	LEITURA DAS AMOSTRAS				
	T0	T5	T8	T15	T21
10 ⁻¹	++-	---	++-	+++	+++
10 ⁻²	++-	---	---	---	++-
10 ⁻³	---	---	---	+--	+--
10 ⁻⁴	---	---	---	+--	---
10 ⁻⁵	---	---	---	---	---
10 ⁻⁶	---	---	---	---	---
10 ⁻⁷	---	---	---	---	---
10 ⁻⁸	---	---	---	---	---
10 ⁻⁹	---	---	---	---	---
10 ⁻¹⁰	---	---	---	---	---
10 ⁻¹¹	NHD	---	---	---	---
10 ⁻¹²	NHD	---	---	---	---

A curva de crescimento para a cultura água produzida, Figura 29, apresentou fase de crescimento exponencial entre T8 e T15 com um coeficiente de crescimento específico de

$\mu=0,62 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração $g= 1\text{h } 10\text{min}$, Tabela 42. Portanto é possível afirmar que as BRS da água produzida apresentaram uma taxa de crescimento maior que o consórcio de BRS do Rio Camarajipe, água Costa Azul, porém a população de BRS desta é muito superior que a da água produzida.

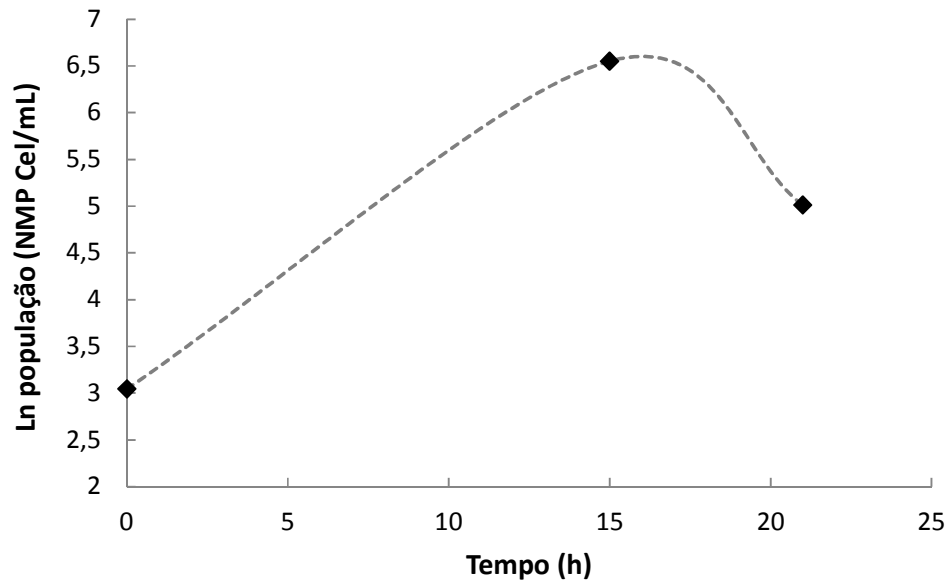
Tabela 41 - Resultados da contagem por NMP das populações da microbiota da água produzida em diferentes tempos de incubação (T0, T5, T8 e T15).

NMP - EM MEIO POSGATE		
Amostras	LEITURA- APÓS 15 DIAS	
	Combinação de tubos positivos	Valor NMP (células/ mL)
T0	2 -2 -0	21
T5	0 -0 -0	-
T8	2-0 -0	9
T15	1 -1 -0	7×10^2
T21	2- 1- 0	$1,5 \times 10^2$

Tabela 42 - Parâmetros cinéticos para a curva de crescimento de BRS da água produzida em meio Postgate-modificado.

Fase crescimento	Tempo geração- g	Coefficiente de crescimento específico- $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$
0 -15 h	1h 10min	0,62

Figura 29 – Curva de crescimento da microbiota (BRS) da água produzida em Postgate-modificado.



6.3.2.4 Cinética do consumo de sulfato com variação de biomassa microbiana de uma amostra do rio Camarajipe

Este ensaio teve por meta correlacionar diferentes densidades populacionais de BRS obtidas a partir de amostras ambientais (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 cel/mL) com o consumo de sulfato. Foram obtidos consórcios de BRS a partir da água produzida como também da água do Rio Camarajipe- Costa Azul, Salvador.

Os resultados do NMP de BRS presentes no experimento 1h (T1) e após 5h de incubação (T6) aparece resumido na Tabela 43.

Tabela 43 – Resultado da leitura do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de BRS da água Costa Azul. Estabilização após 13 dias a 38°C em meio Postgate modificado e leituras realizadas até 33 dias.

NMP-BRS COSTA AZUL										
Diluição	LEITURA DAS CULTURAS									
	T1 4D	T1 3D	T1 2D	T1 1D	T1 FM	T6 4D	T6 3D	T6 2D	T6 1D	T6 FM
10^{-1}	+++	++-	++-	++-	+++	---	++-	++-	+++	+++
10^{-2}	++-	+-	+-	++-	+++	---	---	++-	+++	+++
10^{-3}	---	++-	++-	++-	+++	---	---	+-	+++	+++
10^{-4}	---	---	---	++-	+++	---	---	---	---	+++
10^{-5}	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+++
10^{-6}	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+-
10^{-7}	NHD	---	---	---	---	NHD	---	---	---	---
10^{-8}	NHD	NHD	---	---	---	NHD	NHD	---	---	---
10^{-9}	NHD	NHD	NHD	---	---	NHD	NHD	NHD	---	---
10^{-10}	NHD	NHD	NHD	NHD	---	NHD	NHD	NHD	NHD	---

Após o cálculo da leitura do NMP é possível verificar que existe uma redução da população de BRS entre o tempo de 1h e 6h para os dois consórcios com menor densidade celular (4D e 3D), Tabela 44. No entanto, os consórcios restantes mantiveram-se praticamente com densidades constantes, portanto a Tabela 45 resume as populações consideradas.

Tabela 44 – Resultado do NMP com diluição seriada de 10x em triplicata para cada população estimada de BRS da água Costa Azul em postgate-modificado a 38°C.

NMP- BRS COSTA AZUL		
Amostras	Combinação de tubos positivos	Valor NMP (células/ mL)
T1 4D	3 -2 -0	$9,3 \times 10^1$
T1 3D	1 -2 -0	$1,1 \times 10^2$
T 2D	1 -2 -0	$1,1 \times 10^2$
T1 1D	2 -2 -0	$2,1 \times 10^3$
T1 FM	3 -3 -4	$2,4 \times 10^5$
T6 4D	0 -0 -0	-
T6 3D	2 -0 -0	9
T6 2D	2 -1 -0	$1,5 \times 10^2$
T6 1D	3 -3 -0	$2,4 \times 10^3$
T6 FM	3 -1 -0	$4,3 \times 10^5$

Tabela 45 – Resultado do NMP para os dois tempos 1h-T1 e 6h-T6 da população de BRS da água Costa Azul e população considerada para o consumo de sulfato.

Etapa	População BRS- NMP cel/mL				
	Identificação				
	4D	3D	2D	1D	FM
T1	$9,3 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$
T6	-	9	$1,5 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$4,3 \times 10^5$
População considerada	-	-	10^2	10^3	10^5

As análises de concentração de sulfato no tempo de 1h e 6h são resumidas na Tabela 46 e a avaliação do consumo de sulfato foi calculada a partir da diferença entre as concentrações de T1 e T6 em um período de 5h, logo o consumo é dado por hora, Tabela 47. Em algumas amostras foi observado um aumento na concentração de sulfato entre o T1 e T6 (FM e 2D). Acredita-se que esse resultado esteja associado à oxidação do sulfeto para o sulfato, já que durante a inoculação houve entrada de ar no meio de cultura apresentando mudança de coloração de transparente para levemente avermelhada (presença de oxigênio indicado pela resazurina).

Tabela 46– Resultado da concentração de sulfato para as culturas Costa azul no tempo de 1 hora- T1 e no tempo de 6 horas –T6. Determinação de sulfato por cromatografia íons.

Identificação Culturas	Concentração sulfato (mg L ⁻¹)							
	T1				T6			
	R1	R2	R3	média T1	R1	R2	R3	média T6
FM	3060	2571	2890	2840	2823	2912	3082	2939
1D	3119	2909	2307	2778	3099	2019	2405	2508
2D	2736	2159	2946	2614	2710	2799	2892	2800
3D	3088	2791	2916	2932	2401	3285	1740	2475
4D	-	2972	3071	3022	-	2810	2682	2746

Tabela 47 – Resultado da concentração de sulfato para cada população (FM, 1D, 2D, 3De 4D) da cultura BRS Costa Azul no tempo 1 e 6h e o consumo por hora. Determinação de sulfato por cromatografia íons.

Tempo após inóculo	Concentração Sulfato (mg L ⁻¹)				
	FM	1D	2D	3D	4D
T1	2840	2778	2614	2932	3022
T6	2939	2508	2800	2475	2746
Diferença em 5h	-99	271	-187	457	276
Consumo (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	-19,8	54,1	-37,4	91,3	55,2

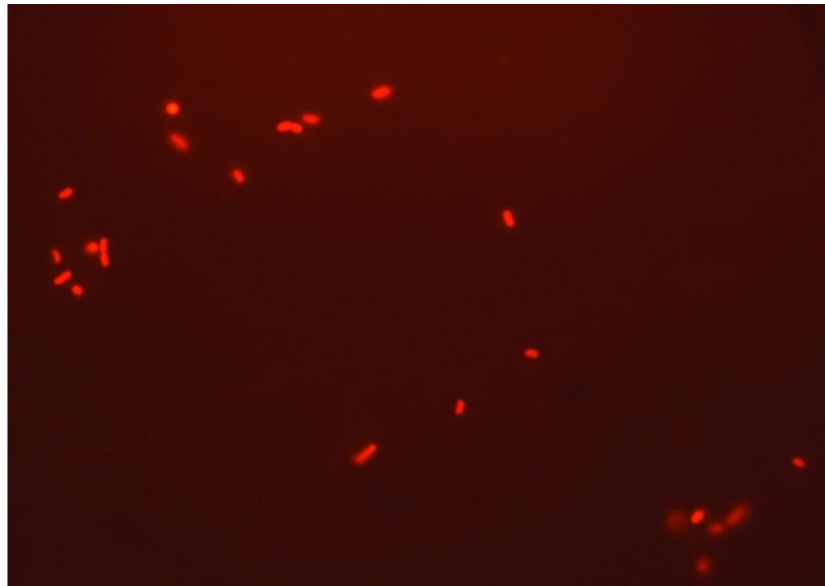
As culturas 3D e 4D apresentaram um consumo de sulfato, Tabela 47, mas não foi possível considera-las pois a população de BRS tinha sido reduzida, Tabela 45, portanto só foi estabelecido correlação de consumo sulfato por hora para a cultura da primeira diluição- 1D com 54,1 mg L⁻¹ h⁻¹ para uma população de 10³NMP cel/ mL conforme as condições mencionadas no item 5.3.2.4. Comparando este mesmo consumo, caso fosse uma população de *D. vulgaris*, isto é, ao substituir o valor “54,1” na equação “y=4,54x – 26,70” descrita no item 6.3.1.3, obtem-se o valor de x =17,79, sabendo que 17,79= ln (população), então a população de *D. vulgaris* correspondente a este consumo nesta cultura é 5,3 x 10⁷ NMP cel/mL. Logo, uma população de BRS de 10³ NMP cel/mL da água do Rio Camarajipe - Costa Azul corresponde a uma população de 10⁷ NMP cel/mL de *D. vulgaris* em relação ao consumo de sulfato, isto é, a população de BRS da água do Costa Azul é muito mais metabolicamente ativa para a redução de sulfato (produz mais sulfeto) que a *D. Vulgaris*. Esse consumo pode ser comparado melhor da seguinte forma: compara-se o consumo de sulfato

para a mesma população de BRS desta água (10^3 NMP cel/mL) e da cepa, o consumo da cepa é de $4,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para uma população de 10^3 NMP cel/mL. Deste modo sugere-se que a microbiota de BRS presente na água Costa azul é aproximadamente 12x mais eficiente na redução de sulfato em relação à cepa *D. vulgaris*.

6.3.3 Contagem direta

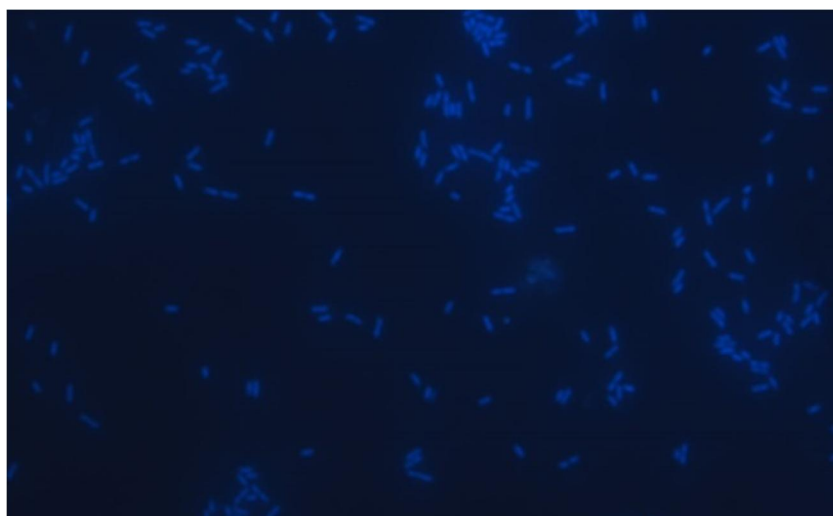
A contagem direta de epifluorescência é o melhor método disponível para a enumeração de bactérias totais em amostras ambientais. Os fluorocromos mais utilizados são: i) laranja acridina (3,6-dimetilaminoacridina) e; ii) DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol). A “i)” liga-se a DNA e a RNA, quando ligadas a fita simples de ácidos nucleicos, emite cor laranja-vermelho, porém quando liga-se a fita dupla de ácidos nucleicos apresenta coloração verde. O “ii)” se intercala na fita dupla de DNA e emite coloração azul (KEPNER e PRATT, 1994). A Figura 30 mostra uma cultura de *Desulfovibrio vulgaris* coradas com Laranja acridina.

Figura 30 – Microscopia de epifluorescência com laranja de acridina (MELA) de uma cultura *Desulfovibrio vulgaris*, aumento 1000x, em meio Desulfovibrio (DSMZ-63) ausente de ferro.



A Figura 31 mostra a microscopia de epifluorescência com corante DAPI de uma cultura *Desulfovibrio vulgaris* ausente de ferro.

Figura 31 – Microscopia de epifluorescência com DAPI (MEDAPI) de uma cultura *Desulfovibrio vulgaris*, aumento 1000X, em meio Desulfovibrio(DSMZ-63) ausente de ferro.



6.3.4 NMP

Os NMP das BRS apresentava tempo de estabilização de crescimento diferente para cada meio de cultura empregado, como também para determinada microbiota, a Tabela 48 resume o resultado.

Tabela 48-Tempo de estabilização de crescimento de BRS do número mais provável –NMP a 38°C para inóculos e meio de cultura diferentes.

Inóculo utilizado	Tempo médio de estabilização do NMP	
	Meio de cultura Postgate-modificado	Meio de cultura DSMZ.63
<i>D. vulgaris</i>	---	5 dias
Água Costa Azul	14 dias	15 dias
Água Produzida	33 dias	36 dias

Foi verificado que a cepa *D. vulgaris* apresentava uma estabilização de crescimento após cinco dias de incubação a 38°C, porém a microbiota oriunda da água produzida e do Rio Camarajipe - Costa Azul delongaram mais tempo para estabilizar o crescimento nessa mesma temperatura de incubação.

Para as microbiotas (AP e CA) pode-se prever que exista outra espécie com um metabolismo mais lento que a *D. vulgaris*, pois o crescimento foi mais lento, resultando em

um tempo maior de estabilização no NMP. Diante dos resultados, foi possível observar que a microbiota presente na água de efluente sanitário Costa Azul apresentou um tempo menor de estabilização de crescimento no NMP, praticamente a metade do tempo da água produzida, tal fenômeno pode ser justificado pela microbiota presente na água produzida com um metabolismo muito mais lento para redução de sulfato em comparação ao metabolismo da *D. vulgaris* e da microbiota do Rio Camarajipe, água Costa Azul.

6.3.5 Determinação de sulfeto por azul de metileno

Na determinação de sulfeto foi construída uma curva de calibração analítica entre 1 – 200mg L⁻¹. Porém entre as concentrações de 1 – 10 mg L⁻¹ houve um desvio acima de 10% entre as réplicas, ver Tabela 49. Ao plotar os valores de concentrações dos padrões de sulfeto contra o valor de absorbância e ao fazer a regressão linear dos pontos, foi obtido uma função linear $y = 0,0124x - 0,0784$ com $R^2 = 0,955$, sendo y = absorbância e x = concentração de sulfeto em mg L⁻¹, ver Figura 32. Para concentrações entre 1-50mg L⁻¹ houve uma melhor correlação $R^2=0,99$ e conseqüentemente uma melhor linearidade do método, Figura 33.

Tabela 49 – Valores de absorbância em triplicata para cada concentração de sulfeto padrão (1-200 mg L⁻¹) utilizando Leitor de ELISA - Bio-Tek EL800 .

[S ²⁻] (mg L ⁻¹)	r1	r2	r3	média (A)	Desvio %
1	0,001	-0,003	0,001	0,000	692,8
5	0,009	0,007	0,001	0,006	73,5
10	0,062	0,076	0,071	0,070	10,2
20	0,134	0,143	0,14	0,139	3,3
30	0,198	0,202	0,208	0,203	2,5
50	0,352	0,359	0,36	0,357	1,2
70	0,874	0,901	0,878	0,884	1,6
85	0,752	0,75	0,755	0,752	0,3
100	1,069	1,09	1,073	1,077	1,0
115	1,632	1,641	1,64	1,638	0,3
130	1,683	1,665	1,673	1,674	0,5
150	2,115	2,108	2,102	2,108	0,3
170	1,855	1,928	1,888	1,890	1,9
200	2,144	2,144	2,206	2,165	1,7

Figura 32 – Valores da absorbância para cada concentração de sulfeto padrão (1-200 mg L⁻¹) utilizando Leitor de ELISA Bio-Tek EL800.

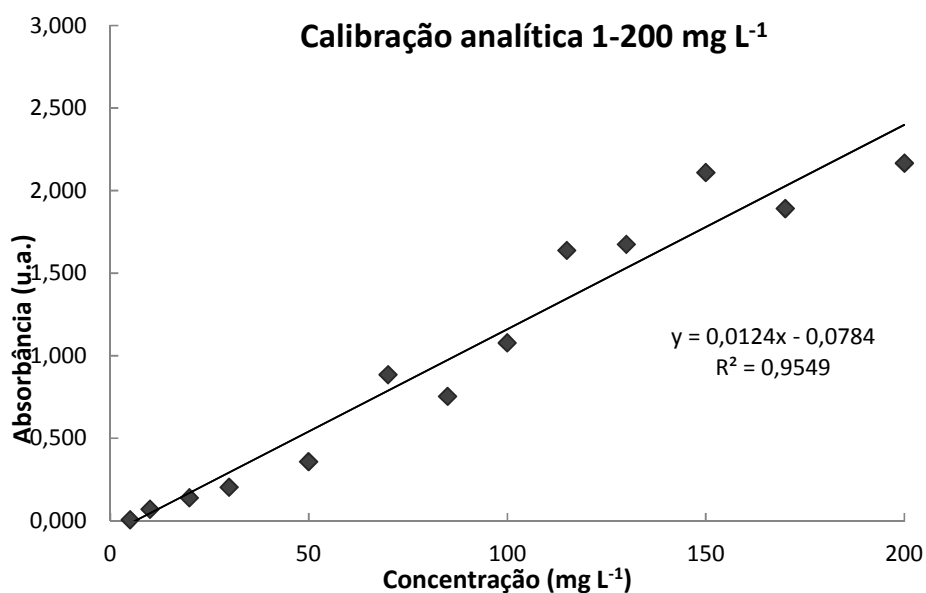
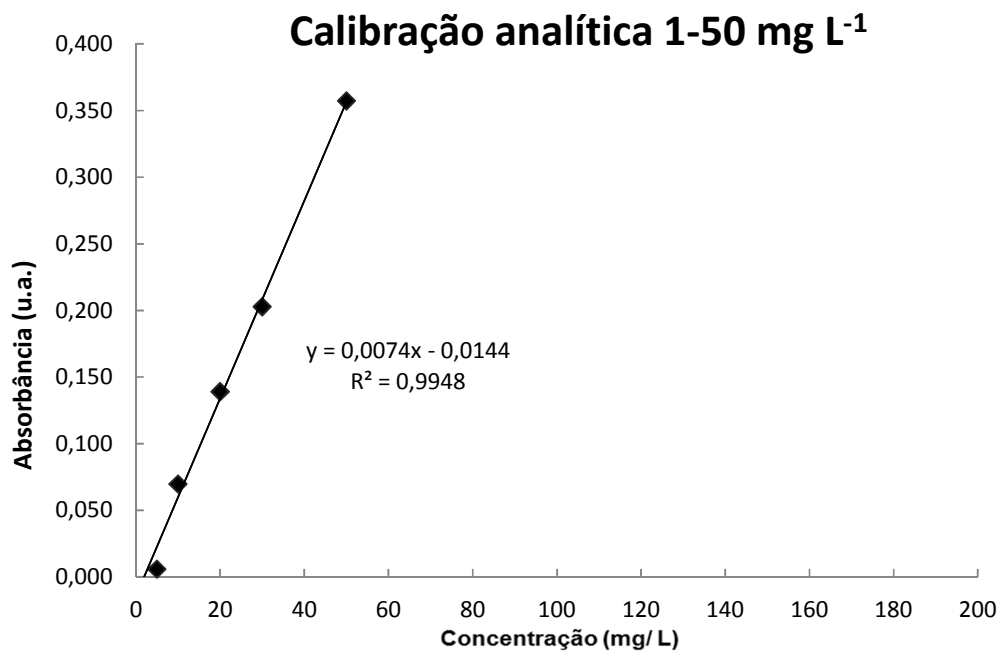


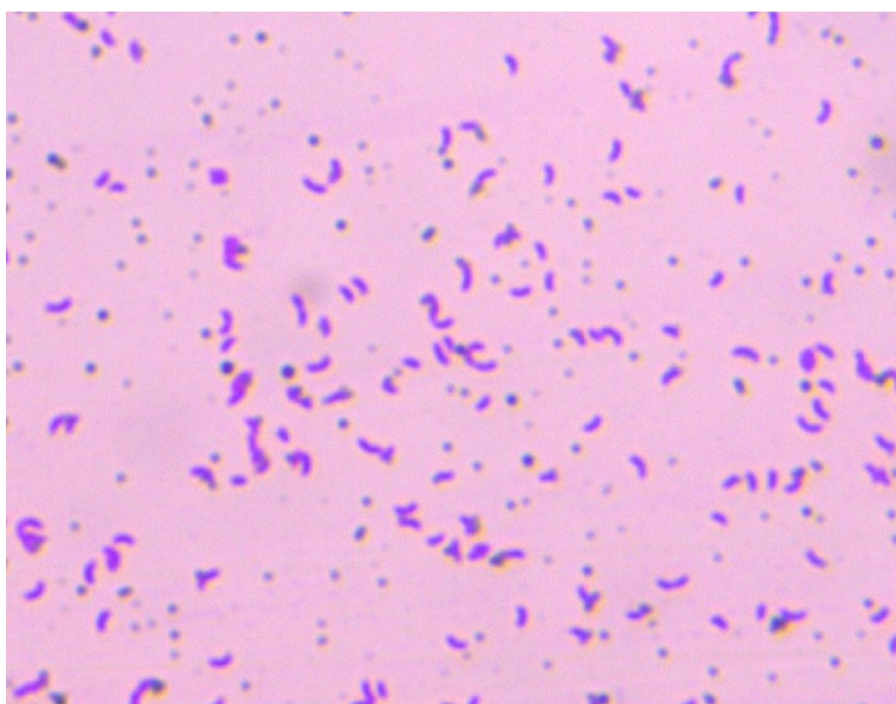
Figura 33 – Valores da absorbância para cada concentração de sulfeto padrão (1-50 mg L⁻¹) utilizando Leitor de ELISA Bio-Tek EL800.



6.3.6 Coloração Gram

Através da análise morfotintorial da cultura de *D. vulgaris* por microscopia com coloração GRAM foi possível verificar vibriões Gram-negativos confirmando assim as características morfológicas da cepa, ver Figura 29. Também foi observado pontos escuros (artefato) na lâmina indicando resíduos de ferro oriundo da inoculação, já que o meio não existia a presença de ferro.

Figura 34 – Microscopia ótica com coloração GRAM de uma cultura *Desulfovibrio vulgaris*, aumento 1000X, em meio Desulfovibrio (DSMZ-63).



7 CONCLUSÃO

7.1 CONCLUSÃO GERAL

Diante do abordado neste trabalho, foi possível desenvolver um método indireto de detecção e quantificação de BRS mais especificamente *Desulfovibrio vulgaris* através da cinética de consumo de sulfato e podendo quantificar essas bactérias entre uma faixa populacional de 10^2 - 10^8 cel/mL em apenas algumas horas. A correlação entre células e consumo deste método foi $R^2= 0,979$ e o tempo estimado para obter os resultados da contagem através deste método é de 12h. Para as contagens das amostras ambientais, contendo diversas espécies de BRS, foi possível correlacionar a microbiota de BRS da amostra com a cepa *D. vulgaris* seja em uma determinada condição de meio de cultivo (presença de nitrato, sulfato ou cloreto) e assim medir a população relativa de BRS para *D. vulgaris* em uma condição.

7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

7.2.1 Método de determinação de nitrato e sulfato e outros ânions por cromatografia de íons

O método de cromatografia de íons foi desenvolvido através do aperfeiçoamento de alguns métodos de cromatografia de íons descritos na literatura e foi validado, principalmente, para os ânions nitrato e sulfato como segue abaixo:

- a) o método desenvolvido permitiu a separação de 17 ânions e com a identificação de 14 picos analíticos em uma corrida de 45 minutos em gradiente de KOH;
- b) o limite de detecção para sulfato e nitrato foram, respectivamente, $0,57 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ e os limites de quantificação foram $1,74$ e $0,385 \text{ mg L}^{-1}$;
- c) a linearidade para o nitrato e o sulfato foi obtida em $2-3,5 \text{ mg L}^{-1}$ com variação entre a faixa de 95% a 105% com condições validadas para o INMETRO e para ANVISA;

7.2.2 Método espectrofotométrico para determinação de sulfato

O método espectrofotométrico de determinação de sulfato foi adaptado às condições do laboratório e testados em dois espectrofotômetros de modelos diferentes e obtendo uma ótima correlação (0,996) a uma faixa de análise utilizando padrões de 40-200 mg L⁻¹.

7.2.3 Cinética de crescimento e de consumo da *D. vulgaris*

A cinética de crescimento e consumo (nitrato e sulfato) da *D. vulgaris* foi importante para conhecer o comportamento desta cepa, cepa modelo experimental de BRS, em diferentes aceptores de elétrons como também em quantidade populacional variada. A partir dos ensaios de cinética em quatro condições diferentes pode-se concluir:

- a) a *D. vulgaris* quando cresce em meio DSMZ-63(T1), 10% de inóculo e com 0,3% de sulfato apresenta uma cinética de consumo de sulfato de 33mg L⁻¹ h⁻¹;
- b) a *D. vulgaris* quando cresce em meio DSMZ-63 (T2), 10% de inóculo e com 0,3% de sulfato e 5mM de nitrato juntos,apresenta uma cinética de consumo de 2 e 33 mg L⁻¹ h⁻¹ dos referidos aceptores de elétrons, respectivamente;
- c) a *D. vulgaris* quando cresce em meio DSMZ-63 (T3), 10% de inóculo e com 0,3% de sulfato e adição de 5mmol L⁻¹de cloreto, apresenta uma cinética de consumo de sulfato de 16 mg L⁻¹ h⁻¹;
- d) a *D. vulgaris* quando cresce em meio DSMZ-63 (T4), sem sulfato, 10% de inóculo e 5,5 mM de nitrato, apresenta uma cinética de consumo de nitrato de 26mg L⁻¹h⁻¹;
- e) a taxa de produção de biomassa de *D. vulgaris* foi maior na presença de nitrato do que de sulfato;
- f) o fato da *D. vulgaris* ter uma maior cinética de crescimento com o nitrato sugere que técnicas de inibição da produção de H₂S com a adição de nitrato podem agravar o acúmulo de sulfeto quando o nitrato do ambiente se esgota.

7.2.4 Quantificação da biomassa de BRS através do consumo de sulfato

A partir do consumo de sulfato com variação de biomassa inicial foi possível quantificar *D. vulgaris* e assim correlacionar com sua população. O modelo equacional pode ser utilizado para quantificar estas células desde que seja nas mesmas condições e com esta cepa (ATCC29579, DSMZ-644). As BRS presentes na água de amostras ambientais podem ser quantificadas por população relativa a *D. vulgaris*. Portanto foi possível inferir que:

- a) a *D. vulgaris* incubada a 38°C em meio DZMZ-63 modificado com sulfato a 0,3% m/v obedece uma relação diretamente proporcional e linear de consumo de sulfato por hora *versus* ln da população tendo como equação , $y=4,54x - 26,70$, sendo y = consumo de sulfato ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) e x =ln população (NMP cel/mL) e $R^2= 0,979$;
- b) o consórcio de BRS encontrado na amostra de água do Rio Camarajipe (Costa Azul) apresentou cinética de crescimento semelhante a *D. vulgaris* quando esta era submetida ao tratamento T2 (Sulfato a 3000mg L^{-1} , nitrato a 320mg L^{-1}) e esse mesmo consórcio é aproximadamente 12x mais eficiente na redução de sulfato (produção de sulfeto) em relação a cepa *D. vulgaris*.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.
- AGRAWAL, Akhil; VANBROEKHOVEN, Karolien; LAL, Banwari. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil–water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. **Anaerobe**, v. 16, n. 1, p. 12-18, 2010.
- ALABBAS, Faisal M. et al. Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 34-42, 2013.
- ALASVAND ZARASVAND, KIANA; RAI, V. RAVISHANKAR.. Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 66-74, 2014.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, New York, 1995.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA R. C.C.; CARVALHO, E. B.; SOUZA, E. R.; CARVALHO, A. S.; SILVA C. H. T. P.; TAFT C. A. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil Waters. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, 2006.
- ARAÚJO-JORGE, TANIA C. DE; COUTINHO, CLÁUDIA M. L. MELO AND AGUIAR, LUIZ EDMUNDO VARGAS DE. Sulphate-reducing bacteria associated with biocorrosion – a review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, n.3, p.329-337, Rio de Janeiro, 1992.
- ATLAS, R. M; BARTHA, R. ATLAS,. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Addison-Wesley Publishing Company, 1981.
- BACHMANN, R. T., JOHNSON, A. C., EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 86 , pp. 225-237, 2014.
- BAHR, M., KLEPAC-CERAJ, V., TESKE, A., SOGIN, M. L., e HOBBIE, J. E., Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. **Environmental Microbiology**. V. 78, p. 1175-1185, 2005.
- BARTON, L. L.. **Sulphate-reducing bacteria**. Biotechnology Handbooks, v. 8, New York, Plenum Express, 1995.
- BERNARDEZ L. A., ANDRADE LIMA L. R. P., RAMOS C. L. S., ALMEIDA P. F. A kinetic analysis of microbial sulfate reduction in a upflow packed-bed anaerobic bioreactor. **Journal of the International Mine Water Association (IMWA)** 2012.
- BHAGOBATY, R. K. Culture dependent methods for enumeration of sulphate reducing bacteria (SRB) in the Oil and Gas industry. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, pp. 1-6, 2014.
- BHATTACHARYYA, L.; ROHRER, J. S. Applications of Ion Chromatography in the Analysis of Pharmaceutical and Biological Products. **John Wiley & Sons**, 2012.

BICHSEL, YVES; VON GUNTEN, Urs. Determination of iodide and iodate by ion chromatography with postcolumn reaction and UV/visible detection. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 1, p. 34-38, 1999.

CABRERA, G., PEREZ, R., GOMEZ, J., ABALOS, A., & CANTERO, D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. Strains. **Journal of hazardous materials**, 135(1-3), 40-46, 2006.

CALLBECK, C. M.; AGRAWAL, A.; VOORDOUW, G. Acetate production from oil under sulfate-reducing conditions in bioreactors injected with sulfate and nitrate. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 16, p. 5059-5068, 2013.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual review of plant biology**, 50.1: 277-303, 1999.

CARVALHO, A. S. **Desenvolvimento e aplicação da tecnologia de exclusão biocompetitiva para controle da biosulfetogênese na indústria de petróleo**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

CASTRO, H.F., WILLIAMS, N.H., OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria **Microbiology Ecology**, v.31, p.1-9, 2000.

CHRISTISON, T., PANG, F., & LOPEZ, L. Determination of Inorganic and Organic Acids in Apple and Orange Juice Samples Using Capillary IC. **Thermo Fisher Scientific**, Sunnyvale, CA, USA, 2011.

CHAPELLE, F. H.; LOVLEY, D. R. Competitive exclusion of sulfate reduction by Fe (III)-reducing bacteria: a mechanism for producing discrete zones of high-iron ground water. **Groundwater**, v. 30, n. 1, p. 29-36, 1992.

CHOI, E.; RIM, J. M. Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. **Water Science & Technology**, v. 23, n. 7-9, p. 1259-1264, 1991.

COTE, C., ROSAS, O., SZTYLER, M., DOMA, J., BEECH, I., BASSEGUY, R. Corrosion of low carbon steel by microorganisms from the 'pigging' operation debris in water injection pipelines. **Bioelectrochemistry**, 2013.

DAVIDOVA, I., HICKS, M. S., FEDORAK, P. M., & SUFLITA, J. M. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production 108actér. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 80-86, 2001.

DIONEX. **Eluent Suppressors for Ion Chromatography**. Disponível em <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114797-PS__Eluent-Suppressors%20for%20IC-PS70690.pdf> acesso em 14 de fev. 2014.

DOMINGOS, J. S., REGIS, A. C. D., SANTOS, J. V., DE ANDRADE, J. B., & ROCHA, G. O. D. A comprehensive and suitable method for determining major ions from atmospheric particulate matter matrices. **Journal of Chromatography A**. 2012.

ENGEL, A. HANDEL, N. A novel protocol for determining the concentration and composition of sugars in particulate and in high molecular weight dissolved organic matter (HMW-DOM) in seawater. **Marine Chemistry**, n.127, p.180-191, 2011.

FAKHRU'L-RAZI, A., PENDASHTEH A., ABDULLAH L. C., BIAK D.R.A., MADAENI S.S., ABIDIN, Z.Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, Volume 170, Issues 2–3, 30, p 530–551, 2009.

FANALI, S.; HADDAD, P. R.; POOLE, C.; SCHOENMAKERS, P.; Lloyd, D. K. **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation**. Elsevier, 2013.

FENG P.; WEAGANT S.D. **Bacteriological Analytical Manual Online (8th ed.)**. U.S.F.D.A. , Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2002.

G³ÓD, B. K. **Principles and Applications of ion-exclusion chromatography**. 1997.

GANNA, M.L.; KEBBOUCHE-GANNA, S.; TOUZI, A.; ZORGANI, M.A.; PAUSSA, A.; LOUNICI, H.; MAMERI, N. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an Algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38: 391-404, 2011.

GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., PIOT, M., & BOYAVAL, E. Determination of anions of milk by ion chromatography. **Le Lait**, v. 76, n. 5, p. 433-443, 1996.

GREIN, F.; RAMOS A. R.; VENCESLAU, S. S.; PEREIRA, I. A.C. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory 109actér metabolismo. **Biochimica et Biophysica Acta**. V- 1827, 145–160, 2013.

GROS, Nataša. Ion Chromatographic Analyses of Sea Waters, Brines and Related Samples. **Water**, v. 5, n. 2, p. 659-676, 2013.

HADDAD, P.R.; JACKSON, P.E. Ion Chromatography: Principles and Applications, Journal Chromatography Library. **Elsevier**: Amsterdam, v. 46 p. 2, 1990.

HAMMAD, A. I.; ELSHAHAWY, M. R. Influence of Gamma Radiation in Combination with Biocides on Sulfur Reducing Bacteria. **Arab Journal of Nuclear Science and Applications**, 47(3), (158-168), 2014.

HAMAP: Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F . disponível em <<http://hamap.expasy.org/proteomes/DESVM.html> > Acesso em 29 agosto 2013.

HAMILTON, W. A. Sulphate-Reducing Bacteria And Anaerobic Corrosion. **Ann. Na. Microbiol.** n. 39, p.195-217, 1985.

HE, Q.; HUANG, K. H.; HE, Z.; ALM, E. J.; FIELDS, M. W.; HAZEN, T. C.; ARKIN, A. P.; WALL, J. D.; ZHOU, J. Energetic consequences of nitrite stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, inferred from global transcriptional analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4370-4381, 2006.

HOLMKVIST, L.; THOMSEN, U. S.; LARSEN, J.; JENSEN, M.; SKOVHUS, T. L. . Problems Caused by Microbes and Treatment Strategies: Monitoring Microbial Responses to Biocides; Bioassays—A Concept to Test the Effect of Biocides on both Archaea and Bacteria in Oilfield Systems. In: **Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems**. Springer Netherlands, p. 117-124, 2011.

HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate-reducing sulfurospirillum spp. That outcompete sulfate-reducing bacterial for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 2644-2652, 2007.

HUBERT, C.; VOORDOUW, G.; MAYER, B.. Elucidating microbial processes in nitrate- and sulfate-reducing systems using $\delta^{15}\text{N}$ and oxygen isotope ratios: the example of oil reservoir souring control. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, n. 13, p. 3864-3879, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (**INMETRO**). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQCGCRE-008, 2003.

JACKSON, Peter E. Ion chromatography in environmental analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2000.

JACKSON, Peter E.; THOMAS, Dave; CHASSANIOL, Kirk. Environmental analysis of inorganic anions and perchlorate by ion chromatography. In: **ACS SYMPOSIUM SERIES**. Washington, DC; American Chemical Society; 1999, p. 3-15, 2004.

JURELEVICIUS, D., VON DER WEID, I., KORENBLUM, E., VALONI, E., PENNA, M., SELDIN, L. Effect of nitrate injection on the bacterial community in a water-oil tank system analyzed by PCR-DGGE. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 35 (4) , pp. 251-255, 2008.

KAKOOEI, S. ISMAIL, M. .C ARIWAHOEDI, B. Mechanisms of Microbiologically Influenced Corrosion: A Review. **World Applied Sciences Journal**, v.17, n 4, p. 524-531, 2012.

KAMARASWAMY, R.; EBERT, S.; GRAY, M.R.; FEDORAK, P.M.; FOGHT, J.M. Molecular- and cultivation-based analyses of microbial communities in oil field water and in microcosms amended with nitrate to control H_2S production. **Appl Microbiol Biotechnol**. 89: 2027-2038, 2011.

KEEG. Sulfur metabolism [2013]. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?rn00920+R00509>. Acesso em 30 jan. 2014.

KEPNER, R. L.; PRATT, J. R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 4, p. 603-615, 1994.

KHAN N. E.; ADEWUYI Y. G. A new method of analysis of peroxydisulfate using ion chromatography and its application to the simultaneous determination of peroxydisulfate and other common inorganic ions in a peroxydisulfate matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 392-397, 2011.

KOLMERT, Å.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K. B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. **Journal of microbiological methods**, v. 41, n. 3, p. 179-184, 2000.

KUANG F., WANG J., YANA, L. ZHANG D. Effects of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of 110 steel. **Electrochimica Acta**, v.52, 6084-6088, 2007.

KUBOTA, H., SATO, K., YAMADA, T., & MAITANI, T. Separation of respective species of phytochelatins and their desglycyl peptides (class III metallothioneins) and the precursors glutathione and γ -glutamylcysteine with capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 803(1), 315-320, 1998.

KUEHR, V.W., C.A. H AND I.S. V.D. VLUGT. The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soil. **Water**, 18: 147-165, 1994.

LAMBO, A.J.; NOKE, K.; LARTER, S.R.; VOORDOUW, G. Competitive, microbially-mediated reduction of nitrate with sulfide and aromatic oil components in a low-temperature, western Canadian oil reservoir. **Environmental Science Technology**, v.42: 8941-8946, 2008.

LUCAS S., COPELAND A., LAPIDUS A., GLAVINA DEL RIO T., DALIN E., TICE H., BRUCE D., GOODWIN L., PITLUCK S., SIMS D., BRETTIN T., DETTER J.C., HAN C., LARIMER F., LAND M., HAUSER L., KYRPIDES N., MIKHAILOVA N., HAZEN T.C., RICHARDSON P. "Complete sequence of *Desulfovibrio vulgaris* str. 'Miyazaki F'." **EMBL/GenBank/DDBJ databases**, 2008.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V., & CLARK, D. P. **Microbiology de Brock**. Artmed. 12^a ed. 2010.

MAGNE, VALÉRIE; MATHLOUTHI, MOHAMED; ROBILLAND, BERTRAND. Determination of some organic acids and inorganic anions in beet sugar by ionic HPLC. **Food chemistry**, v. 61, n. 4, p. 449-453, 1998.

MAGNE, VALÉRIE; MATHLOUTHI, MOHAMED; ROBILLAND, BERTRAND. Determination of some organic acids and inorganic anions in beet sugar by ionic HPLC. **Food chemistry**, v. 61, n. 4, p. 449-453, 1998.

MAHON, C.R.; MANUSELIS, G.JR. Textbook of diagnostic microbiology. **Saunders Co**. Philadelphia, 1997.

MARIETOU, A., RICHARDSON, D., COLE, J., & MOHAN, S. Nitrate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*: A periplasmic nitrate reductase system that lacks NapB, but includes a unique tetraheme c-type cytochrome, NapM. **FEMS microbiology letters**, 248(2), 217-225, 2005.

MENERT, A., PAALME, V.P., JUHKAM, J., e VILU, R., Characterization of sulfate-reducing bacteria in yeast industry waste by microcalorimetry and PCR amplification. **Thermochimica Acta**. V. 420, p. 89-98, 2004.

MILLER, MARCUS; SCHNUTE, WILLIAM. Direct Determination of Small Organic Acids in Sea Water by IC-MS. **Thermo Fisher Scientific**, San Jose, CA, USA. 2012.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, 3: 371-394, 1949.

MORALES, J. A., DE GRATEROL, L. S., VELÁSQUEZ, H., DE NAVA, M. G., & DE BORREGO, B. S. Determination by ion chromatography of selected organic and inorganic

acids in bacteria at Maracaibo, Venezuela. **Journal of Chromatography A**, 804(1), 289-294, 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006.

MORENO-VIVIÁN C.; CABELLO, P.; MARTÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; & CASTILLO, F. . Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of bacteriology**, 181.21: 6573-6584, 1999.

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors. **Biochemistry**, Moscow, 72.10: 1151-1160, 2007.

MUYZER, G., STAMS, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology** 6 (6), pp. 441-454, 2008.

MYHR, S., LILLEBØ, B.-L., SUNDE, E., BEEDER, J., TORSVIK, T. Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. **Applied Microbiology and Biotechnology** 58 (3) , pp. 400-408, 2002.

NESTERENKO, Pavel N. Simultaneous separation and detection of anions and bacteria in ion chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 311-319, 2001.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte 1. Fundamentos e calibração com um componente (Calibração Univariada). **Química Nova**, 25, 5, 856-865, 2002.

OYEKOLA O. O., HARRISON STL VAN HILLE R. P., Effect of culture conditions on the competitive interaction between lactate oxidizers and fermenters in biological sulfate reduction system. **Bioresource Technology** v. 104 p. 616 –621, 2012.

PARKES, R.J. ,CRAGG B.A. , S.J. Balea Goodmana, K. , J.e. Fryb. A combined ecological and physiological approach to studying 112actéri reduction within deep marine sediment layers.**Journal of Microbiological Methods**, v.23, p.235-249, 1995.

PECK, H. D. Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. **Journal of bacteriology**, v. 82, n. 6, p. 933-939, 1961.

PETERNELLI, L. A.; MELLO, M. P. de. **Conhecendo o R: uma visão estatística**. Viçosa, MG: UVF, 2007.

PILLAY, C., LIN, J. **The impact of additional nitrates in mild steel corrosion in a seawater/sediment system**. *Corrosion Science* 80 , pp. 416-426, 2014.

PLUGGE,C.M; ZHANG,W.; SCHOLTEN,J.C.M.; STAMS, A.J.M. **Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria**. *Frontiers in Microbiology*,81 (2), 2011.

POCHART, P., DORE, J., LEMANN, F., & RAMBAUD, J. C. Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon. **FEMS microbiology letters**, v. 98, n. 1, p. 225-228, 1992.

POL, L. W. H.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. **Anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater**. Biodegradation. v.9, p.213-224, 1998.

POSTGATE, J.R., **The Sulphate-Reducing Bacteria**. Great Britain: Cambridge University Press; 133 p., 1979.

QI, P.; ZHANG, D.; WAN, Y. A novel sulfate-reducing bacteria detection method based on inhibition of cysteine protease activity. **Talanta**, 129, p. 270-275, 2014.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RICHARDSON, D. J.; BERKS, B. C.; RUSSELL, D. A.; SPIRO, S.; TAYLOR, C. J. . Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v.58.2: 165-178, 2001.

Rossi W.; Branco L. C.; Lacerda J. A.; Gomes A. C.; Wagner E. M. S. **Fontes de Poluição e o Controle da Degradação Ambiental dos Rios Urbanos em Salvador**. RIGS - Revista interdisciplinar de gestão social, v.1, n.1, 2012.

SALAZAR-ARAMAYO, J.L.; RODRIGUES-DA-SILVEIRA, R.; RODRIGUES-DE-ALMEIDA, M.; DE CASTRO-DANTAS, T.N. A conceptual model for project management of exploration and production in the oil and gas industry: The case of a Brazilian company. **International Journal of Project Management**, v.31 (4) , pp. 589-601, 2013.

SANTOS, A.F.J ; BATISTA, L. L. F. ; LIMA, J.B.T. ; ALMEIDA, ROGERIA C.C. ; ROQUE, M.R.A. ; RAMOS-DE-SOUZA, ELIAS ; ALMEIDA, P. F. . Evaluation of the fluorescence In Situ Hybridization Technique for Detection of Eubacteria and Sulfate-Reducing Bacteria from samples of Water in oil fields. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 139-144, 2010.

SANTOS, E. S.; SOUZA, L. C. V. ; ASSIS, P. N. ; ALMEIDA, P. F. ;SOUZA E. R. Novel potential inhibitors for adenylylsulfate reductase to control souring of water in oil industries. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2013.

SARTI, É. L. **Influência do oxigênio no crescimento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios em batelada**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2007.

SCHWERMER, C.U., LAVIK, G., ABED, R.M.M., DUNSMORE, B., FERDELMAN, T.G., STOODLEY, P., GIESEKE, A., DE BEER, D. **Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for injection of seawater into oil fields**. Applied and Environmental Microbiology, 74 (9), pp. 2841-2851, 2008.

SEKIGUCHI, Y., MATSUNAGA, A., YAMAMOTO, A., & INOUE, Y. Analysis of condensed phosphates in food products by ion chromatography with an on-line hydroxide eluent generator. **Journal of Chromatography A**, 881(1), 639-644, 2000.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.34, 714– 724, 2008.

SEVCIK R.S. MOWERY R. A. BECKER C., CHAMBLISS. K. Rapid Analysis Of Carbohydrates In Aqueous Extracts And Hydrolysates Of Biomass Using A Carbonate-Modified Anion-Exchange Column. **J. Chromatogr. A** 1218, p.1236–1243, 2011.

SMALL, H.; STEVENS, TS; BAUMAN, WC. Novel ion-exchange chromatographic method using conductometric detection. **Anal. Chem**, v.47, 1801–1809,1975.

SOUSA, K. A. de; CAMMAROTA, M. C.; SÉRVULO, E. F. C. Effect of nitrate application on reduction of biogenic sulphide under different initial concentrations of nitrate and sulphate-reducing bacteria. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 273-278, 2010.

TAN, YI; CARLTON, A. G.; SEITZINGER, S. P.; & TURPIN, B. J. SOA from methylglyoxal in clouds and wet aerosols: Measurement and prediction of key products. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 39, p. 5218-5226, 2010.

TAN, YI; PERRI, M. J.; SEITZINGER, S. P.; & TURPIN, B. J. . Effects of precursor concentration and acidic sulfate in aqueous glyoxal– OH radical oxidation and implications for secondary organic aerosol. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 21, p. 8105-8112, 2009.

TANNER RS. Monitoring sulfate-reducing bacteria: comparison of enumeration media. **J Microbiol Meth**10, 83–90, 1989.

TAO, X., LI, Y., HUANG, H., CHEN, Y., LIU, P., LI, X. **Desulfovibrio vulgaris Hildenborough prefers lactate over hydrogen as electron donor**. *Annals of Microbiology* , pp. 1-7, 2013.

TONHI, E., COLLINS, K. E., JARDIM, I. C. S., & COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2012.

TRAORE NA, Jacq VA A simple membrane-filter technique for the enumeration of S-reducing bacteria in soil and water samples. **J Microbiol Methods** v. 14, pp.1–9, 1991.

TUCKER, H. L.; FLACK, R. W. Determination of iodide in ground water and soil by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 804, n. 1, p. 131-135, 1998.

TYRRELL É., SHELLIE R. A. . HILDERA, E. F. POHL, C. A. HADDAD, PAUL R. Fast ion chromatography using short anion bacteria columns. **Journal of Chromatography A**, n.1216, p.8512–8517, 2009.

UNIPROT- B8DLQ6. Disponível em < <http://www.uniprot.org/uniprot/B8DLQ6>>. Acesso em 29 agosto 2013.

VIDELA H. A. Prevention and bacteria biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n.49, p.259 – 270, 2002.

VON WOLZOGEN KUEHR, C.A.H. AND VAN DER VLUGT, L.S. “The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soils”. **Water**, Vol. 18, pp. 147-165, 1934.

WAN, Y.; WANG, Y.; WU, J.; ZHANG, D. Graphene oxide sheet-mediated silver enhancement for application to electrochemical biosensors. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 3, p. 648-653, 2010.

WAN, Y.; ZHANG, D.; HOU, B. Monitoring microbial populations of sulfate-reducing bacteria using an impedimetric immunosensor based on agglutination assay. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 218-223, 2009.

WEN J.; XU D.; GU T.; RAAD I. A green triple biocide cocktail consisting of a biocide, EDDS and methanol for the mitigation of planktonic and sessile sulfate-reducing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28:2, 431-435, 2012

WIKIEL, A.J., DATSENKO, I., VERA, M., SAND, W WIKIEL, Agata J. et al. Impact of *Desulfovibrio alaskensis* biofilms on corrosion behaviour of carbon steel in marine environment. **Bioelectrochemistry**, 2013.

XIE, LI; CHEN, J.; WANG R.; ZHOU, Q.. Effect of carbon source and COD/NO₃ –N ratio on anaerobic simultaneous denitrification and methanogenesis for high-strength wastewater treatment. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 6, p. 759-764, 2012.

YUAN,S.; LIANG,B.; ZHAO, Y.; PEHKONEN, S.O. Surface chemistry and corrosion bacteria of 304 stainless steel in simulated seawater containing inorganic sulphide and sulphate-reducing bacteria. **Corrosion Science**, 74. 353–366, 2013.

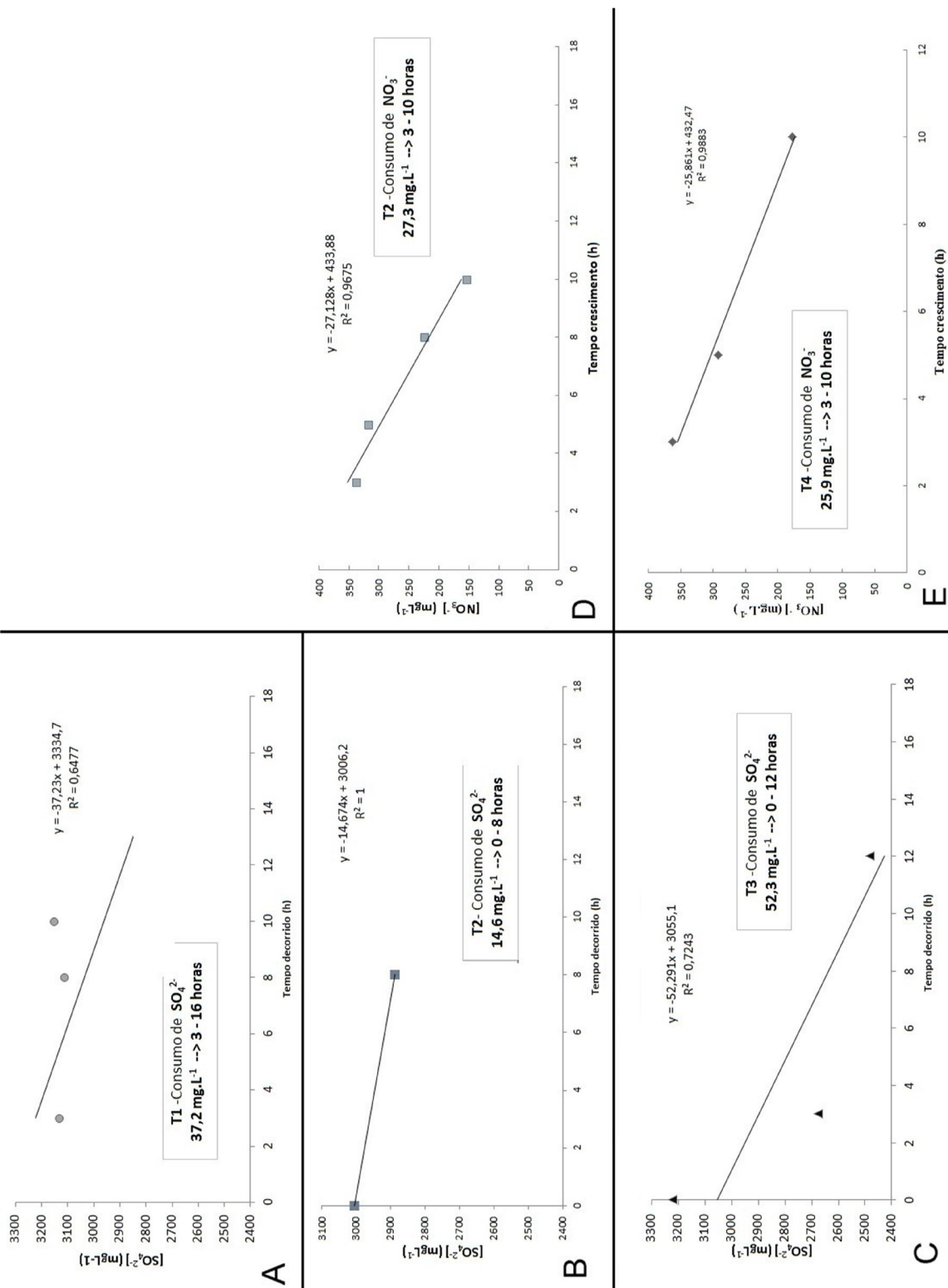
ZHANG, C. WEN,F. CAO, Y. Progress in Research of Corrosion and Protection by Sulfate-Reducing Bacteria. **Procedia Environmental Sciences**, n. 10, p.1177 – 1182, 2011 .

ZHANG, J., ZHANG, Y., CHANG, J., QUAN, X., & LI, Q. Biological sulfate reduction in the acidogenic phase of anaerobic digestion under dissimilatory Fe (III)–Reducing conditions. **Water research**, v. 47, n. 6, p. 2033-2040, 2013.

ZHOU, Aifen et al. Characterization of NaCl tolerance in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough through experimental evolution. **The ISME journal**, v. 7, n. 9, p. 1790-1802, 2013.

ZIMMER, MARTIN; OLTERS DORF, A; RENTSCH, J. Online process control of acidic texturisation baths with ion chromatography. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 499-503, 2009.

APÊNDICE A – Gráficos da cinética de consumo de nitrato e sulfato



APÊNDICE B -Meio de cultura Desulfobivrio (DSMZ) .63 – adaptado sem ferro

	Volume final de Meio de cultura				
	100 mL	300 mL	350 mL	600 mL	1 L
Substâncias	Quantidade	Quantidade	Quantidade	Quantidade	Quantidade
Solução A:					
K ₂ HPO ₄	0,05 g	0,150 g	0,175 g	0,300g	0.5 g
NH ₄ Cl	0,1 g	0,300 g	0,350 g	0,600g	1.0 g
Na ₂ SO ₄ 1.0 g	0,1 g	0,300 g	0,350 g	0,600g	1.0 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g	0,03 g	0,035 g	0,06 g	0.1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g	0,6 g	0,7 g	1,2g	2.0 g
DL-Lactato de sódio 50%	0,320 mL	0,96 mL	1,120 mL	1,92 ml	3,2 ml
Extrato de levedura	0,1 g	0,300 g	0,350 g	0,600g	1.0 g
Resazurina 0,2%	0,4 mL	1,2 mL	1,4 mL	2,4 ml	4 ml
Água destilada	98 mL	294 mL	343 mL	588 ml	980.0 ml
Solução B:					
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g	0,150 g	0,175 g	0,3g	0.5 g
Água destilada	1 ml	3,0 ml	3,5 ml	6ml	10.0 ml
Solution C:					
Toglicolato de sódio	0,01 g	0,030 g	0,035 g	0,06 g	0.1 g
Acido ascórbico	0,01 g	0,030 g	0,035 g	0,06g	0.1 g
Água destilada	1 ml	3,0 ml	3,5 ml	6 ml	10.0 ml

Procedimento:

- Dissolver os reagentes (solução A) em uma quantidade apropriada de água \cong 60% do volume total de meio de cultura. Ferver a solução por alguns minutos e depois arrefecer a temperatura ambiente.

- Preparar as soluções B e C, adicionar na solução A e ajustar o pH 7,8 com NaOH.

- Avolumar o meio de cultura com água até o alcançar o volume total de meio.

Distribuir nos frascos, Autoclavar por 15 min a 121°C.

Obs.: Não armazenar o meio de cultura sem autoclavar.

APÊNDICE C - Procedimento Lavagem de Vidraria para cromatografia de íons

As análises de cromatografia de íons apresentam faixa de detecção com concentração muito baixa (parte por bilhão -ppb ou microgramas por litro- mg L^{-1}) e por isso, a probabilidade de contaminação durante o preparo da amostra e armazenamento, é alta. Recomenda-se que as vidrarias e os recipientes sejam de vidro borossilicato e que na limpeza deste material siga as etapas:

1. Efetuar limpeza simples com detergente comum e água para remover a sujeira mais “grossa” das vidrarias, como também limpar a parte externa com álcool 96% caso esteja escrita com marcador permanente;
2. Em cada recipiente ou vidraria preencher com solução de 10% v/v Extran neutro em água ultrapura ou mergulhar as vidrarias nesta solução;
3. Condicionar as vidrarias contendo solução de Extran em banho de ultrason à potência média a alta por 15 minutos, em seguida, retirar e enxaguar com água ultrapura por 3 a 4 vezes. Repetir o processo das etapas 2 e 3 totalizando 30 minutos de sonicação. Para o banho de ultrason pode-se utilizar água comum, porém deve-se evitar a contaminação com a parte interna e as bordas das vidrarias;
4. Colocar as vidrarias para secar em caixas plásticas de “vidraria descontaminadas” sobre papel toalha e deixando secar ao abrigo de vento e poeira;
5. Após a secagem das vidrarias, envolver com filme PVC e guardar.

OBS.1: Todo o procedimento deve ser feito com luvas sem talco.

APÊNDICE D - Procedimento básico de Injeção de amostras no Cromatógrafo de Íons – ICS3000 – Dionex

Para injetar as amostras no cromatógrafo é preciso realizar o preparo das amostras a fim de não provocar danos no equipamento e em seguida executar as etapas descritas na sequência abaixo:

1. Inicialização e procedimento de *self-test*

1.1 Descartar os resíduos do garrafão (2L) de eluentes e preencher com o eluente (H₂O), caso seja eluente diferente é preciso realizar procedimento de descontaminação;

1.2 Trocar a água contida no recipiente do sistema de lubrificação das bombas;

1.3 Ligar todos os módulos (DC, DP e EG) e esperar o *self-test* (realização do processo de limpeza e lubrificação das bombas com a circulação de H₂O ultrapura);

2. Realizaçãodo *Prime*

2.1 Abrir a válvula de “purga” das duas bombas (PUMP1 e PUMP2 -Knob);

2.2Ligar as bombas (remotamente ou manual) em “prime”;

2.3 Esperar aproximadamente 3 minutos para que todas as bolhas do sistema sejam removidas;

2.4 Finalizar o *prime*, desligando as bombas no botão “prime”;

3. Testes de fluxo e detectores

3.1 Conectar os módulos (DC, EG e DP), caso não estejam conectados ao programa Chromeleon;

3.2 Ligar pelo painel do software a célula de condutividade “*Heater- On 35°C*”, a célula amperométrica “*Cell on*”, a temperatura da câmara de colunas cromatográficas. Acionar pelo painel externo do módulo DC para a configuração dos leds em “load” para os dois sistemas de injeção (pressionando botões - Valve1 e Valve2);

3.3 Ligar as duas bombas a um fluxo de 0,3 mL/min, observar a variação da pressão e deixar por aproximadamente 10 min a fim de alcançar estabilidade na temperatura e nos valores dos detectores (condutividade, amperométrico e pH);

4. Condicionamento da coluna e estabilização do sistema

4.1 Obter aquisição clicando em “*Aquisition*”

4.2Aumentar o fluxo para 1mL/min (Fluxo de operação) e observar a pressão, durante 3 minutos;

4.3 Ligar o “CR-TC” e o EG a 30mM de KOH, deixar nessa concentração por 30 minutos;

4.4 Após 30 min e observar uma estabilização na condutividade, desligar o EG ou mudar a concentração para 0mM, aguardar por mais 30min;

APÊNDICE D - Continuação

4.5 Ligar a supressora a 10mA e aguardar por cinco minutos – após o tempo, a condutividade ideal será $< 0,55\mu\text{S}$, valores de aproximadamente $0,38\ \mu\text{S}$ foram obtidos como um bom condicionamento para a linha de base;

5. Programação e carregamento no amostrador

5.1 Recomenda-se fazer a programação copiando a última programação executada renomeando os valores das amostras (Coluna *Name*). Na tela de programação das sequências, após clicar em *browser* e escolher um método, é importante ficar atento para que os dados da coluna “pos.” esteja com as amostras obedecendo uma sequência crescente, assim como, os dados da coluna “status” esteja em *single*.

Obs. É importante que na programação exista uma amostra com água ultrapura para a estabilização e outra de pós-corrída;

5.2 Carregar no amostrador AS40 os vial's contendo as amostras conforme a sequência programada no Chromeleon;

5.3 Configurar no painel do amostrador AS40 os parâmetros

Em Setup

- ✓ INJ TYPE – “Loop”
- ✓ INJ MODE – “Prop”
- ✓ BLEED – “On”
- ✓ INJ/VIAL – “1”
- ✓ OPERATION – “Lcl”

OBS: A chave “AS40” deve estar desligada no programa Chromeleon.

5.4 Apertar o botão *run* no amostrador e verificar se o carretel foi deslocado e parou no 1° vial.;

6. Carregar a programação no Chromeleon

6.1 Encerrar a aquisição no Chromeleon e em seguida clicar em “*Edit batch*” e em *Batch List* para adicionar a programação;

6.2 Verificar erros na programação e quantidade de eluente que será consumido clicando em “*Ready Check*”;

6.3 Verificar se os parâmetros (Pressão, condutividade, temperatura e pH) estão estabilizados;

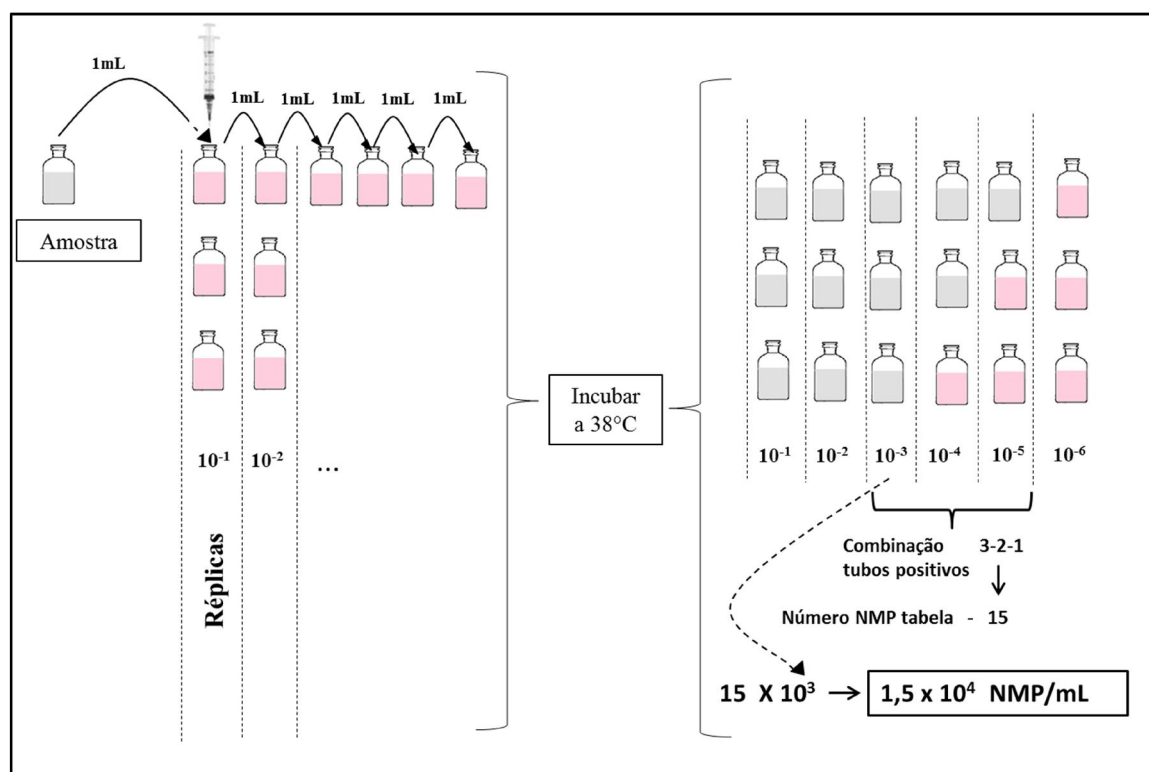
6.4 Iniciar o programa em *start* e verificar se AS40 foi acionado (são dois estágios de injeção- Bleed e Inject).

APÊNDICE E - Procedimento de Leitura e cálculo do NMP

Para o calculo do NMP:

- 1- Ver combinação dos 3 últimos tubos positivos;
- 2- Procura o valor do NMP na tabela;
- 3 – Multiplicar pelo fator de diluição referente ao antepenúltimo da combinação dos três tubos positivos, ver figura 1.

Figura 1 - Esquema representativo do procedimento de leitura e cálculo do número mais provável – NMP.



Fonte: Adaptada (INGRAHAM, 2011)¹.

¹INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A. Introdução à microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de casos. Cengage Learning, 2011.

APÊNDICE E – Continuação.

Tabela 1 – Número mais provável-NMP e intervalo de confiança a nível de 95% de propabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada 1 – 0,1- 0,01 g ou mL.

Combinação dos tubos +			NMP/g ou NMP/mL	Intervalo de confiança 95%		Combinação dos tubos +			NMP/g ou NMP/mL	Intervalo de confiança 95%	
				mínimo	máximo					mínimo	máximo
0	0	0	<0,3	–	0,95	2	2	0	2,1	0,45	4,2
0	0	1	0,3	0,02	0,96	2	2	1	2,8	0,87	9,4
0	1	0	0,3	0,02	1,10	2	2	2	3,5	0,87	9,4
0	1	1	0,6	0,1	1,8	2	3	0	2,9	0,87	9,4
0	2	0	0,6	0,1	1,8	2	3	1	3,6	0,87	9,4
0	3	0	0,9	0,4	3,8	3	0	0	2,3	0,46	9,4
1	0	0	0,4	0,0	1,8	3	0	1	3,8	0,87	11
1	0	1	0,7	0,1	1,8	3	0	2	6,4	1,7	18
1	0	2	1,1	0,4	3,8	3	1	0	4,3	0,9	18
1	1	0	0,7	0,1	2,0	3	1	1	7,5	1,7	20
1	1	1	1,1	0,4	3,8	3	1	2	12	3,7	42
1	2	0	1,1	0,4	4,2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1,5	0,5	4,2	3	2	0	9,3	1,8	42
1	3	0	1,6	0,5	4,2	3	2	1	15	3,7	42
2	0	0	0,9	0,1	3,8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1,4	0,4	4,2	3	2	3	29	9	0,1
2	0	2	2,0	0,5	4,2	3	3	0	24	4,2	0,1
2	1	0	1,5	0,4	4,2	3	3	1	46	9	0,2
2	1	1	2,0	0,5	4,2	3	3	2	110	18	0,41
2	1	2	2,7	0,9	9,4	3	3	3	>110	42	–

Fonte: Adaptado MANUAL, Bacteriological Analytical. ONLINE. 2001.

APÊNDICE F–Código da programaçãono Chromeleon para a análise de íons

```

Column_TC.AcquireExclusiveAccess
Pump_2.Pressure.LowerLimit = 300 [psi]
Pump_2.Pressure.UpperLimit = 2700 [psi]
Pump_2.MaximumFlowRamp = 6.00 [ml/min2]
Pump_2.%A.Equate = "%A"
Pump_1.Pressure.LowerLimit = 300 [psi]
Pump_1.Pressure.UpperLimit = 1750 [psi]
Pump_1.MaximumFlowRamp = 6.00 [ml/min2]
Pump_1.%A.Equate = "%A"
%B.Equate = "%B"
%C.Equate = "%C"
%D.Equate = "%D"
CR_TC = On
InjectValve_1.State LoadPosition
InjectValve_2.State LoadPosition
EDet1.Mode = IntAmp
EDet1.CellControl = On
EDet1.Data_Collection_Rate = 1.00 [Hz]
pH.UpperLimit = 13.00
pH.LowerLimit = 10.00
WaveformName = "sulfeto e cianeto"
WaveformDescription = "Sulfeto"
Electrode = AgCl
Waveform Time = 0.000, Potential = -0.100, GainRegion = Off, Ramp = Off,
Integration = Off
Waveform Time = 0.200, Potential = -0.100, GainRegion = On, Ramp = Off,
Integration = On
Waveform Time = 0.900, Potential = -0.100, GainRegion = Off, Ramp = Off,
Integration = Off
Waveform Time = 0.910, Potential = -1.000, GainRegion = Off, Ramp = Off,
Integration = Off
Waveform Time = 0.930, Potential = -0.300, GainRegion = Off, Ramp = Off,
Integration = Off
Waveform Time = 1.000, Potential = -0.300, GainRegion = Off, Ramp = Off,
Integration = Off, LastStep = On
Pump_1.Flow = 0.500 [ml/min]
%B = 0.0 [%]
%C = 0.0 [%]
%D = 0.0 [%]
Pump_1.Curve = 5
Pump_2.Flow = 1.000 [ml/min]
Pump_2.Curve = 5
CDet1.Data_Collection_Rate = 5.0 [Hz]
Temperature_Compensation = 1.7 [%/°C]
CellHeater.TemperatureSet = 35.00 [°C]
Column_TC.Mode = On

```

Column_TC.TemperatureSet = 30.00 [°C]
Suppressor1.Type = ASRS_4mm

APÊNDICE F – Continuação

CurrentSet = 156 [mA]
; Suppressor1.Carbonate = 0,0
; Suppressor1.Bicarbonate = 0,0
; Suppressor1.Hydroxide = 63,0
; Suppressor1.Tetraborate = 0,0
; Suppressor1.Other eluent = 0,0
; Suppressor1.Recommended Current = 156
CellHeater.Mode = On

-2.300 Pump_Relay_1.Closed Duration=138.00
Concentration = 1.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5

0.000 InjectValve_1.InjectPosition Duration=30.00
InjectValve_2.InjectPosition Duration=30.00
EDet1.Autozero
ED_1.AcqOn
CDet1.Autozero
CD_1.AcqOn

9.000 Concentration = 1.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5

9.010 CurrentSet = 38 [mA]

15.000 Concentration = 15.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5
CurrentSet = 75 [mA]

28.000 Concentration = 30.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5
CurrentSet = 156 [mA]

38.000 Concentration = 63.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5
Concentration = 1.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5

44.000 CurrentSet = 38 [mA]

45.000 ED_1.AcqOff
CD_1.AcqOff
Concentration = 1.00 [mM]
EGC_2.Curve = 5
Column_TC.ReleaseExclusiveAccess
End

APÊNDICE G– Problemas e Soluções nas análises cromatográficas

Nas análises cromatográficas, durante o processo para o desenvolvimento do método (programa de gradiente, estabilização da coluna, manutenção do equipamento) houve alguns ajustes para solucionar os problemas.

Foi observado entre as corridas cromatográficas, que as injeções anteriores interferiam nos sinais adquiridos de uma nova injeção, isto é, toda vez que se realizava uma nova injeção o sinal adquirido da primeira injeção apresentava muito ruído e instabilidade no sinal e conseqüentemente a amostra injetada era perdida. Para solucionar, foi incrementado em toda seqüência de injeções, uma amostra inicial de estabilização contendo água ultrapura, algumas amostras de água durante a sequência, “rinse”, assim como, uma amostra pós-corrída com injeção de água ultrapura. Para uma melhor aquisição de sinal, as amostras também foram injetadas utilizando uma configuração mais indicada no amostrador AS-40: i) *Inj Type – Loop*; ii) *Inj Mode – Prop*; iii) *Inj/Vial – 1* .

Outro problema era a interrupção no final em algumas corridas cromatográficas provocada por uma falha na supressora, “Suppressor over-current”. A interrupção não afetava o cromatograma, pois os principais componentes já tinham sido eluidos, porém na próxima corrida era necessária a inserção de um novo *vial* contendo água ultrapura para ser injetado antes da amostra da próxima corrida (rinse). O problema foi detectado e solucionado após muitas tentativas de ajustes do código de programação do software. Foi verificado que o programa de eluição em gradiente realizava uma mudança brusca de concentração (63mM para 1mM de KOH) próximo da finalização da corrida e a supressora não acompanhava a variação. Foi calculado o tempo pelo fluxo a fim de que todo o eluente saísse e daí a supressora diminuísse a sua corrente. Com o ajuste feito na programação não foi observado interrupções nas corridas cromatográficas, ver em Apêndice F o código com a programação para análise de ânions no *software* Chromeleon.

APÊNDICE H- Determinação de sulfato por espectrofotometria – Hach DR2500

A determinação de sulfato foi avaliada a partir de padrões com concentração de 1-1000 mg L⁻¹ medidas no espectrofotômetro Hach DR2500 a 420nm, Figura 1, A faixa com maior linearidade foi obtida entre 40-200 mg L⁻¹ de sulfato, Figura 2.

Figura 1 – Valores absorbância para cada concentração de sulfato (1-1000 mg L⁻¹). Espectrofotômetro2- Hach Dr2500.

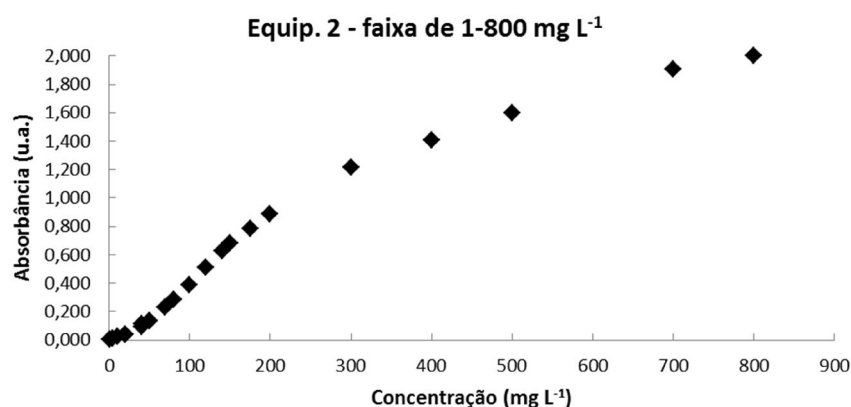
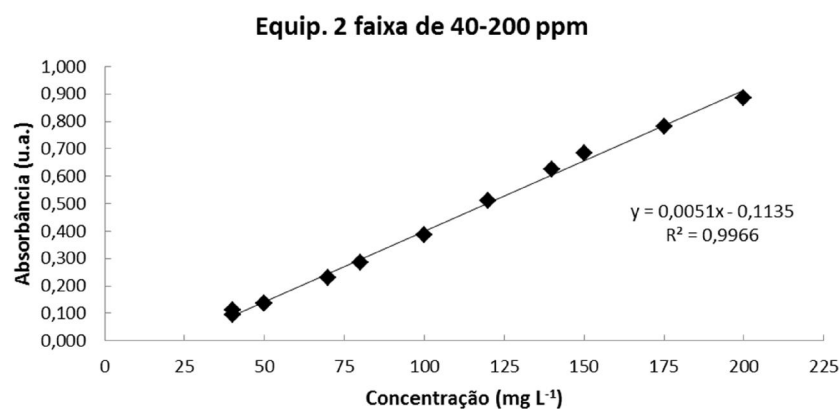


Figura 2 – Valores de absorbância para cada concentração de sulfato (40-200 mg L⁻¹) dentro da faixa linear de quantificação. Espectrofotômetro 2- Hach Dr2500.



A função da curva analítica do espectrofotômetro 2- Hach DR2500 foi $y = 0,0051x - 0,1135$ com coeficiente de correlação de 0,9966, Figura 2, sendo y = absorbância e x = concentração de sulfato em mg L⁻¹.

ANEXO A - Meio de cultura Desulfovibrio-Broth (DSMZ-63)

Microorganisms

**63. DESULFOVIBRIO MEDIUM****Solution A:**

K ₂ HPO ₄	0.5	g
NH ₄ Cl	1.0	g
Na ₂ SO ₄	1.0	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2.0	g
DL-Na-lactate	2.0	g
Yeast extract	1.0	g
Resazurin	1.0	mg
Distilled water	980.0	ml

Solution B:

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.5	g
Distilled water	10.0	ml

Solution C:

Na-thioglycolate	0.1	g
Ascorbic acid	0.1	g
Distilled water	10.0	ml

Dissolve the ingredients of each solution in the appropriate quantities of water. Bring solution A to the boil for a few minutes, then cool to room temperature while gassing with oxygen-free N₂ gas. Add solutions B and C, adjust pH to 7.8 with NaOH, and distribute under N₂ in anaerobic tubes. During distribution continuously swirl the medium to keep the grey precipitate suspended. Autoclave 15 min at 121°C.

For [DSM 12927](#) supplement medium with 10 g/l NaCl.

ANEXO B - Protocolo meio de cultura Postgate-modificado

Para o preparo do meio Postgate-modificado (CARVALHO, 2010) seguir o procedimento descrito após a Tabela 01. Separadamente preparar uma solução estoque de tioglicolato de sódio (Tabela 02).

Tabela 01 - Composição do meio de cultura Postgate-modificado

Sais e reagentes	Quantidade
NaCl	15g
KH ₂ PO ₄	0,5g
NH ₄ Cl	1,0g
Na ₂ SO ₄	1,0g
CaCl ₂	1,0g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,83g
Extrato de levedura	1,0g
Ácido ascórbico	0,1g
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ (citrato de sódio)	6,38g
Lactato de sódio	1,75mL
Solução de Resazurina 0,025% (p/v)	4mL
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Volume final	1000 mL

Fonte: CARVALHO 2010.²

Procedimento:

1. Pesar os sais e dissolver em um Becker na ordem representada na Tabela 01 com um volume mínimo de água;
2. Avolumar para 1000 mL com auxílio de uma proveta;
3. Ajustar o pH para 7,5-8,0 com as soluções de hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico;
4. Distribuir os meios de cultura (10mL) em frascos tipo penicilina, colocar as tampas de butila e cobrir com papel alumínio;
5. Os frascos de penicilina com o meio de cultura são esterilizados por autoclavação por 121°C e 1 atm, durante 15 minutos.;

² CARVALHO, A. S. Desenvolvimento e aplicação da tecnologia de exclusão biocompetitiva para controle da biossulfetogênese na indústria de petróleo. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

ANEXO B – Continuação

6. Após a esterilização, lacrar os frascos de penicilina com o alicate de recrave;
7. Armazenar a 4°C;
8. Antes da inoculação, adicionar 1ml de solução de tioglicolato (Tabela 02) com auxílio de uma seringa estéril no meio de cultura.

Tabela 02 - Solução de tioglicolato de sódio

Sais	Quantidade
Tioglicolato de sódio	0,0129 g

Procedimento:

1. Dissolver o tioglicolato de sódio em um Becker com volume mínimo de água;
2. Esterilizar a solução por autoclavação por 121°C e 1 atm, durante 15 minutos.
3. Adicionar 1ml da solução de tioglicolato para cada 10mL de meio de cultura.