



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

GUSTAVO VITAL DOS SANTOS

**O USO DE FOTOINATIVAÇÃO COMO ALTERNATIVA PARA O USO
DE BIOCIDAS E CONTROLE DE CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS
REDUTORAS DE SULFATO EM ÁGUA PRODUZIDA DE CAMPOS DE
PETRÓLEO NA BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO**

Salvador
2025

GUSTAVO VITAL DOS SANTOS

**O USO DE FOTOINATIVAÇÃO COMO ALTERNATIVA PARA O USO
DE BIOCIDAS E CONTROLE DE CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS
REDUTORAS DE SULFATO EM ÁGUA PRODUZIDA DE CAMPOS DE
PETRÓLEO NA BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Instituto de Ciências e Saúde, Universidade
Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro

Salvador
2025

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Gustavo Vital dos

O uso de fotoinativação como alternativa para o uso de biocidas e controle de consórcio de bactérias redutoras de sulfato em água produzida de campos de petróleo na bacia do recôncavo baiano / Gustavo Vital dos Santos. -- Salvador, 2025.

67 f.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2025.

1. Biotecnologia Industrial. 2. Biofotônica. 3. Microbiologia. 4. Atividade antimicrobiana. I. Barborá Pinheiro, Prof. Dr. Antonio Luiz. II. Título.

GUSTAVO VITAL DOS SANTOS

O Uso de Fotoinativação como Alternativa para o Uso de Biocidas e Controle de Consórcio de Bactérias Redutoras de Sulfato em Água Produzida de Campos de Petróleo na Bacia do Recôncavo Baiano

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 12 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA:

Antônio Luiz Barbosa Pinheiro – Orientador
Doutor em Clinical Dentistry pela University of Birmingham,
Reino Unido.
Universidade Federal da Bahia.

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO LUIZ BARBOSA PINHEIRO
Data: 13/02/2025 12:06:46-0300
Verifique em <https://validar.if.gov.br>

Landulfo Silveira Junior
Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo,
USP, Brasil.
Universidade Anhembi Morumbi.

Documento assinado digitalmente
 LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Data: 13/02/2025 16:01:23-0300
Verifique em <https://validar.if.gov.br>

Pedro Jorge Louro Crugeira
Doutor em Biotecnologia pela RENORBIO/Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil
Universidade Federal da Bahia.



A mim que sofreu e padeceu, mas nunca deixou de dar o seu melhor.

E que, um dia, espera poder viver e desfrutar da vida.

AGRADECIMENTOS

A mim que nunca deixou de ser focado, forte, orgulhoso, determinado, corajoso e resiliente e que sempre quis o melhor para si diante de tantas adversidades, azares e cicatrizes dolorosas.

A minha Avó, Dona Amélia, que me alfabetizou, cuidou, educou e ensinou a trabalhar. É minha inspiração, vontade de viver e a quem quero orgulhar com genuíno amor.

A minha irmã, Gessika, e meu sobrinho Miguel (Jabuti) aos quais eu amo, quero poder mudar de vida, dar orgulho e estar sempre ao lado. Ser o irmão e tio que merecem.

A minha tia Ninha, que me ajudou nos momentos mais delicados quando eu mais precisava de recursos; e ao meu primo Matheus (Biridin), que é o irmão que nunca tive e agora tenho, que com palavras de afirmação não deixou de acreditar em mim e com suas piadas me fazia arrancar risos, ser mais leve e esquecer um pouco dos fardos que me pesavam o sono.

Ao professor e meu orientador Antonio Pinheiro pela oportunidade de ter ingressado no mestrado, ter confiado em mim até o último momento e me incentivando a ser mais primoroso.

A Pedro Crugeira por ser uma pessoa da qual eu admiro e me ajudou durante todo o meu trabalho seja com correções, atividades no laboratório, escrita, conselhos e puxões de orelha.

A Professora Juliana Monteiro por ser sempre solícita comigo nos momentos em que me via perdido e sem saída.

A Hesrom (Bio) por ter sido meu parceiro na execução de nossos trabalhos, me acompanhado do começo ao fim nessa jornada secular de formação acadêmica e me estressando.

Aos meus colegas do Centro de Biofotônica, Anna Paula Lima, Wellington Costa e Amanda Santos. As pessoas quem mais confio e que em vários momentos estavam presentes nos experimentos e nas minhas crises de irritação, ira, ansiedade, medo e insegurança no Centro.

As Ratas do 301, Diego, Gustavo, Marcelo e Samuel que dividi um apartamento onde vivi, ri, passei momentos incríveis e que jamais vou esquecer dessa amizade criada pelo acaso da convivência universitária.

Aos meus amigos que mesmo longe estão comigo, que me cuidam, me apoiam, confiam e acreditam em mim. Sem eles não estaria onde cheguei. Amo vocês.

A pessoa que mais esteve, literalmente, ao meu lado, Douglas (Doug). Um amigo que me ajudou em tantos momentos de fragilidade e vulnerabilidade, me levava para sair, passear, ver o mundo e conversar. Obrigado pelo carinho e amizade.

À FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal da Bahia por ser uma Instituição de referência e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo comprometimento, atenção e dedicação a mim e as minhas atividades enquanto aluno.

E a todos aqueles que disseram que não iria chegar longe.

Obrigado.

DOS SANTOS, Gustavo Vital. O uso de fotoinativação como alternativa para o uso de biocidas e controle de consórcio de bactérias redutoras de sulfato em água produzida de campos de petróleo na bacia do recôncavo baiano. 2025. Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro. 67p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2025.

RESUMO

A indústria de petróleo e gás enfrenta, anualmente, perdas significativas de equipamentos e degradação da qualidade dos produtos devido à presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS), comuns em ambientes marinhos. Para mitigar esses impactos, a aplicação de biocidas é frequentemente empregada; no entanto, tais compostos podem interagir de maneira inesperada com o meio ambiente, afetar a biodiversidade, exigir aplicações contínuas — elevando os custos operacionais — e ainda promover a resistência e adaptação das BRS por meio de estresse à presença dos biocidas. Diante desse cenário, este estudo avaliou a aplicação da técnica de fotoinativação (FT) utilizando o sal duplo de cloreto de zinco de 1,9-dimetil-metileno azul (DMMB) como fotossensibilizador (FS). Foram testadas cinco diferentes concentrações de DMMB (0,050; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$) em combinação com luz Laser em exposições variadas (8,0; 10,0 12,0; 14,4 e 21,6 J/cm^2) em um consórcio de BRS, majoritariamente composto por bactérias Gram-negativas. Para o cultivo bacteriano, utilizou-se um meio de Postgate C modificado (sem sulfato ferroso), e a quantificação celular foi realizada em alíquotas de 100 μL do consórcio, analisadas em espectrofotômetro ($\lambda = 600 \text{ nm}$), sob condições de ausência de oxigênio e luz, à temperatura ambiente. As análises estatísticas incluíram ANOVA de dois fatores e ANOVA com interação, avaliando separadamente e conjuntamente os efeitos do FS e da luz Laser na eficácia da FT. Os grupos tratados exclusivamente com DMMB apresentaram redução microbiana apenas em concentrações superiores a 1,0 $\mu\text{g/mL}$, enquanto concentrações inferiores e os grupos submetidos apenas ao Laser não demonstraram efeitos significativos — não redução microbiológica. A aplicação combinada da FT resultou em atividade antimicrobiana em todos os grupos, com taxas de inibição superiores a 50% ($p < 0,05$) para concentrações de DMMB acima de 1,5 $\mu\text{g/mL}$. As análises de ANOVA indicaram que a eficácia da técnica depende significativamente da concentração de DMMB e da intensidade luminosa, com uma interação positiva entre ambos os fatores. Reduções microbianas de 70,6% (intervalo: 55,7–70,6%; média: 66,7%) foram observadas com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de DMMB e 70,1% (intervalo: 65,0–70,1%; média: 68,2%) com 2,0 $\mu\text{g/mL}$, sob uma intensidade luminosa de 21,6 J/cm^2 . Os resultados demonstram que a técnica de fotoinativação é uma alternativa promissora ao uso de biocidas na indústria de petróleo e gás, destacando-se por sua fácil aplicação, baixo potencial de indução de resistência bacteriana, segurança ambiental e compatibilidade com outras estratégias de controle populacional de BRS. Tendo um potencial de não desenvolver mecanismos de resistência bacteriana, o que estimula a formação de biofilme e dificulta o seu tratamento.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Biocidas; Laser; Fotoinativação; BRS

DOS SANTOS, Gustavo Vital. The use of photoinactivation as an alternative to biocides for controlling sulfate-reducing bacterial consortia in produced water from oil fields in the Recôncavo Basin, Brazil. 2025. Advisor: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro. 67p. Dissertation (Master's in Biotechnology) – Institute of health sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2025.

ABSTRACT

The oil and gas industry annually faces significant equipment losses and product quality degradation due to the presence of sulfate-reducing bacteria (SRB), which are common in marine environments. To mitigate these impacts, biocides are frequently employed. However, these compounds can interact unpredictably with the environment, affect biodiversity, require continuous application—thereby increasing operational costs—and promote SRB resistance and adaptation through stress induced by the biocides. In this context, this study evaluated the application of the photoinactivation technique (PI) using the double salt of zinc chloride with 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) as a photosensitizer (PS). Five different concentrations of DMMB (0.050, 0.250, 0.500, 0.750, 1.0, 1.5, and 2.0 $\mu\text{g/mL}$) were tested in combination with Laser light under varying exposures (8.0, 10.0, 12.0, 14.4, and 21.6 J/cm^2) on an SRB consortium predominantly composed of Gram-negative bacteria. For bacterial cultivation, a modified Postgate C medium (without ferrous sulfate) was used, and cell quantification was performed using 100 μL aliquots of the consortium analyzed with a spectrophotometer ($\lambda = 600$ nm) under anaerobic and light-free conditions at room temperature. Statistical analyses included two-way ANOVA and interaction ANOVA to evaluate the separate and combined effects of the PS and Laser light on PI efficacy. Groups treated exclusively with DMMB showed microbial reduction only at concentrations above 1.0 $\mu\text{g/mL}$, while lower concentrations and groups exposed solely to Laser light did not exhibit significant effects, showing no microbial reduction. The combined application of PI resulted in antimicrobial activity across all groups, with inhibition rates exceeding 50% ($p < 0.05$) for DMMB concentrations above 1.5 $\mu\text{g/mL}$. ANOVA analyses indicated that the technique's efficacy significantly depends on DMMB concentration and light intensity, with a positive interaction between these factors. Microbial reductions of 70.6% (range: 55.7–70.6%; mean: 66.7%) were observed with 1.5 $\mu\text{g/mL}$ of DMMB, and 70.1% (range: 65.0–70.1%; mean: 68.2%) with 2.0 $\mu\text{g/mL}$ under a light intensity of 21.6 J/cm^2 . The results demonstrate that the photoinactivation technique is a promising alternative to biocides in the oil and gas industry, standing out for its ease of application, low potential to induce bacterial resistance, environmental safety, and compatibility with other strategies for controlling SRB populations.

Keywords: Antimicrobial activity; Biocides; Laser; Photoinactivation; SRB

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1	Esquema do metabolismo comum do grupo das BRS	23
Figura	2	Mecanismo de fotoinativação do tipo I e tipo II.....	26
Figura	3	Curva de crescimento do consórcio em sistema de batelada	34
Figura	4	Avaliação das concentrações de DMMB para investigar a capacidade de inibição bacteriana no consórcio.....	35
Figura	5	Avaliação das densidades de energia Laser no consórcio	36
Figura	6	Redução em porcentagem do consórcio de BRS.....	37
Figura	7	Avaliação da atividade antimicrobiana da FT.....	38
Figura	8	Comparação da média geral entre os grupos FT com as três concentrações de DMMB em todas as intensidades de luz	40

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	Componentes para a produção do meio Postgate C modificado em suas respectivas quantidades e concentração em 1,000mL.....	30
Tabela	2	Parâmetros de irradiação para luz Laser.....	32
Tabela	3	Grupos de BRS testados.....	32
Tabela	4	ANOVA de dois fatores sem repetição.....	39
Tabela	5	ANOVA de dois fatores com interação.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área irradiada
Acetil-CoA	Acetilcoenzima-A
ALDH	Aldeído desidrogenase
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – Análise de variância
APS	Adenosina 5'- fosfosulfato
aSIR	Sulfito redutase assimilatória
ATP	Adenosina trifosfato
BRS	Bactéria redutora de sulfato
BTAC	Cloreto de benzil trietil amônio
CAQ	Compostos de amônia quaternário
CMI	Corrosão microbiologicamente induzida
CysZ	Proteínas transportadoras de sulfato
DBNPA	2,2-dibromo-2-cianocetamida
DMMB	Azul 1,9-dimetilmetileno
DO	Densidade óptica
dSIR	Sulfito redutase dissimilatória
ed	Exposição
EDDS	Etilenodiamina disuccinato
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
FT	Fotoinativação
GA	Glutaraldeído
H	Hidrogênio
LABEM	Laboratório de biologia e ecologia de microrganismos
Laser	<i>Ligth amplification by stimulated emission of radiation</i> – amplificação da luz por emissão estimulada por radiação

N	Nitrogênio
OAS	O-acetilserina
OASS	O-acetilserina sulfotransferase
P	Potência
PAP	3'-fosfoadenosina-5'-fosfato
PAPS	3'fosfoadenosina 5'fosfosulfato
PLP	Pirodoxial 5'-fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PPi	Pirofosfato inorgânico
ppm	Partes por milhão
rRNA	RNA ribossômico
S°	Enxofre elemental
SAT	Serina acetiltransferase
T	Tempo de irradiação
THPS	Sulfato de tetraquis(hidroximetil)fosfônio
TpI-C ₃	Tetraheme citocromo C ₃
Trx	Tioredoxina
TrxR	Tioredoxina redutase
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	12
2.0	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Bactérias redutoras de sulfato (BRS).....	14
2.2	Metabolismo e vias metabólicas.....	15
2.2.1	Oxidação do hidrogênio molecular no periplasma.....	16
2.2.2	Oxidação das fontes de carbono.....	17
2.2.3	Redução do sulfato.....	17
2.2.4	Via dissimilativa do sulfato – via APS.....	18
2.2.5	Via assimilativa do sulfato - PAPS.....	20
2.3	Biocidas.....	24
2.4	Fotoinativação.....	25
3.0	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4.0	METODOLOGIA	29
4.1	Amostras de água produzida.....	29
4.2	Consórcio bacteriano e condições de crescimento.....	29
4.3	Curva de crescimento.....	30
4.4	Procedimento Experimental.....	30
4.5	Avaliação da toxicidade do fotossensibilizador.....	31
4.6	Avaliação do efeito de exposição ao Laser.....	31
4.7	Procedimentos de fotoinativação.....	32
4.8	Análise estatística.....	33
5.0	RESULTADOS	34
5.1	Curva de crescimento do consórcio.....	34
5.2	Avaliação da interação do DMMB.....	35
5.3	Avaliação das diferentes exposições ao Laser.....	35
5.4	Efeito da fotoinativação no consórcio.....	36
5.5	ANOVA.....	38
6.0	DISCUSSÃO	41
7.0	CONCLUSÃO	52
8.0	REFERÊNCIAS	53
9.0	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	64

1.0 INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera tem prejuízos anuais com trocas de equipamentos de composição metálica devido a um processo de corrosão, bem como a acidificação dos poços. A causa das falhas dos oleodutos estão associadas às bactérias redutoras de sulfato (BRS), um grupo filogeneticamente diverso, anaeróbico e que podem ser encontradas em ambientes marinhos e de estuários (EDUOK; OHAERI; SZPUNAR, 2019; MONTES, 2015).

Devido ao seu metabolismo adaptado a condições extremas de temperatura, pressão e acidez, capacidade de oxidar fontes de carbono e sulfato. Neste processo de redução do sulfato a sulfeto de hidrogênio (H_2S), ocorre a liberação de H^+ que acidifica os poços, corrosão dos dutos ao interagirem com as superfícies metálicas liberando íons metálicos e produção de biofilme (KREMER et al., 2020; MONTES, 2015). A dissociação destes íons acarretam em corrosão microbiologicamente induzida (CMI) que é facilitada pelo sulfato presente em águas marinhas e salobras que são utilizadas nos hidrotestes e em recuperação de óleo (UNSAL et al., 2019). Sendo estas as condições ideais para o crescimento destes microrganismos. Embora a CMI só acontece quando se estabelece condições específicas que favoreçam metabolismo das BRS, podemos destacar a presença do sulfato (aceptor de elétrons); uma fonte doadora de elétrons livres (orgânica ou inorgânica); e água para gerar condição anóxica (MONTES, 2015). A sua interação com as superfícies metálicas estimula a produção de enzimas, exopolímeros, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos amoníacos, o sulfeto de hidrogênio (H_2S) e a formação de biofilme (ALMEIDA; FREIRE; RABELO, 2009). O biofilme é principalmente composto por células, polímeros extracelulares, trações de minerais inorgânicos e orgânicos, sua formação naturalmente confere proteção as tornando resistentes as condições externas que podem variar e causar obstruções e avarias nos dutos (LIU et al., 2017). Existem estratégias para o controle das BRS e CMI, podendo citar como exemplo: remoção do sulfato na água utilizada nas tubulações; aplicação de biocidas; exposição da água a irradiações de micro-ondas e ultrassom (COSTA, 2012). Enquanto aos biocidas, estes dependem de alguns fatores como célula-alvo, concentração para gerar inibição e redução de atividade microbiana, entendimento do meio que será aplicado como suas condições abióticas e bióticas, manejo, sistemas de batelada ou em dose única. Também são conhecidos por possuem a capacidade de gerar

compostos secundários que causam danos imprevisíveis ao meio ambiente e são constantemente injetados o que soma gastos a sua aplicação (MAGALHÃES, 2014).

Deste modo, surge como alternativa o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle das BRS. Em especial, a fotoinativação que é uma estratégia biomodal que combina luz, um fotossensibilizador que é ativado quando exposto a luz dentro de um espectro de absorção e oxigênio que ao interagirem obtêm-se um efeito citotóxico *in situ* gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres (VASSENA et al., 2014). Esse mecanismo induz danos às membranas lipídicas por meio da alteração da permeabilidade, oxidação de macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ou modificação das atividades metabólicas, resultando, por fim, na morte celular por um desses caminhos (HU et al., 2018; HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2018).

Como descreve Blázquez-Castro (2017), os Lasers (*Ligth amplification by stimulated emission of radiation* – amplificação da luz por emissão estimulada por radiação) são a fonte de luz adequada para a extração de radicais livres e geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Existem evidências que mostram uma correlação entre a fotoinativação e a formação de ERO, desempenhando um papel importante na mediação da oxidação de biomoléculas que induzem a morte celular (GARCIA-DIAZ; HUANG; HAMBLIN, 2016).

Diante do atual cenário em que o uso de biocidas é amplamente empregado no tratamento e controle de BRS, ainda há uma carência de estudos mais aprofundados não apenas sobre sua eficácia, mas também sobre a imprevisibilidade de suas aplicações, o estímulo à resistência microbiana, o aumento dos custos operacionais e os impactos na biodiversidade marinha. Dessa forma, a busca por uma alternativa mais sustentável, economicamente viável e que não favoreça o desenvolvimento de resistência bacteriana torna-se essencial. A fotoinativação surge como uma abordagem promissora nesse contexto, permitindo a inativação de consórcios de BRS em um ambiente controlado, mas sintrófico, que se assemelha às condições reais encontradas em poços de petróleo e gás. Utilizando de uma técnica que não promove a resistência bacteriana em várias concentrações de fotossensibilizador e intensidades de luz Laser em condições de anaerobiose e meio de cultura modificado.

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

Inicialmente as bactérias redutoras de sulfato podiam ser definidas através de sua morfologia e nutrição, redução do sulfato e outros componentes oxidados de enxofre, como um acceptor de elétrons para a dissimilação de sulfeto de hidrogênio (GIBSON, 1990). Estudos mais recentes já organizam as BRS pertencentes aos domínios Eubactéria e Archaea e que alguns gêneros e espécies podem até sobreviver em ambientes anaeróbicos facultativos com temperaturas que variam de -5°C a temperaturas superiores a 80°C , e também em faixa ideal entre 28°C a 38°C (DENG et al., 2018; PAREY et al., 2013).

Análises filogenéticas revisadas por Castro, Williams e Ogram (2000), dividem as BRS em quatro grupos a partir da análise de sequências de RNA ribossômico (rRNA), como: mesófilas Gram-negativas não formadoras de esporos; Gram-positivas formadoras de esporos; bactérias termófilas e arqueobactérias termófilas. Vale ressaltar que, os grupos descritos por Castro, Williams e Ogram descrevem características comuns em alguns filos, não sendo um fator para determinar clados. Outras análises recentes atualizaram os filos, sendo que ainda há divergências em sua árvore filogenética a depender dos mecanismos de análise, mas que é suficiente para organizar uma árvore evolutiva. Mais recentemente, de acordo com a análise feita por Marietou et al. (2018), utilizando como parâmetro a sequência de proteínas transportadoras de sulfato (CysZ), pôde organizar as BRS em sete filos, sendo eles: crenarchaeota; euryarchaeota; firmicutes; nitrospira; proteobacteria; thermodesulfobacteria e actinobacteria.

Enquanto ao metabolismo este se destaca por possuir duas vias para a redução do sulfato e é justamente esta característica que dá nome e ajuda a definir as vias metabólicas, no entanto, há pequenas diferenças nestas rotas a depender justamente do filo. Basicamente são conhecidas duas vias comuns a todos os filos, a via dissimilativa e assimilativa do sulfato, respectivamente. A primeira se dá pela característica de usar o sulfato como acceptor de elétron para a respiração, liberando no meio sulfeto de hidrogênio; ao passo que na segunda via, o sulfeto é incorporado dentro do grupo tiol da cisteína que posteriormente é usado pela bactéria (BICK et al., 2000).

Sendo esta última uma etapa importante para assimilar em seu metabolismo a produção de proteínas que são essenciais para o seu funcionamento e composição celular.

2.2 Metabolismo e vias metabólicas

De modo geral, as BRS são divididas em dois grupos por oxidar fontes de carbono, as autotróficas e heterotróficas. As autotróficas utilizam o dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono e o hidrogênio molecular (H_2) como um doador de elétrons para a redução do sulfato, enquanto as heterotróficas podem usar uma ampla variedade de outros compostos orgânicos como doadores de elétrons, podendo ser ácidos orgânicos como ácido fórmico (CH_2O_2), acético (CH_3COOH), propiônico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$), butírico ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), pirúvico ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$), láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) entre outros, além de álcoois como metanol (CH_3OH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), butanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$); e dentro das BRS heterotróficas inclui aquelas oxidantes incompletas que oxidam parcialmente compostos orgânicos a acetato (CH_3COO), e as oxidantes completas, que oxidam completamente os compostos orgânicos a CO_2 (ZHOU et al., 2022).

Ao reduzir componentes com enxofre podem acumular de forma constante íon de sulfeto (H_2S) e íons de hidrogênio dentro das células e posteriormente são liberados e promovem a acidificação do meio (SHI et al., 2020). Além disso, sob condições anaeróbicas o sulfeto pode gerar demais problemas, pois pode ser encontrado em seu estado venenoso e corrosivo (ZHOU et al., 2022) Alguns estudos mostram que em ambientes naturais as BRS possuem uma alta atividade de hidrogenases (SINGH; SINGH, 2021). Existindo assim um equilíbrio da faixa de pH no meio natural para possibilitar o crescimento de alguns grupos, pois a redução do sulfato (SO_4^{2-}) consome prótons de hidrogênio (H^+) da qual aumenta a alcalinidade do meio (SUÁREZ et al., 2020).

Geralmente preferem utilizar compostos carbônicos simples e de cadeia pequena, preferencialmente contendo dois carbonos. Priorizando assim, conseqüentemente, o lactato, ácido propiônico, butírico e acético (SHI et al., 2020). Vale ressaltar que a redução do sulfato pode ocorrer de duas formas e que irá servir de maneira diferente às BRS, sendo responsável por duas vias metabólicas que podem ocorrer ao mesmo tempo.

2.2.1 Oxidação do hidrogênio molecular no periplasma

Inicialmente, a utilização de H₂ como um doador de elétrons direto desempenha um papel central na geração de um gradiente quimiosmótico para a oxidação de moléculas orgânicas (CAFFREY et al., 2007). A chave do entendimento da utilização do oxigênio molecular se dá por uma enzima, a hidrogenase, responsável por catalisar a reação 1 (AUBERT et al., 2000):



Essa oxidação do hidrogênio ocorre no periplasma envolvendo as hidrogenases que catalisam essa reação de forma que pode ser revertida (KUSHKEVYCH, 2016). A oxidação do hidrogênio molecular junto da transferência de elétrons através da membrana citoplasmática libera dois prótons (PAREY et al., 2013). O hidrogênio desempenha um papel circular importante no equilíbrio do gradiente de concentração. Segundo Odom e Peck (1981), o mecanismo do ciclo do hidrogênio consiste em: os prótons de hidrogênio e elétrons produzidos pela oxidação do lactato e piruvato reagem com a hidrogenase citoplasmática para formar mais prótons de hidrogênio que irão se difundir entre a membrana, onde é reoxidado pela hidrogenase periplasmática para formar um gradiente de prótons. As hidrogenases desempenham um papel ativo nessa captação de prótons e há um grupo destas enzimas que são característicos das BRS. Até o dado momento foram encontrados dentro das BRS quatro tipos de hidrogenases, como: [NiFe], [FeFe], [NiFeSe] e [Fe] (KUSHKEVYCH, 2016). Nota-se que todas essas enzimas possuem um grupo composto por um metal, o que reforça a particularidade desses organismos necessitarem de metais para realizar os seus ciclos de oxidação e redução, já que os íons de metais vão compor o centro destas enzimas para captar prótons e elétrons.

O aceptor de elétrons das hidrogenases localizadas no periplasma é o tetraheme tipo I, o tetraheme citocromo C₃ (TpI-C₃), sendo responsável em transferir os elétrons para os demais citocromos multiheme associados com os complexos redox ligados à membrana (MATIAS et al., 2005). O TpI-C₃ está também relacionado a um complexo ligado a membrana celular envolvendo outras enzimas e carreadores. Esse complexo redox é altamente modular e nele também está envolvido a redução de quinonas (Qrc e Nhc) e transportadores de membrana de elétrons (Tmc e Hmc) (GREIN et al., 2013). Nas BRS há outros carreadores de hidrogênio e de elétrons que compõem a membrana periplasmática como, ferredoxinas, flavodoxinas, menaquinonas e rubredoxinas (POSTGATE, 1984). Há também a formação de moléculas de

adenosina trifosfato (ATP), onde os prótons de hidrogênio são utilizados para a formação de ATP e os elétrons vão sendo carreados através do complexo até chegarem no citocromo C onde são reduzidos. Assim causa uma redução endógena ou exógena do aceptor de elétrons em uma reação de produção de energia (GIBSON, 1990). O que dá uma vantagem metabólica nas mais diversas condições ambientais.

2.2.2 Oxidação das fontes de carbono

Há uma série de enzimas que são responsáveis pela redução das fontes de carbono e participam ativamente do processo metabólico. As principais enzimas envolvidas são a citrato sintase, aconitase, isocitrato desidrogenase dependente de NADP, 2-oxoglutarato ferredoxina oxidoreductase, succinato desidrogenase ligada à membrana celular, que se acopla a uma menadiona, fumarase e malato desidrogenase também ligada à membrana que se acopla a uma quinona (GIBSON, 1990). Enquanto que as atividades de hidrogenase acontecem principalmente no periplasma, a redução do sulfato e oxidação da fonte de carbono acontecem dentro do citoplasma celular possibilitando a passagem dos elétrons através da membrana citoplasmática até o periplasma (HEIDELBERG et al., 2004).

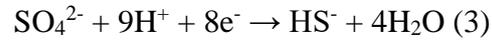
Sendo o lactato a sua fonte de carbono preferencial, sendo encontrado dentro da célula em sua forma de ânion ($2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$), é fermentado passando por uma série de enzimas resultando na produção de piruvato e conseqüente reduzido a acetato, dióxido de carbono (CO_2), prótons de hidrogênio e elétrons livres no citoplasma como descrito na reação 2 (GIBSON, 1990; HEIDELBERG, 2004). A seguinte reação está expressa abaixo (GU et al., 2019):



2.2.3 Redução do sulfato

Os compostos sulfurados desempenham um papel crucial no metabolismo e ciclo desses microrganismos. Sua redução pode levar a diversas formas de intermediários e isso inclui metabissulfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$), ditionito ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$), tritritonato ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$) e tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (GIBSON, 1990). Há controvérsias entre muitos autores sobre quais seriam estes intermediários, porém, esses são os mais comuns dada a diversidade de clados.

A redução do sulfato está representada no esquema a seguir na reação 3 (EDUOK; OHAERI; SZPUNAR, 2019):



A redução do sulfato (SO_4^{2-}), sulfito (SO_3), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e tetrionato ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) é mediado por um sistema de transporte de elétrons que é composto por desidrogenases, carreadores de elétrons e uma série de redutases (THAUER; JUNGERMANN; DECKER, 1977). Esses mecanismos de conversão de enxofre elemental (S°), bem como a redução e oxidação destes compostos inorgânicos de enxofre, são utilizados por estas bactérias em processos de conversão de energia (PAREY et al., 2013). Antes do sulfato ser reduzido é transportado para dentro da célula e ativado por uma reação catalizadora pela enzima ATP-sulfurilase, da qual transfere sulfato para a adenina monofosfato do ATP para formar a adenosina 5'- fosfosulfato (APS) e pirofosfato inorgânico (PPi), respectivamente, e esse transporte ativo é na forma de simporte eletrogênico do próprio sulfato junto de dois prótons (KUSHKEVYCH, 2016; PAREY et al., 2013). Esse transporte do sulfato para dentro da célula é catalisado pela enzima sulfato permease, permitindo que o sulfato perpassa a membrana com facilidade (KUSHKEVYCH et al., 2020).

Essa reação de redução é essencial, pois é por ela que se forma o primeiro intermediário como referido na reação 4. Como descrito por Thauer, Jungermann e Decker (1977):

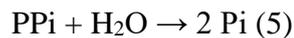


Logo após a formação do primeiro intermediário, pela redução do sulfato, as BRS podem seguir por dois caminhos para completar a redução desse composto. Essas vias metabólicas são conhecidas respectivamente como via dissimilativa e assimilativa do sulfato, respectivamente.

2.2.4 Via dissimilativa do sulfato – via APS

Na via APS os oito elétrons gerados pelo gradiente de prótons serão utilizados pelas redutases em cada etapa da redução das espécies de sulfato, sendo dois deles direcionados para a reação da APS redutase (CysH) e seis para a sulfito redutase dissimilatória (dSIR).

Inicialmente, há a redução do sulfato que entrou na célula bacteriana para a formação de adenosina 5'- fosfosulfato (APS) como descrito anteriormente. Sua formação é endergônica e isso provavelmente se dá pela hidrólise, impulsionando a reação, subsequente do pirofosfato, fazendo a redução da APS ser energeticamente favorável, podemos observar essa redução na reação 5 (THAUER; JUNGERMANN; DECKER, 1977):

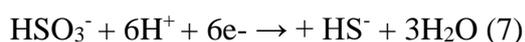


A APS é o primeiro acceptor de elétron para a cadeia de respiração, é reduzido por APS redutase para sulfito (SO_3^{2-}) e adenosina monofosfato (AMP), utilizando de dois elétrons para essa conversão, do qual o sulfito vai ser posteriormente reduzido pela dSIR, reação 6 (MATIAS et al., 2005; WÓJCIK-AUGUSTYN; JOHANSSON; BOROWSKI, 2021). A reação é descrita a seguir (THAUER; JUNGERMANN; DECKER, 1977):

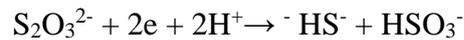
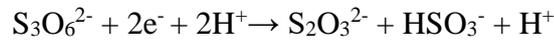
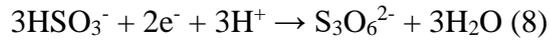


Com a redução do sulfito isso pode permitir a formação de mais intermediários como a formação de tritionato e tiosulfeto que são produtos de um de dois mecanismos que envolvem a catálise de dSIR (PAREY et al., 2013). Esses dois mecanismos de redução são respectivamente: I- a redução direta do sulfito para o sulfeto de hidrogênio por uma única enzima, a dSIR sem a formação de nenhum intermediário, uma reação monoenzimática, reação 7; II- a redução do sulfito a sulfeto é realizada por meio de três enzimas, sulfito redutase dissimilativa, tritionato redutase e tiosulfeto redutase, esse mecanismo está descrito na reação 8 (THAUER; JUNGERMANN; DECKER, 1977). Sendo o tritionato e o tiosulfeto intermediários livres. A primeira reação é conhecida como redução direta do sulfito, enquanto a segunda como via do tritionato e ambas utilizam de seis elétrons para a redução dos intermediários. O segundo mecanismo só é possível porque o cofator dSIR pode ser normalmente reduzida por dois elétrons por vez, sendo uma reação sequencial até um determinado ponto (CRANE; GETZOFF, 1996).

A dSIR catalisa a reação do sulfito para sulfeto de hidrogênio junto de um complexo de multiprótons e processos de transferência de multielétrons, reação 7 (PAREY et al., 2013). A reação de redução do sulfito a sulfeto requer a entrega de elétrons e prótons para o substrato, como mostra a reação abaixo (CRANE; GETZOFF, 1996; THAUER; JUNGERMANN; DECKER, 1977):



A segunda descrita como via do tritionato está descrita abaixo, reação 8 (THAUER; JUNGERMANN; DECKER, 1977):



Na via do tritionato a primeira reação é feita por uma sulfito redutase dissimilativa convertendo o sulfito em tritionato, a segunda é a ação da tritionato redutase formando o tiosulfato, e por último, é a tiosulfato redutase que converte o tiosulfato para sulfeto. Essa reação catalisada pela tiosulfato redutase levanta uma hipótese de que, provavelmente, a produção do sulfeto se dá pelo grupo sulfonil da porção do tiosulfato liberando, por fim, sulfeto (BRADLEY; LEAVITT; JOHNSTON, 2011).

2.2.5 Via assimilativa do sulfato - PAPS

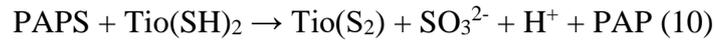
Nesta via há a formação de um intermediário importante que garante a assimilação do grupo sulfurilado em outras moléculas. Esse intermediário é a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) que vai guiar essa assimilação para biossíntese de proteína.

Inicialmente a APS é fosforilada pela enzima APS quinase (CysC), formando a PAPS como produto da reação (KUSHKEVYCH et al., 2020). A fosforilação pela APS quinase é descrita a seguir, reação 9 (SCHWENN; SCHRIEK, 1984):

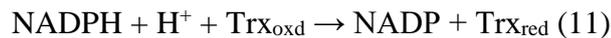


Logo depois a PAPS é reduzida para sulfito por uma tioredoxina (Trx) dependente de uma PAPS redutase (CysH), finalmente o sulfito é reduzido para sulfeto por uma sulfito redutase assimilatória (aSIR) que é também um multimérico dependente de NADPH (CysIJ), ou uma enzima dependente de ferredoxina monomérica (GREIN et al., 2013). Evidências genéticas e enzimológicas são consistentes com a hipótese de que a Trx dependente de oxidação desempenha um papel na assimilação do sulfato (BICK et al., 2000).

Na redução assimilatória do sulfato por enterobactérias a tioredoxina é usada como um doador de hidrogênio na redução da PAPS para sulfito, reação 10 (SCHWENN; SCHRIEK, 1984):



Seguindo essa reação, a PAPS que depende de uma tioredoxina redutase tem como produto o sulfito e 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP), reação 10 (WILLIAMS et al., 2002). A tioredoxina redutase (TrxR) é capaz de reduzir a forma oxidada de tioredoxina com um NADPH como fonte de redução equivalente. A ação da TrxR está expressa na reação 11 (PILLAY; HOFMEYR; ROHWER, 2011):



Desse modo, a tioredoxina é adequada para a redução do PAPS redutase que é importante na assimilação do sulfato (TOLEDANO et al., 2007). De forma geral, as atividades de oxiredutases de tioredoxina desempenha dois papéis dentro do metabolismo que são bastante conhecidos; I – como um carreador de elétron necessário para a catálise de biossíntese de enzimas, como por exemplo, as redutases de ribonucleotídeos, redutases de sulfóxido de metionina e sulfato redutases; II – ou com o papel de proteção para proteínas citosólicas de agregação ou inativação, que são formadas por via oxidativa de dissulfeto intra ou extramolecular (ARNÉR; HOLMGREN, 2000). O sulfito que foi o produto de redução da PAPS agora é reduzido por uma aSIR para sulfeto e quando essa etapa é completa, segue-se para a biossíntese de proteínas.

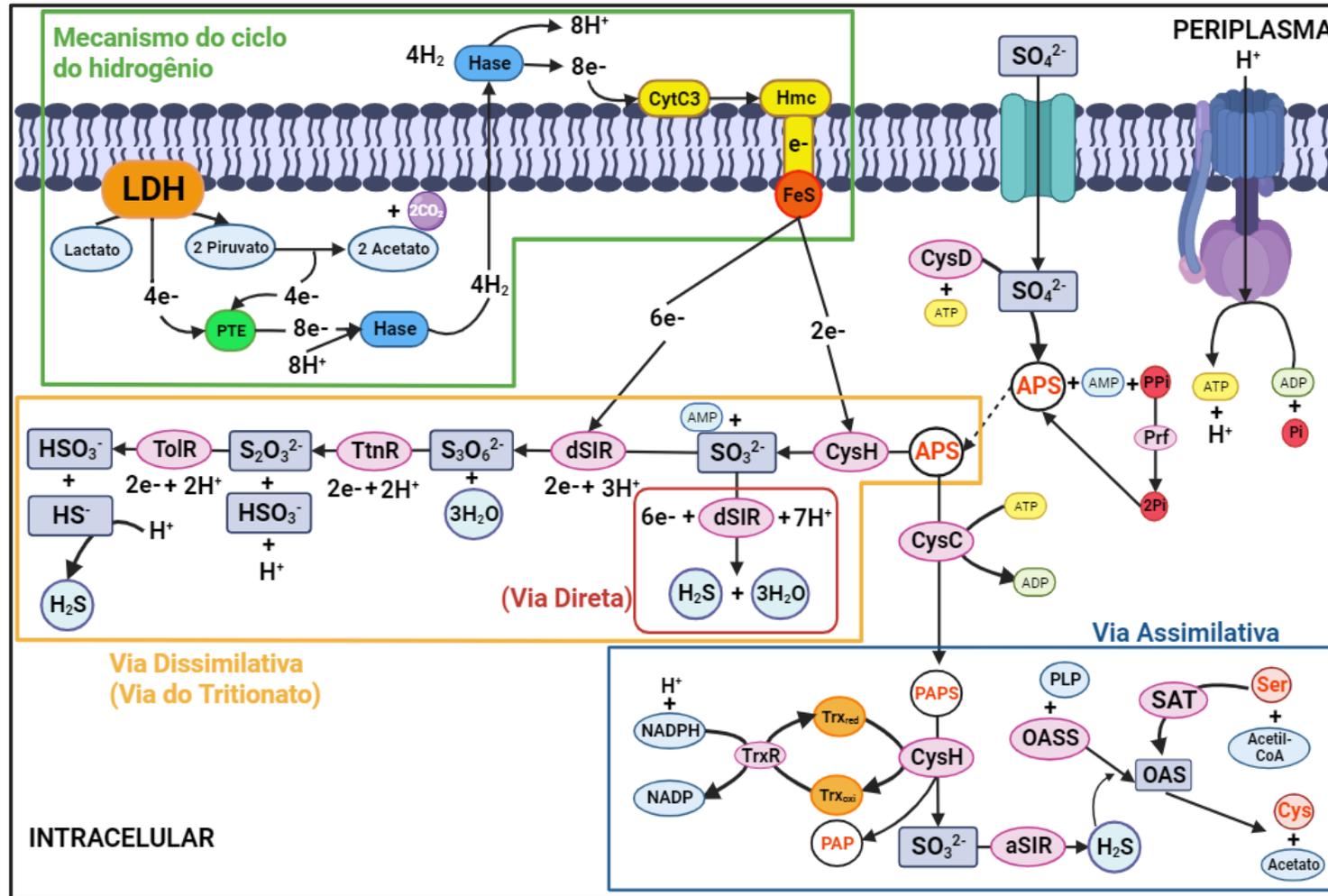
A síntese de L-cisteína a partir de sulfato inorgânico é o mecanismo dominante para a incorporação de enxofre em componentes orgânicos (KUSHKEVYCH et al., 2020). Em bactérias a síntese de cisteína é realizada pela via assimilativa do sulfato da qual reduz o sulfeto usando anteriormente a ativação de serina que sofre uma substituição de β -hidroxila com um grupo tiol (HICKS; MULLHOLLAND, 2018; RABEH; COOK, 2004). A biossíntese da cisteína acontece em dois passos junto da formação de um intermediário.

O primeiro passo consiste na acetilação da serina na presença de acetilcoenzima-A (acetil-CoA): I - essa reação é catalisada por uma serina acetiltransferase (SAT) formando a O-acetilserina (OAS) (RABEH; COOK, 2004). Sendo o OAS o primeiro e único intermediário dessa reação que será mais uma vez catalisado indo para o segundo passo: II- o sulfeto é incorporado na OAS por uma O-acetilserina sulfutransferase (OASS), essa enzima é dependente de uma pirodoxial 5'-fosfato (PLP) que é responsável por catalisar a substituição do grupo β -acetato pelo sulfeto, combinando ambos para a formação de cisteína (LILLIG et al., 1999; CAMPANINI et al., 2015; HICKS et al., 2022). Com a formação de cisteína tem-se em

conjunto a liberação de acetato, justamente pela substituição do grupo acetato pelo sulfeto do Acetil-CoA, que se fixou agora na cisteína.

Todas as etapas, mecanismos e vias descritas acima estão ilustradas abaixo na figura 1 que representa uma visualização geral do metabolismo do grupo das BRS e suas vias metabólicas:

Figura 1 – Esquema do metabolismo comum do grupo das BRS



Mecanismo do ciclo de hidrogênio proposto por ODOM; PECK, (1981), ativação do sulfato, via APS (Via do tritionato e direta), via PAPS, renovação da tioredoxina e formação da cisteína. Legenda: LDH: lactato desidrogenase; PTE: proteínas transportadoras de elétrons; Hase: hidrogenase; CytC3: citocromo C3; Hmc: complexo do citocromo; e-: canal de passagem de elétrons; FeS: flavodoxina e/ou ferredoxina; CysD: ATP sulfidilase; Prf: pirofosfatase; APS: adenosina 5'- fosfosulfato; CysH: APS/PAPS redutase; dSIR: sulfito redutase dissimilatória; TtnR: tritionato redutase; TolR: tiosulfeto redutase; CysC: APS quinase; PAPS: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato; PAP: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato; TrxR: tioredoxina redutase; Trx_{red}: tioredoxina reduzida; Trx_{oxi}: tioredoxina oxidada; aSIR: sulfito redutase assimilatória; PLP: pirodoxial 5'-fosfato; OASS: O-acetilserina sulfidrilase; OAS: O-acetilserina; SAT: serina acetiltransferase; Ser: serina; Cys: cisteína.

2.3 Biocidas

Na indústria de petróleo e gás existem vários métodos químicos e físicos para controlar microrganismos que desempenham papel antagônico na extração desse recurso. Sendo um dos seus principais focos a inibição e formação de biofilmes que é beneficiada pelas condições dos poços, dutos e ambiente. Uma estratégia convencional anti-incrustação tem sido utilizar doses de biocidas de forma contínua na água que podem agir de maneira diferente e inesperada, porém, ainda há uma falta de compreensão do modo de ação de vários destes, especialmente, quando usados em concentrações inibitórias ou muito baixas, e até mesmo em doses subletais, nas quais uma atividade bacteriostática e bactericida é almejada (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012; ORTEGA et al., 2013).

Além disso, são também dependentes da geologia e biogeoquímica do respectivo ambiente tendo que ser compatível, além do custo de eficiência, célula-alvo e objetivo da aplicação (KAHRILAS et al., 2015). Já há relatos da efetividade de biocidas contra as células planctônicas, enquanto as células sésseis, protegidas pelos polissacarídeos, estão afastadas desse efeito, sendo o biofilme um impedimento para a desinfecção dessas bactérias que acabam se tornando naturalmente resistentes, e conseqüentemente, se utiliza de mais aplicações de forma constante para dissolver os polissacarídeos e evitar a formação de novos incrustamentos (JIA et al., 2019; LAVANIA et al., 2011; ORTEGA et al., 2013).

Como as perdas econômicas na recuperação desses equipamentos representam um problema significativo para a indústria, alternativas como o uso de biocidas para controlar BRS têm sido investigadas. No entanto, além de sua eficiência reduzida, os biocidas podem deixar resíduos nocivos no meio ambiente devido à sua baixa solubilidade em água. Exemplos incluem oxazolidina e tiocarbamatos, que acumulam elementos ambientais nitrosos e sulfurosos (RASHEED et al., 2020; BAUTISTA et al., 2016). Além disso, para alcançar resultados satisfatórios, doses recorrentes são administradas a cada injeção de água nos poços, o que aumenta os custos. Ademais, doses repetidas de biocidas promovem resistência, levando a uma escalada gradual da dosagem a cada injeção de água para recuperação de petróleo (XU; GU, 2015). Existem outros desafios associados ao uso de biocidas, como regulamentações de saúde e segurança em alguns países que restringem o uso de determinados biocidas, como os compostos de amônio quaternário (CAQs) (BENNET; HOFFMANN, 2018).

A constante aplicação pode levar a efeitos que afetam o meio ambiente, a ecologia de animais aquáticos, além de problemas toxicológicos e o aumento do preço do tratamento

(NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). Os biocidas mais utilizados são os não oxidantes e oxidantes, sendo adicionados em excesso para obter um efeito almejado, e isso resulta em uma não absorção total onde outra parte permanece no sistema (YANG et al., 2023). Podem interagir com demais moléculas dispersas na água formando novos compostos, bioacumulando ou sedimentando, se tornando imprevisíveis no meio natural.

No que se refere aos oxidantes, estes são bastantes reativos, enquanto os não-oxidantes são mais seletivos e menos reativos (JONES; JOSHI, 2021). Como afirma Jenneman e De Le'on (2022), os biocidas não-oxidantes mais utilizados pela indústria petrolífera incluem os aldeídos como o glutaraldeído (GA), compostos de amônia quaternário (CAQ), cloreto de benzalcônio, cocodiaminas e sulfato de tetraquis (hidroximetil) fosfônio (THPS); os oxidantes são o hipoclorito e dióxido de cloro. Em especial os oxidantes, são usados em tratamento de água pois são mais corrosivos com interagir com o metal e não são compatíveis com alguns produtos de hidrocarbonetos, o que faz com que sejam menos utilizados em relação aos não-oxidantes que também agem como inibidores metabólicos ou agentes tensoativos (BEJARANO; HUGHES; SAUNDERS, 2022).

Em relação aos seus mecanismos de ação, eles podem interferir na replicação genética, síntese de proteínas, alterar a estrutura e função da parede celular, aumentar a permeabilidade que leva ao rompimento da membrana e inibição das vias metabólicas intermediárias (LIWA; JAKA, 2015). O conhecimento dos seus mecanismos de ação é essencial para poder estabelecer estratégias de desinfecção para reforçar a inatividade microbiana, evitando potenciais mecanismos de tolerância e efeitos toxicológicos (BARROS; MELO; PEREIRA, 2022).

2.4 Fotoinativação

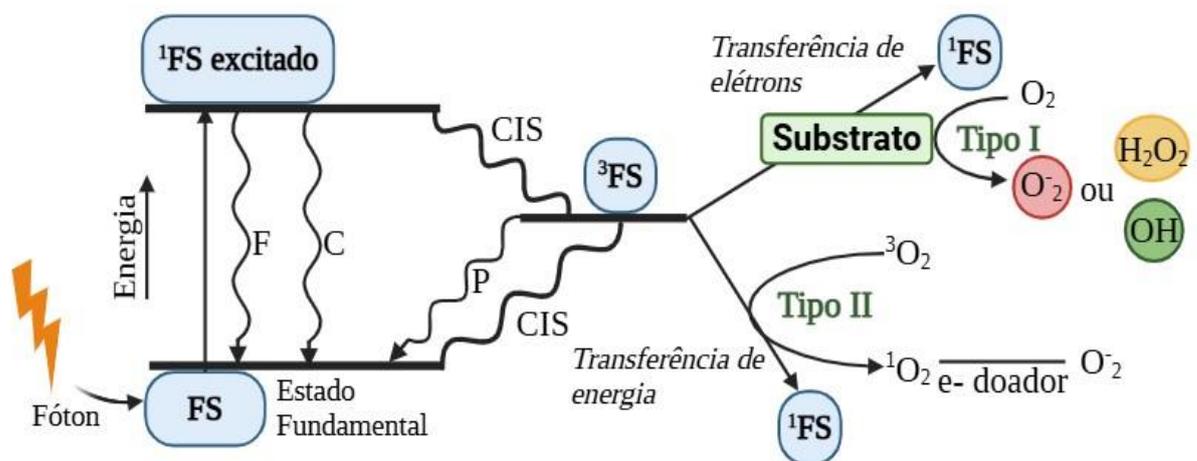
A técnica de fotoinativação é baseada na utilização de um fotossensibilizador (FS) que vai ser absorvido pela célula-alvo e que será ativado por doses de luz visível em uma determinada faixa de comprimento de onda (λ) (GARAPATI et al., 2023). Esse mecanismo leva o FS a um estado excitado conhecido como estado eletrônico singlete (HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2018). Neste estado o FS se encontra instável e perde seu excesso de energia seja na forma de emissão de luz (fluorescência) ou produção de calor (cruzamento intersistemas) (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Por essa instabilidade o spin do elétron excitado se inverte para formar um estado tripleto excitado de vida relativamente longa (CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017). Neste

estado, ao colidir com o oxigênio molecular (O_2), que é único por ser um tripleto em seu estado fundamental, se forma espécies reativas de oxigênio (ERO) (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Com uma meia vida curta de alguns nanossegundos (~ 10 -320) se difundem em 10-55 nm nas células, por isso, a citotoxicidade fica confinada ao local de ação (GARAPATI et al., 2023; DYSART; PATTERSON, 2005).

Sua formação acontece de duas maneiras, a primeira: tipo I, se dá pela transferência de elétrons para substratos biológicos, resultando na formação de radicais que reagem com o oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion superóxido (VASSENA et al., 2014). Enquanto que na segunda reação, tipo II, envolve a transferência de energia (fótons) para produzir oxigênio singlete (1O_2) (HAMBLIN, 2016). Podemos ver esses mecanismos ilustrado na figura 2:

Figura 2 – Mecanismo de fotoinativação do tipo I e tipo II



Produção de produção de radicais óxidos e espécies reativas de oxigênio. Legenda: FS: estado fundamental; 1FS : estado singleto; 3FS : estado tripleto; F: fluorescência; C: calor; P: fosforescência; CIS: cruzamento intersistemas. Fonte: SOUKOS e GOODSON, 2011 (adaptado).

A produção de espécies reativas de oxigênio e de radicais óxidos induzem a danos as membranas lipídicas atuando na alteração da permeabilidade, leva a oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos ou altera atividades metabólicas, resultando na morte celular (HU et al., 2018; HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2018; BROEKGAARDEN et al., 2015).

No entanto, a fonte de luz é essencial para garantir a interação com o FS escolhido para desencadear as cascatas de reações para a formação das ERO. Entre os FS mais utilizados os pertencentes a família dos fenotiazínicos como o azul de metileno e o azul de toluidina são priorizados. Contudo, o azul de metileno vem sendo visto como um padrão de

fotossensibilizador bioativo, dando um rendimento ideal de oxigênio singleto, absorvendo luz no comprimento de onda de 600-900 nm, sendo ideal para aplicações antimicrobianas (TARDIVO et al., 2005; WAINWRIGHT, 2005).

Em relação a fonte de luz uma das mais utilizadas dentro do espectro visível são os Lasers (*Ligth amplification by stimulated emission of radiation* – amplificação da luz por emissão estimulada por radiação), que já são reconhecidos por produzirem efeitos fotoquímicos e fotoelétricos, estes de baixa potência, a despeito do efeito térmico produzido por Lasers de alta potência que produzem calor (BRUGNERA JR.; PINHEIRO, 1998). A preferência de uso é devida por possuir características de uma energia radiante que apresenta comprimento de onda específico, coerente, colimado, monocromático e polarizado (PINHEIRO; BRUGNERA; ZANIN, 2010). Dando destaque ao de baixa potência que não induz a produção de calor o que lhe atribui qualidades terapêuticas, menos invasivas e agressivas e que garantem interagir apenas com o fotossensibilizador.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da fotoinativação sob o consórcio de bactérias redutoras de sulfato com o fotossensibilizador azul 1,9-dimetilmetileno (DMMB) em amostra de água produzida de campos de petróleo aplicando luz Laser.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o potencial inibitório do fotossensibilizador azul 1,9-dimetilmetileno (DMMB) nas concentrações de 0,050; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$;

Aplicar a fotoinativação associado a luz Laser nas doses de 8,0; 10,0; 12,0; 14,4 e 21,6 J/cm^2 junto das concentrações de DMMB.

4.0 METODOLOGIA

4.1 Amostras de água produzida

O consórcio bacteriano utilizado neste estudo faz parte da microbiota presente em água produzida coletada no campo de extração de petróleo na bacia do recôncavo baiano, que foi previamente identificada por Rosário (2014) e cedidos pelo LABEM- Laboratório de biologia e ecologia de microrganismos – Universidade Federal da Bahia (UFBA).

4.2 Consórcio bacteriano e condições de crescimento

Os espécimes criopreservados em ultrafreezer (Thermo Electron Corporation, Bartlesville, OK 74003, EUA), foram deixados em temperatura ambiente dentro da câmara de anaerobiose (Bactron VI, Shellab, Sheldon Manufacturing Inc., USA) composta por 80% de nitrogênio (N), 10% de dióxido de carbono (CO₂) e 10% de hidrogênio (H) para o descongelamento. Após o descongelamento os espécimes foram inoculados em frascos do tipo penicilina de 10mL devidamente lacrados. O enriquecimento do consórcio utilizou-se o meio Postgate C proposto por Postgate (1984), que simula as condições de anaerobiose. Na preparação do meio as substâncias foram solubilizadas em água destilada, onde as concentrações estão em porcentagem para uma escala de 1,000mL de água destilada, o pH ajustado entre 7,5 a 8,0 com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), em seguida homogeneizado com agitador esterilizado a 121 °C por 3 minutos e logo após autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

Após a inoculação das culturas, os tubos foram para a estufa bacteriológica (TE-391/1® TECNAL, Brasil) por 12 horas a 37°C. Após o período de 12 horas foi realizado o repique (10% do inóculo) em novos frascos de penicilina de 10ml contendo 9ml de meio Postgate C modificado, descrito na tabela 1. Este processo foi repetido até as bactérias crescerem o suficiente até tornar-se o meio turvo.

4.3 Curva de crescimento

O meio Postgate C em sua composição original possui o sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), que acaba sendo um indicador de crescimento tornando o meio escurecido, que dificultara a leitura das células por espectrofotometria. Dessa maneira, foi preparado um segundo meio de cultura sem a presença do sulfato ferroso, descrito na tabela 1. O crescimento celular foi realizado no período de 48h em triplicata e em sistema de batelada, com leituras realizadas a cada 3h no espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Device, California, EUA). Para as leituras o comprimento de onda foi de λ 600 nm em placas de 96 poços (Falcon®, BD Lab., Franklin Lakes, NJ, USA).

Tabela 1 – Componentes para a produção do meio Postgate C modificado em suas respectivas quantidades e concentração em 1,000mL

Componentes	Quant. (g e mL)	Concentração (%)
Cloreto de Sódio (NaCl)	15g	1,5%
Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	0,5g	0,05%
Cloreto de amônio (NH_4Cl)	1,0g	0,1%
Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	1,0g	0,1%
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	1,0g	0,1%
Cloreto de Magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,83g	0,183%
Extrato de levedura	1,0g	0,1%
Ácido ascórbico	0,1g	0,01%
Citrato de sódio	6,35g	0,638%
Lactato de sódio	1,75mL	0,175%
Resazurina 0,025% (p/v)	4mL	0,4%
Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)*	0,5g	0,05%
Tioglicolato de sódio	0,129g	0,013%

* Item retirado para a preparação do meio Postgate C (Modificado).

4.4 Procedimento Experimental

Todos os procedimentos da FT foram realizados sob condições assépticas em uma câmara anaeróbica (Bactron VI®, Shellab, Sheldon Manufacturing Inc., EUA), sem exposição

à luz ambiente, à temperatura ambiente (23°C) e sem umidade. A atmosfera da câmara era composta por 80% de nitrogênio (N), 10% de dióxido de carbono (CO₂) e 10% de hidrogênio (H). Em cada etapa do experimento, alíquotas de 100µL da suspensão foram adicionadas aos poços de placas de 96 poços (Falcon®, BD Lab., Franklin Lakes, NJ, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e analisados em um espectrofotômetro (SpectraMax 190®, Molecular Device, Califórnia, EUA) a 600 nm como padrão de densidade óptica (DO) em BRS para determinar a quantidade celular em correlação com a absorbância (XIAOJIA, 2020).

4.5 Avaliação da toxicidade do fotossensibilizador

O fotossensibilizador (FS) usado foi o azul 1,9-dimetilmetileno (DMMB) (Sigma—Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com teor de corante em forma de pó de 80% com absorbância de λ máxima de 649 nm, possuindo uma massa molar de 347,905 g/mol. A massa do DMMB foi determinada em uma balança analítica, em seguida diluída em água destilada e filtrado com o auxílio de uma seringa e de um filtro com membrana de 0.22µm (Kasvi, Pará - Brasil). Para avaliar a inibição microbiana a cultura foi exposta a concentrações de 0,050; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL.

4.6 Avaliação do efeito de exposição ao Laser

A fonte de luz utilizada foi um Laser (TF Premier Plus®, MMO Optics, São Paulo-Brasil, 660 nm, feixe de 3 mm², 100 mW). A aplicação foi realizada por varredura, utilizando a equação 1 para determinar a exposição (BAGNATO, 2008):

$$ed \text{ (J/cm}^2\text{)} = \frac{P \text{ (W)} \times T \text{ (s)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}} \quad \text{Eq.1,}$$

onde ed é a exposição; P é a potência; T o tempo de irradiação; e A é a área irradiada.

A irradiação foi realizada em um ângulo de 90° em ambiente anaeróbico, sem luz ambiente, à temperatura ambiente (23°C), e livre de umidade na câmara anaeróbica. A temperatura e a umidade foram controladas e monitoradas durante os experimentos. A intensidade descrita após a realização da equação 1 está descrita na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de irradiação para luz Laser

Exposição	Tempo/minutos
8,0 J/cm ²	6,5
10,0 J/cm ²	8,1
12,0 J/cm ²	9,8
14,4 J/cm ²	11,7
21,6 J/cm ²	17,6

4.7 Procedimentos de fotoinativação

Para a realização da fotoinativação adicionou-se o DMMB nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL, respectivamente. As demais concentrações descritas anteriormente não foram utilizadas, justificativa realizada nos resultados. Houve um tempo de pré-incubação no escuro e em temperatura ambiente de cinco minutos para o FS ser absorvido pelas células. Os grupos testados foram descritos abaixo na tabela 3.

Aliquotas de 100µL da suspensão foram adicionadas em cada poço nas placas de 96 poços (Falcon®, BD Lab., Franklin Lakes, NJ, EUA) e analisadas no espectrofotômetro em triplicata (SpectraMax® 190, Molecular Device, California, EUA) em λ 600 nm.

Tabela 3 – Grupos de BRS testados

Grupos	Concentrações/Densidade
Controle	
Grupo Laser	8,0; 10,0; 12,0; 14,4 e 21,6 J/cm ²
Grupo DMMB	0,050; 0,250; 0,500; 0,750; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL
Grupo fotoinativação (FT)	8,0 J/cm ² com 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL de DMMB 10,0 J/cm ² com 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL de DMMB 12,0 J/cm ² com 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL de DMMB 14,4 J/cm ² com 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL de DMMB 21,6 J/cm ² com 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL de DMMB

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos por meio da densidade óptica (DO_{600}) foram convertidos em células/mL utilizando a escala de McFarland (1907). A equação desenvolvida por Edington e colaboradores (1971) foi utilizada para calcular o percentual de inibição alcançado no experimento. As análises multivariadas foram realizadas utilizando duas análises dos grupos por ANOVA (*Analysis of Variance* – Análise de Variância), ANOVA de dois fatores sem repetição e ANOVA de dois fatores com interação, comparações múltiplas pelo teste de Tukey, todas conduzidas no software GraphPad Prism® (San Diego-CA, EUA). Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

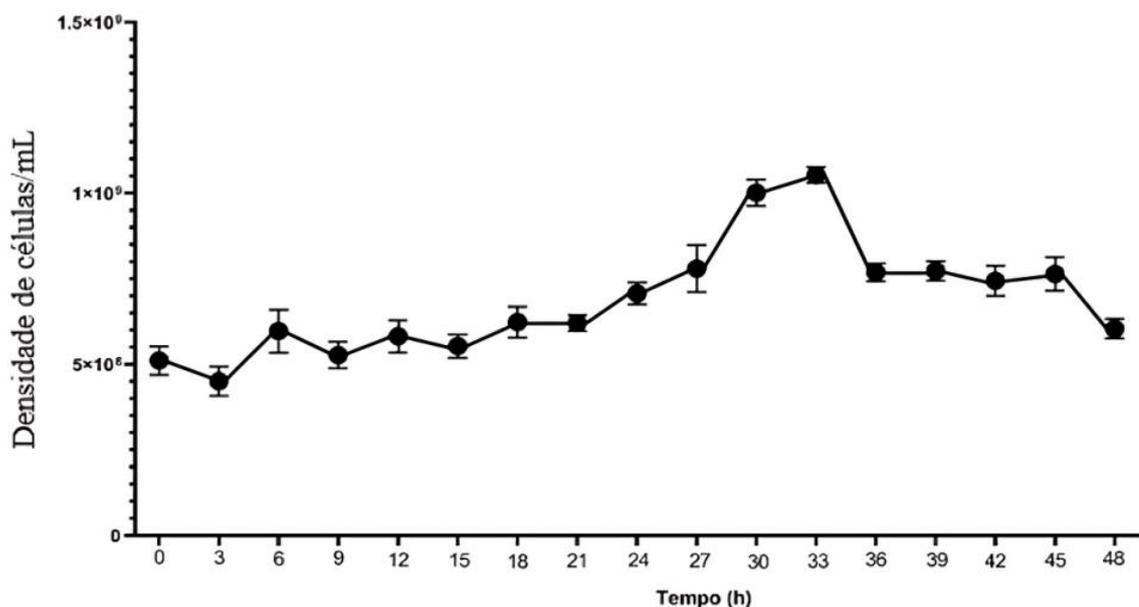
5.0 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento do consórcio

A curva de crescimento descreve a densidade das populações de células em cultura de cultivo ao longo do tempo e foram obtidas medindo a densidade óptica (DO) do consórcio bacteriano.

Foi observado que não existe um crescimento exponencial homogêneo, pois a cada ponto de leitura ocorre uma flutuação nos resultados. No experimento, observa-se na figura 3 que a taxa de crescimento se inicia após 21h de incubação, chegando ao equilíbrio de 30h a 33h e logo após tem um decréscimo abrupto do número de células presentes no consórcio.

Figura 3 - Curva de crescimento do consórcio em sistema de batelada

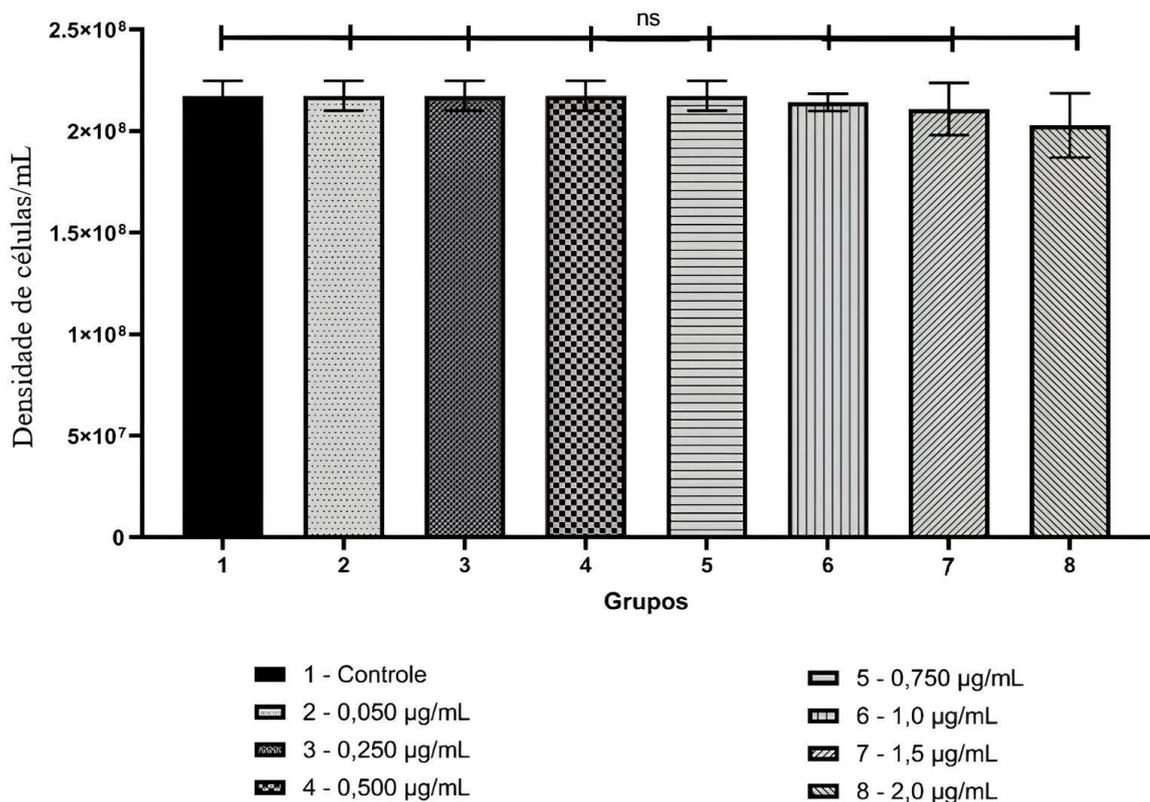


A queda de células permaneceu por mais 12h em equilíbrio gradual. Essa queda moderada por uma parcela de tempo se deve a disputa por recurso pela pouca disponibilidade de nutrientes disponíveis no meio do consórcio.

5.2 Avaliação da interação do DMMB

Os resultados obtidos indicaram que o uso do DMMB não apresenta redução microbiana significativa quando comparado com o grupo controle nas concentrações menores que 1,0 $\mu\text{g/mL}$ como descritos na figura 4, mostraram não sendo capazes de sozinhas causarem inativação celular. Entretanto, as concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma redução microbiana de 2,8; 3,7 e 9,7%, respectivamente. Por esta razão, as últimas três concentrações que mostraram estatisticamente algum nível de redução microbiana foram utilizadas no experimento, mas em nenhuma delas foi significativa a redução.

Figura 4 - Avaliação das concentrações de DMMB para investigar a capacidade de inibição bacteriana no consórcio



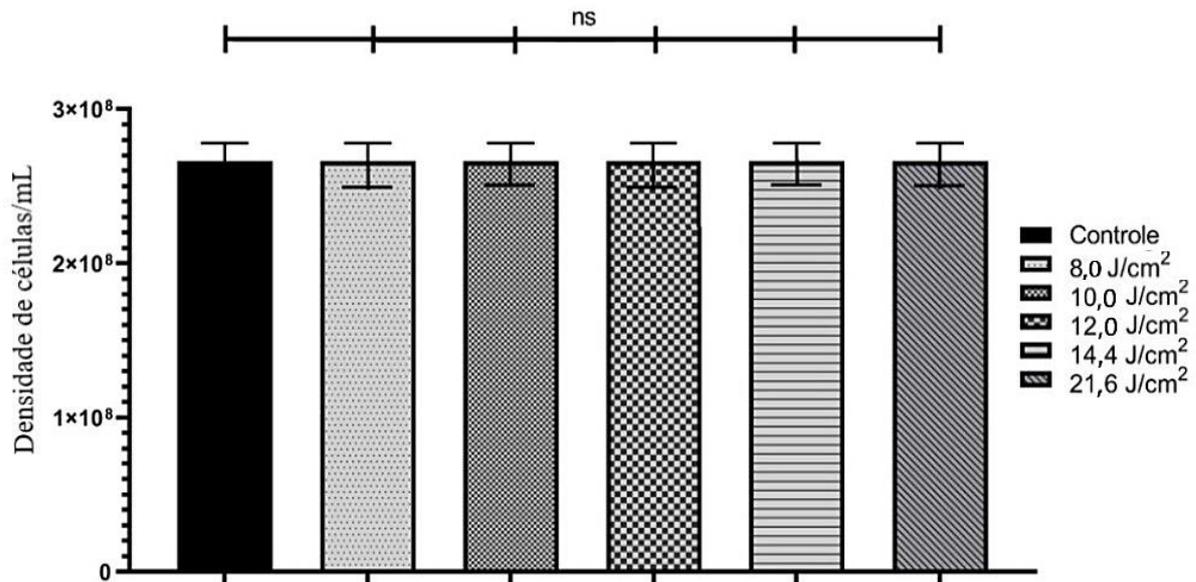
Legenda: ns: não significativa.

5.3 Avaliação das diferentes exposições ao Laser

As densidades de energia avaliadas de 8,0; 10,0; 12,0; 14,4 e 21,6 J/cm^2 , mostraram que não houve inativação microbiológica significativa quando comparadas ao grupo controle como

descrito na figura 5. Os resultados mostraram que sozinha a luz não pode reduzir a população de bactérias no consórcio, reforçando a necessidade da molécula de FS.

Figura 5 - Avaliação das densidades de energia Laser no consórcio



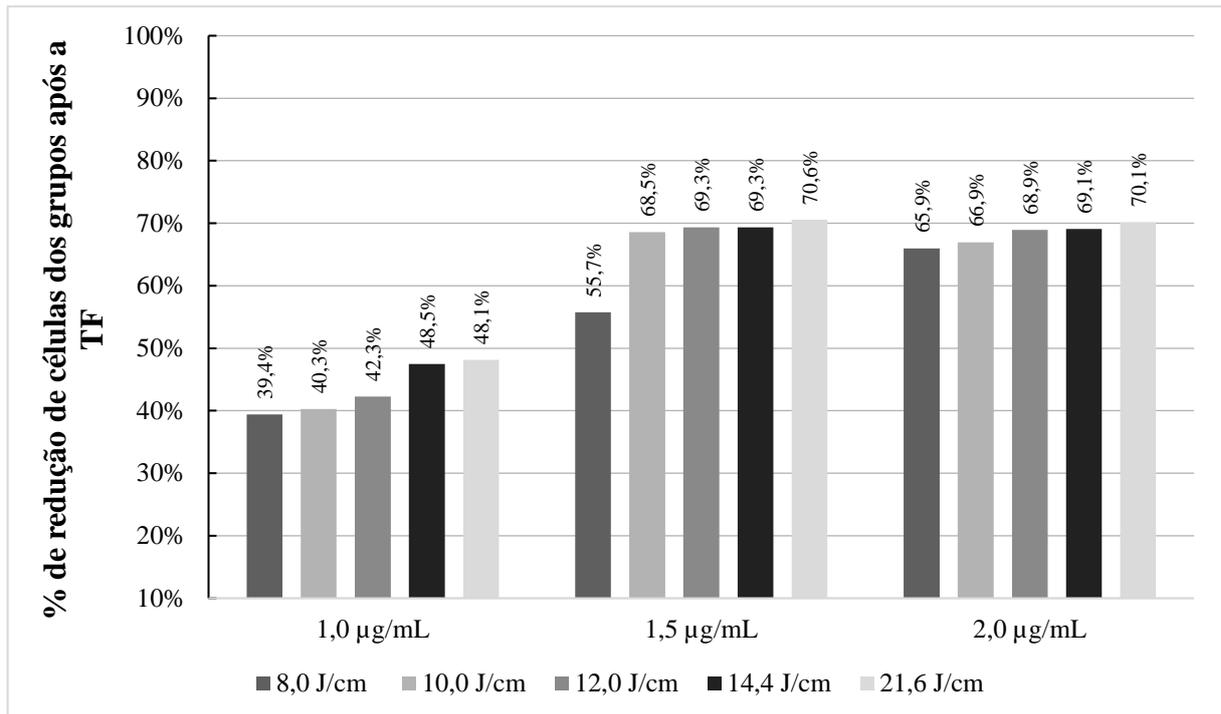
Legenda: ns: não significante.

5.4 Efeito da fotoinativação no consórcio

A avaliação dos grupos de fotoinativação (FT) foram descritas em porcentagem na figura 6, com a utilização de 1,0 µg/mL de DMMB verificou-se uma redução microbiana entre 39,4 a 48,1% (com uma média de 43,5%) quando comparados ao controle. Já com a concentração de 1,5 µg/mL de DMMB a redução microbiana variou de 55,7 a 70,6% (média de 66,7%). Enquanto que ao utilizar 2,0 µg/mL de DMMB, a inativação microbiana variou de 65,9 a 70,1% (com média de 68,2%) em relação ao grupo controle.

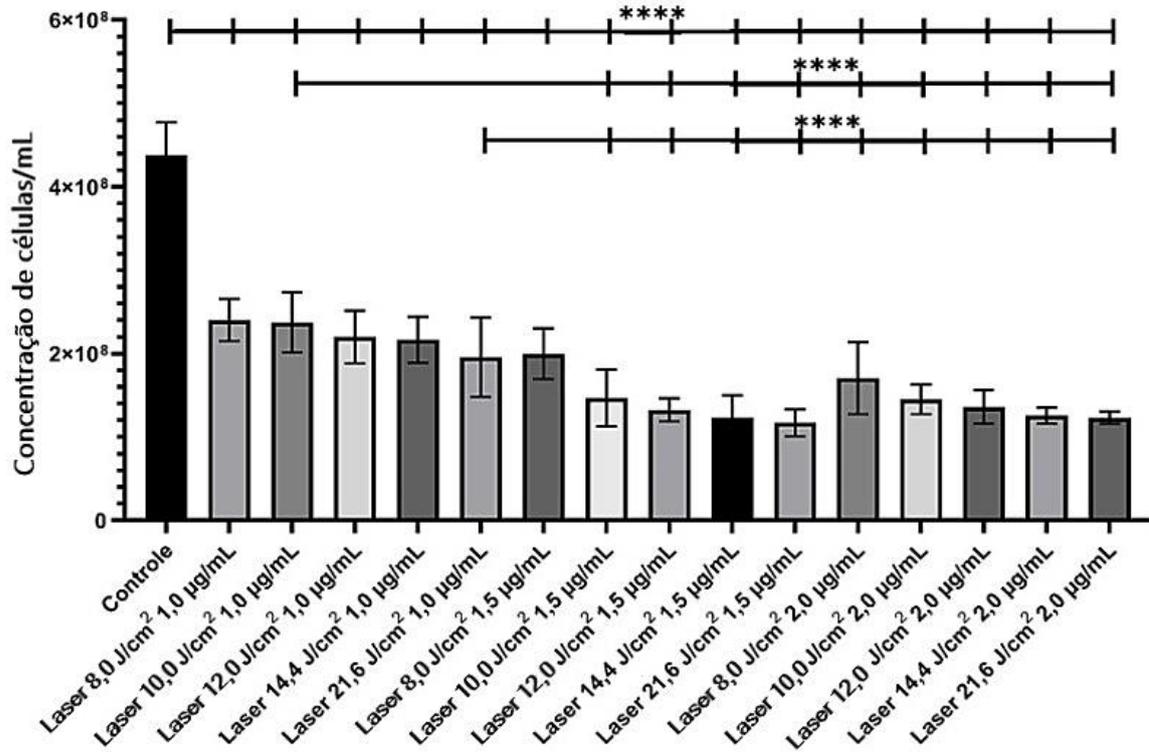
Ao fazer um comparativo com os demais grupos de fotoinativação (FT) (figura 6) em porcentagem de redução, observa-se uma significativa inativação microbiana para todas as TF observadas.

Figura 6 – Redução em porcentagem do consórcio de BRS



A análise do efeito do TF nos grupos testados mostrou que concentrações inferiores a 1,0 µg/mL de FS não foram tão eficazes quando comparadas ao grupo controle e aos grupos com concentrações superiores a 1,0 µg/mL. Os valores considerados para a análise correspondem a $p < 0,05$ (****) presentes em todos os grupos comparados ao controle. Enquanto que na concentração de 1,0 µg/mL de FS os valores variaram em comparação com os outros dois grupos, nas concentrações de 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL de FS houve pouca variação como descritos na figura 7. Assim, podemos destacar que a melhor concentração é $\geq 1,5$ µg/mL em todas as densidades de luz utilizadas nestes testes, promovendo uma redução de mais de 50% da população do consórcio.

Figura 7 - Avaliação da atividade antimicrobiana da FT



Os valores **** possuem significância de ($p < 0,05$).

A concentração de 1,0 µg/mL de DMMB difere significativamente das concentrações de 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL ($p < 0,05$) usadas na FT. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as concentrações de 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL, pois ambos os grupos exibiram efeitos antimicrobianos semelhantes.

5.5 ANOVA

Para analisar a variável resposta de ambos os fatores, FS e intensidade de luz, de forma independente na redução microbiana do consórcio, foi utilizada uma ANOVA de dois fatores sem repetição, Tabela 4, onde os dados significativos são indicados por $p < 0,05$ para o FT.

Tabela 4 - ANOVA de dois fatores sem repetição

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p-Valor	F Crítico
Luz Laser (Intensidade)	6,10E+15	4	1,52E+15	1,15E+01	0,002101	3,84E+00
FS (concentrações)	2,13E+16	2	1,06E+16	8,07E+01	4,98E-06	4,46E+00
Residual	1,06E+15	8	1,32E+14			
Total	2,85E+16	14				

Ação da luz Laser em todas as suas intensidades e do fotossensibilizador (FS) DMMB em todas as concentrações avaliados de forma independente no consórcio.

A referida tabela 4 apresenta a variação entre a luz Laser e as concentrações de FS em relação à redução microbiana, com os valores de F e p-valor indicando a significância dos efeitos, atingindo um valor menor que 0,05, o que é estatisticamente significativo refletindo em um resultado onde quanto maior a intensidade e concentração maior o efeito. Onde cada fator foi avaliado de forma isolada independente do outro.

Para avaliar se há uma interação entre o aumento de ambas as variáveis na redução antimicrobiana utilizando a FT, foi realizada uma ANOVA de dois fatores com interação descrita na Tabela 5, onde os dados significativos são indicados por $p < 0,05$.

Tabela 5 - ANOVA de dois fatores com interação

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p-Valor	F Crítico
Intensidade (I)	4,24E+17	4	1,06E+17	4,03E+29	2,67E-260	2,93
Concentração (C)	7,11E+16	2	3,55E+16	1,35E+29	2,55E-254	3,55
Interações (I*C)	2,12E+18	8	2,65E+17	1,01E+30	2,95E-265	2,51
Residual	4,73E-12	18	2,63E-13			
Total	2,615E+18	32				

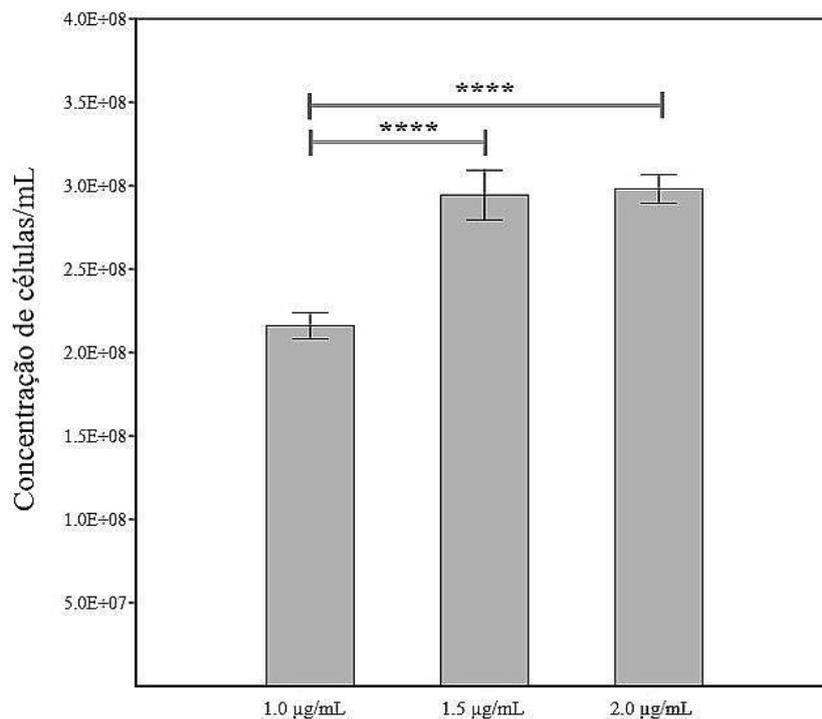
Ação da luz Laser em todas as suas intensidades e do fotossensibilizador (FS) DMMB em todas as concentrações avaliados em conjunto em função da redução de células em detrimento de seu aumento de concentrações e intensidade, respectivamente para avaliar justamente a capacidade da redução de ambos os fatores.

Essa tabela apresenta os resultados da ANOVA de dois fatores com interação, evidenciando a significância da interação entre a intensidade da luz (I) e as concentrações de FS (C) na redução antimicrobiana. Os valores de F e p-valor indicam que tanto as variáveis isoladas quanto sua interação têm efeitos significativos no resultado, contribuindo assim na redução de células ao interagirem no consórcio.

Para determinar se há uma diferença significativa no número de células reduzidas no consórcio ao utilizar diferentes concentrações de DMMB, os grupos de FS foram comparados

e a significância estatística foi avaliada com $p < 0,05$. A concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ difere significativamente das concentrações de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) usadas na FT. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as concentrações de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, já que ambas exibiram efeitos antimicrobianos semelhantes como ilustrado na figura 8.

Figura 8 - Comparação da média geral entre os grupos FT com as três concentrações de DMMB em todas as intensidades de luz



Os valores **** possuem significância de ($p < 0,05$).

Em termos de redução da contagem celular por mL, as concentrações de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram resultados promissores e esperados, já que concentrações mais altas tendem a resultar em maiores reduções sendo ambas pertinentes para o estudo.

6.0 DISCUSSÃO

Uma das técnicas mais comuns para o controle de populações de BRS são biocidas, possuindo um alto custo, por requerer uma adição contínua de biocidas e, conseqüentemente, acabam afetando a biodiversidade, pois muito dos biocidas precipitam e formam compostos ao interagirem com outras moléculas presentes no meio. O uso de biocidas pode também carecer de semanas e meses para se ter um resultado satisfatório e manter o controle de células constante. Tendo em vista estas problemáticas, há a questão dos gastos que a indústria de petróleo e gás tem com a troca constante de seus dutos e equipamentos devido ao *souring*, que é favorecido pelas condições de pressão, nutrientes, pH e microrganismos presentes nos poços. Como proposta de hipótese, este trabalho busca utilizar o fotossensibilizador DMMB associado a luz Laser em consórcio de BRS para avaliar o potencial de redução microbiana através da técnica de fotoinativação.

Em sistemas de fluxo, como na indústria do petróleo, a adição de biocidas não elimina os microrganismos, podendo até aumentar sua proliferação com cada adição de água (JIA et al., 2019). Geralmente, são necessárias altas dosagens de biocidas em campos de petróleo e gás para tratar biofilmes; isso ocorre devido aos diversos mecanismos de defesa das BRS (KAHRILAS et al., 2015). As defesas naturais desse grupo de bactérias são impactadas pela disponibilidade de nutrientes, pelo fluxo de fluidos e por algumas substâncias tóxicas, como biocidas, que podem induzir estresse celular. Esse estresse resulta em um mecanismo de proteção morfológica, fazendo com que o grupo celular em uma superfície forme biofilme (JENNEMAN; DE LEON, 2022).

Um fator importante para avaliar o decréscimo de bactérias, é entender a sua curva de crescimento e condições positivas para a sua multiplicação. A curva de crescimento do consórcio demonstrou um comportamento que não é comum em culturas isoladas, porém esperado em culturas mistas. Não foi possível definir a fase lag e exponencial com precisão, no entanto, podemos supor que a fase exponencial teve seu início após 6h de leitura que durou até as 30h. Se tratando de um consórcio, Tonini e colaboradores (2010), ressaltam que a complementaridade metabólica é essencial para entender a degradação de fontes de carbono e como esses microrganismos acabam por produzir metabólitos para outras células. O que explica

a oscilação das leituras, que variavam a depender da disponibilidade de alguns recursos para certos grupos que podiam desfavorecer outros.

Das espécies mais comuns de BRS podemos destacar o *Desulfobulbus* spp. que é um oxidante incompleto capaz de reduzir o sulfato a sulfeto produzindo acetato usando lactato, etanol, ácido pirúvico e até mesmo ácidos graxos (SOROKIN et al., 2012). Outros gêneros também fazem parte do mesmo grupo como *Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio* que também são capazes de oxidar uma ampla variedade de espécies inorgânicas de enxofre (SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S) (GRIGORYAN et al., 2018). Como o acetato pode ser o subproduto de outras bactérias, uma espécie que utiliza esse mesmo composto para redução de sulfato é a *Desulfobacter* spp., que além de possuir esse comportamento, também reduz o lactato a acetato e CO_2 que pode ser essencial para o crescimento de *Desulfovibrio baarsii* que é capaz de utilizar o CO_2 como fonte de carbono (GIBSON, 1990).

Esse comportamento é notado na curva de crescimento que na fase estacionária permaneceu por apenas 3h e logo entrou em fase de decaimento. Durante a fase exponencial, que durou 24h, houve multiplicação celular e ao consumir os nutrientes se mantiveram por pouco tempo em equilíbrio, pois todas conseguiram os recursos que precisavam e estavam disponíveis e no momento em que esse mesmo recurso acabou, houve um decréscimo das populações. A redução da fonte primária de lactato e a disponibilidade de novos subprodutos como CO_2 , acetato e compostos de enxofre ainda poderiam ser utilizados por outros grupos o que leva a inferir uma queda lenta no decaimento e que por um tempo se mantém contante, denotando que há uma renovação e reutilização dos recursos disponíveis por outras bactérias.

A combinação entre diversas espécies de bactérias é de extrema importância porque os processos metabólicos são performados e variam de acordo com os outros tipos presente no consórcio (ILHAN-SUNGUR et al., 2017). E isso influencia nos estudos acerca do sintrofismo e pode dar pistas do modelo de estudo ao que acontece no ambiente não controlável, aproximando a técnica à realidade.

Inicialmente, ao utilizar somente o DMMB obteve-se um resultado de 2,8; 3,7 e 9,7% de redução microbiana com as respectivas concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Para se alcançar o efeito esperado da fotoinativação a absorção do FS é importante pois a interação com a membrana celular garante a sua entrada na célula. O DMMB por ser um corante catiônico lipofílico, interage se ligando ao ácido teicóico, que é abundante na parede celular de bactérias Gram-positivas, além disso, sua parede porosa permite muito mais difusão do corante para o interior da célula (PAL; GOSH; GOSH, 1990; MINNOCK et al., 2000).

No entanto, em relação as bactérias Gram-negativas a carga positiva do FS promove uma interação eletrostática com locais carregados negativamente em sua membrana celular externa, especialmente no grupo de lipopolissacarídeos (MAISCH, 2009). Como a formação de biofilme nas BRS envolve o processo de CMI e a interação com metais que desempenham papel em seu metabolismo, alguns estudos sugerem que metais pesados geralmente acabam competindo com íons dispersos, gerados pela CMI, e neste caso os metais começam a interagir com íons essenciais presente nas estruturas celulares. Este mecanismo bloqueia alguns grupos funcionais de macromoléculas, causando danos para a integridade das enzimas celulares (BARBOSA et al., 2014).

Isto teoricamente permitiria uma melhor absorção do FS para dentro das células, uma vez que o DMMB é composto por zinco, assim, permitindo uma melhor interação do FS com a superfície celular seja em células Gram-positivas ou Gram-negativas. Acarretando, em teoria, uma melhor permeabilidade do FS que estaria interagindo com os íons da membrana celular. E por fim, a hipótese de que essa potencialização depende da ligação do corante com as bactérias ganha um suporte adicional quando se considera a características de lipossolubilidade dos corantes, em especial o DMMB (KASIMOVA, 2014). Os resultados de redução obtidos podem refletir nessa interação do FS com o consórcio que possui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que quanto maior sua concentração mais será a interação com a superfície da membrana o que pode competir com íons, fontes de carbono e metais inclusive.

Em relação a absorção de DMMB em Gram podemos citar o trabalho realizado por Kasimova et al., (2014), que utilizou seis tipos de corantes em culturas de *Staphylococcus aureus* 8325-4 e *Escherichia coli* K-12. Entre estes corantes estava o DMMB e realizaram o estudo em células lavadas e não lavadas para entender o potencial de absorção dos corantes pelas células. A carga negativa das bactérias Gram-negativas facilita a sua ligação com corantes catiônicos mais fortemente do que as Gram-positivas, embora a ligação em geral seja maior com as Gram-positivas porque a sua parede porosa permite muito mais difusão do corante para seu interior (HANCOCK et al., 1991; NIKAIDO, 2003). A hipótese de que essa potencialização depende da ligação do corante com a bactérias ganha um suporte adicional quando se considera a características de lipossolubilidade dos corantes, em especial o DMMB (KASIMOVA, 2014).

Nos sistemas de fluxo, como os encontrado na indústria de petróleo, a adição de biocidas não elimina os microrganismos por aumentar a proliferação com cada adição de água (JIA et al., 2019). Usualmente, altas dosagens de biocidas são requeridas nos campos de petróleo e gás para o tratamento de BRS, isso é devido aos vários mecanismos de defesa das próprias células que acabam desenvolvendo durante a formação de seu biofilme (KAHRILAS et al., 2015). A

defesa natural das BRS é impactada pela disponibilidade de nutrientes, sistema de fluido e até mesmo a algumas substâncias tóxicas, como os próprios biocidas, que tem a capacidade de induzir o estresse celular, resultando em um mecanismo de proteção morfológico, fazendo um grupo de células na superfície metálica formar uma camada de biofilme (JENNEMAN; DE LEON, 2022).

Outros trabalhos já demonstraram a resistência para a aplicação de biocidas e que as células remanescentes no biofilme podem resistir a concentrações 500~5000 vezes maior que a concentração requerida pelas células planctônicas (LITTLE; LEE, 2009; COSTERTON et al., 1994). Os biocidas mais comuns para o tratamento de água produzida são o glutaraldeído (GA), 2,2-dibromo-2-cianocetamida (DBNPA), sulfato de tetraquis (hidroximetil) fosfônio (THPS), e compostos conhecidos como cloreto de benzalcônio (JENNEMAN; DE LEON, 2022).

Estudos realizados por Lavania et al. (2011), utilizando de urina de vaca para o controle de *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas* chegou a uma redução significativa, porém requereu cerca de 90 dias de adição de urina nas culturas. Os autores também compararam com outros quatro biocidas químicos como sulfato de tetraquis (hidroximetil) fosfônio (THPS), cloreto de benzil trietil amônio (BTAC), glutaraldeído e formaldeído para o controle de BRS. Os autores alcançaram o resultado de 3×10^2 de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL quando comparado com o grupo controle de 7×10^6 UFC/mL, utilizando urina de vaca como uma alternativa aos demais biocidas utilizados no estudo. As concentrações de cada biocida e de urina de vaca adicionada nos tubos foram de 10, 20, 50, 70, 100 e 200 mg/L.

Em ciclos de renovação para o tratamento com mais biocidas podemos destacar o THPS, GA e formaldeído, que são os mais comuns utilizados em sistemas de petróleo e gás. O THPS em altas concentrações aumenta a disponibilidade de sulfato, que ajuda no metabolismo destas bactérias e na formação de sulfetos de bário, por isso podem reforçar as camadas de biofilmes (XU et al., 2017). Também, é inadequado em sistemas com um pH >8, pois o THPS pode se comportar como um quelante de Fe^{2+} , reduzindo o efeito do biocida, que necessita de doses maiores em sistemas onde há também concentrações de FeS (MOISEEV; JAMES, 2020). A disponibilidade de FeS^+ dissolvido no meio interage com o biocida, reduzindo a taxa de absorção pelas células-alvo. Além disso, em longo prazo, o THPS é menos eficiente em eliminar a população de células em água produzida, como o mecanismo de ação é rápido e não duradouro (SILVA et al., 2021). Nessa perspectiva, sempre é requerido a sua adição mesmo na ausência de FeS^+ .

Por isso que GA e THPS são requeridos em concentrações acima de 500 mg/L para exercer um efeito bacteriostático em consórcios de água produzida (PEREIRA; PILZ-JUNIOR;

CORÇÃO, 2021). A respeito do uso de GA, os estudos realizados por Pereira et al (2014) mostraram que este biocida é moderadamente tóxico para organismos aquáticos em uma faixa de 3,6 mg/L a 31,3 mg/L para a espécie testada, o zebra-fish (*Danio rerio*). No mesmo estudo mostrou indícios de que os microcrustáceos são tão sensíveis quando há concentrações menores que 3,6 mg/L de GA.

Enquanto isso, em *Escherichia coli*, a tolerância para GA aumenta devido a super expressão de aldeído desidrogenase (ALDH), genes envolvidos na biossíntese de lipídeos quando expostos para este biocida, que por ventura, contribui para a resistência do biofilme (PEREIRA; SALIM; TAGKOPOULOS, 2021; VIKRAM; BOMBERGER; BIBBY, 2015). Devido a complexidade do meio ambiente e do metabolismo destas células, prever o seu comportamento total no controle das populações em ambiente naturais é um desafio. A formação de biofilme permanece com uma limitação significativa e um foco para os tratamentos atuais. Além disso, a viabilidade de microrganismos não é sempre afetada pela exposição a biocidas, pois estes interagem com os componentes extracelulares e do meio ambiente de diversas formas (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Avaliando a habilidade do GA de inibir o crescimento celular, uma dose de 50 partes por milhão (ppm) foi necessário para atrasar o desenvolvimento de células planctônicas em meio Postgate C por 143h (GARDNER; STWART, 2002). Por outro lado, a combinação de GA (30 ppm) e etilenodiamina disuccinato (EDDS) (2000 ppm) atrasou a fase estacionária das BRS por 212h. Em contraste, o GA sozinho (30 ppm) é inefetivo, perdendo a habilidade de inibir o crescimento de células sésseis no quinto dia em sistemas de batelada (WEN et al., 2009).

Aplicando a técnica de fotoinativação com DDMB, como o fotossensibilizador, demandou apenas cerca de 17,6 minutos para inativar mais da metade (70,6%) da população microbiana, a quantidade de FS utilizado é menor que alguns biocidas utilizados em outros estudos. A ação da FT depende de muitos fatores para alcançar os resultados esperados, bem como a interação entre os diferentes microrganismos e o fotossensibilizador, sua concentração e a classe de microrganismos, se são bactérias (Gram-positivas ou Gram-negativas), fungos, ou até mesmo vírus. Para esta técnica, o parâmetro crítico de interação inclui a relativa solubilidade em água e lipídeos do FS, a ionização constante e as características de absorção de luz, e a eficiência da formação do estado tripleto excitado e produção de oxigênio singleto (HUANG et al., 2012). O uso de uma fonte de luz e um fotossensibilizador tem sido uma técnica alternativa para erradicar microrganismos multirresistentes, e os pesquisadores estão focando em compostos relacionados a efetividade de fotossensibilizadores que sejam fáceis de gerenciar e agir (MESQUITA et al., 2018).

Em superfícies metálicas, o metabolismo das BRS permite que estes metais dissolvam e permaneçam no meio ambiente, corroendo as superfícies os liberando, gerando a CMI. Nesse sentido, as BRS podem usar os elétrons dos metais em sua cadeia de elétrons para reduzir o sulfato. Quando a superfície perde íons de metal há uma interação entre as superfícies da camada extracelular, uma vez que os íons metálicos não podem difundir-se facilmente nas BRS (GU et al., 2019). Alguns estudos mostram que os metais pesados geralmente acabam competindo e são substituídos por íons essenciais usados pelas estruturas das células. Este mecanismo bloqueia alguns grupos funcionais de macromoléculas, causando danos na integridade de enzimas celulares (BARBOSA et al., 2014). Isso permite um melhor entendimento da absorção do FS para dentro das células, isso porque o DMMB é composto por zinco, deste modo permitindo uma melhor interação do FS com a superfície da membrana. Desta maneira, essa interação pode permitir a entrada na célula e, no entanto, a fotoinativação poderia ocorrer quando a luz é aplicada, considerando que a cadeia de citocromo fornece elétrons para a reduzir íons de metal (HEIDELBERG et al., 2004). Tendo dois grupos metil em sua molécula, significa que o DMMB é retido na célula por mais tempo que outros corantes da mesma família, o qual aumenta sua participação na fotoinativação. Esta ligação mostra uma especificidade com o ácido teicóico na membrana bacteriana, há também uma característica hidrofóbica que permite uma melhor interação, preferindo se infundir dentro da célula e resultando na metilação cromofórica (WAINWRIGHT et al., 1999; WAINWRIGHT et al., 1997).

O consórcio foi previamente identificado por Rosário (2014), que sequenciou a cultura de BRS e obteve o resultado de dez amostras, uma de *Desulfovibrio dechloracetivorans*, duas de *D. alaskensis*, duas foram identificadas como *Thermovirga lienii*, e cinco não foram identificadas, somado a isso há a bactéria de referência *D. vulgaris*. O gênero *Desulfovibrio* é conhecido por ser composto de células com motilidade, não formadoras de esporos, Gram-negativa, e ao mesmo tempo, *T. lienii* é uma célula móvel, Gram-negativa isolada em um reservatório no Mar do Norte (ZHOU et al., 2024; DAHLE; BIRKELAND, 2006). Por usar um consórcio de bactérias Gram-negativas, a solubilidade do FS foi esperada para dentro das células, também pela sua capacidade natural do fotossensibilizador em interagir com a membrana ou por sua capacidade hidrofóbica já que o meio líquido utilizado simulava água produzida. Quando excitado, ele pode gerar o oxigênio singlete tendo um tempo de vida em água de aproximadamente de 4 μ s, cobrindo uma distância de difusão de \sim 220nm, e este mecanismo reflete em uma ação instantânea (CHEN; CESARIO; RENTZEPIS, 2010; REDMOND; KOCHEVAR, 2006). Este tempo de difusão e distância são necessários para a

produção de oxigênio singlete e para a sua reação molecular para interagir com o alvo, a membrana celular.

O uso de FS em meio líquido mostrou interagir com o consórcio (fig. 4) em altas concentrações dentro dos parâmetros deste estudo. Por outro lado, em concentrações abaixo de 1,0 µg/mL, o FS não mostrou capacidade para reduzir a população no consórcio. Nesse contexto, o aumento da concentração de fotossensibilizador correspondeu a uma maior redução na população bacteriana, mesmo sem exposição à luz, ampliando o efeito de redução apenas pelo FS. Isso demonstra que a redução celular é um mecanismo que reflete a absorção do FS, conforme observadas reduções de 2,8%; 3,7% e 9,7% nas concentrações de FS de 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL, respectivamente. Enquanto que nas concentrações menores que 1,0 µg/mL não se apresentou redução microbiana durante o experimento, refletindo em uma pequena ou inexistente interação do FS com as células dispersas no meio (fig. 4).

Quanto à aplicação isolada da luz do Laser, não foi observada redução na população de BRS (Fig. 5), indicando que a luz no espectro vermelho não possui capacidade bactericida. Assim, o principal mecanismo para controle da população do consórcio reside nas concentrações de DMMB, com a luz servindo para potencializar o efeito via FT. O Laser é utilizada devido às suas propriedades únicas, incluindo monocromaticidade, propagação de feixe paralelo, intensidade espacial estreita e coerência (CIEPLIK et al., 2018). Essas características permitem que o feixe de luz seja direcionado com precisão ao seu alvo, seja para células dispersas no meio ou células em forma de biofilme.

Neste estudo ao aplicar a técnica de fotoinativação, foi observado que a taxa de inativação microbiana ocorreu em todos os grupos FT, especialmente naqueles grupos que foram inoculados com a concentração igual ou maior que 1,5 µg/mL de DMMB em todas as densidades de luz. Reduzindo mais de 50% das células presentes no meio. O modelo experimental usado no consórcio alcançou uma redução microbiana de 70,6% ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle, usando 1,5 µg/mL de DMMB com a intensidade de luz de 21,6 J/cm².

No modelo de ANOVA de dois fatores sem repetição utilizado para avaliar a redução antimicrobiana do FS e do Laser na FT, constatou-se que todas as combinações de intensidades de luz e concentrações de DMMB resultaram em uma taxa de redução significativa ($p < 0,05$). É conhecido que a metilação do azul de metileno para formar o DMMB aumenta a sua capacidade fotodinâmica, isso porque aumenta a lipofilicidade, que é essencial para incorporação extracelular, que varia dependente tanto da linhagem celular e da estrutura do

fármaco e apresenta maior rendimento quântico de oxigênio singlete e fototoxicidade (SAMPAIO et al., 2019).

Os biocidas concentram-se majoritariamente no tratamento de células sésseis, o que pode levar dias e horas para controlar e reduzir as camadas de biofilme. E muitos trabalhos realizados buscam entender como que cada um interage de forma individual no meio ao qual foram aplicados. O que não demonstra um uso mais amplo e diverso sobre possíveis interações seja com outros biocidas, outras técnicas ou com fatores bióticos e abióticos nos poços. Alguns trabalhos utilizando uma tripla concentração de GA (50 ppm), EDDS (1000 ppm) e metanol (15%), sobre um período de nove dias, os autores foram capazes de remover inteiramente a camada de células sésseis sobre a superfície de aço de carbono (C108) de forma isolada e controlada (WEN et al., 2012). Para avaliar a redução de biofilme de *D. vulgaris* (ATCC 7757), a combinação de THPS (50 ppm) foi aplicado em células sésseis (10^6 cells cm^{-2}) junto de D-tirosina (1ppm). Depois de sete dias, a presença de *D. vulgaris* não foi detectada, enquanto que o THPS sozinho (50 ppm) não foi efetivo (10^4 cells cm^{-2}) (XU; LI; GU, 2012). Combinando THPS (30 ppm), EDDS (500 ppm) e 6,6 ppm de uma mistura de D-aminoácidos em células sésseis (10^7 cells cm^{-2}), foram capazes de reduzir pela metade a camada de biofilme (10^3 cells cm^{-2}) em um período de sete dias (XU et al., 2012).

Alguns estudos têm como objetivo controlar populações isoladas ou múltiplas de BRS, mas enfrentam dificuldades em alcançar reduções significativas em todas as concentrações propostas em suas investigações. No entanto, o TF mostra-se eficaz ao atingir uma redução superior a 50% nos grupos de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando todas as intensidades de luz. Isso é evidente na análise de ANOVA de dois fatores com interação (tabela 5), que demonstra uma interação significativa entre os fatores aplicados no estudo. Os valores de p foram muito próximos de zero, com interações significativas observadas entre as intensidades de luz ($p < 2,67\text{E}-260$), entre as concentrações de FS ($p < 2,55\text{E}-254$) e na interação entre ambos os fatores ($p < 2,95\text{E}-265$) no FT deste estudo.

Os resultados refletem uma interação direta entre o aumento da intensidade da luz e a concentração de FS para alcançar maior atividade antimicrobiana (Fig. 8). Os efeitos dessas variáveis são dependentes entre si, exibindo um comportamento mais exponencial do que aditivo. Isso permite uma seleção mais ampla de FS e luz para a aplicação do FT, e este modelo experimental pode ser adaptado de forma eficaz para outros contextos experimentais.

No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos para as concentrações de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 8). Apesar disso, ambas as concentrações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparadas à concentração de 1,0

$\mu\text{g/mL}$ de DMMB. Considerando a relação entre as concentrações de fotossensibilizador e as intensidades de luz, é esperado que concentrações mais altas de DMMB resultem em maiores efeitos antimicrobianos.

Além disso, existem diversos erros comuns no uso e na seleção de biocidas, incluindo a ausência de testes laboratoriais e de campo, a escolha da primeira opção disponível — muitas vezes a mais barata — ou a seleção de biocidas baseada em acordos contratuais com fornecedores, restrições orçamentárias ou exigências legais impostas por agências reguladoras (BENNET, 2017). Um biocida mal selecionado pode causar danos significativos e prejuízos à indústria, além de impactos ambientais negativos.

De acordo com vários estudos, a maioria dos biocidas apresenta um efeito rápido e, para que esse efeito seja permanente, são necessárias injeções em sistemas em batelada e meses de aplicações para evitar o crescimento de células sésseis e planctônicas. Essas aplicações constantes de biocidas podem contribuir para o desenvolvimento de resistência natural nas BRS, seguindo o mesmo mecanismo observado no uso de medicamentos farmacêuticos em bactérias de importância médica. No entanto, segundo uma revisão feita por Kashef et al. (2017) e, mais recentemente, por Rapacka et al. (2021), o método de fotoinativação utiliza mecanismos de ação distintos, que são não seletivos, multialvos e dependentes de ERO. Devido a essas características, a resistência bacteriana é altamente improvável.

O FS inicialmente atua sobre as moléculas extracelulares das bactérias, potencialmente destruindo suas estruturas, particularmente a membrana citoplasmática em bactérias Gram-positivas e as membranas citoplasmática e externa em bactérias Gram-negativas, levando a lise celular ou à desativação de enzimas (LI et al., 2019). Esse tipo de interação pode induzir um acúmulo de FS dentro da célula, o que pode causar toxicidade e morte celular Rapacka et al. (2021).

Esse efeito citotóxico foi observado quando a FT foi aplicada apenas em concentrações superiores a $1,0 \mu\text{g/mL}$, onde até mesmo concentrações isoladas demonstraram atividade antimicrobiana. Embora a redução não tenha excedido 10%, já foi evidenciado um efeito inibitório inicial. Esse acúmulo externo pode levar a três mecanismos bem conhecidos: (I) ação externa, (II) interação intracelular (autopromovida) e (III) transporte ativo, todos eficazes tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (ALVES et al., 2014).

Assim, podemos observar que mesmo em concentrações inferiores a $1,0 \mu\text{g/mL}$ a atividade antimicrobiana ainda pode ocorrer, pois um fator importante é a produção de ERO. Tanto o oxigênio singlete quanto as espécies reativas de oxigênio podem causar danos às células bacterianas Kashef et al. (2017). Isso não depende necessariamente de absorção, exigindo

apenas a interação com moléculas extracelulares bacterianas e a excitação por uma fonte de luz, que induzirá os efeitos fotoquímicos esperados da FT.

Pode-se questionar como a fotoinativação, que requer a formação de ERO, pode ocorrer se as amostras foram irradiadas em condições anaeróbicas. Quando um fotossensibilizador (FS) absorve energia luminosa, ele transita para um estado excitado, no qual pode interagir com moléculas do ambiente e gerar ERO independentemente do O₂ molecular. Esse processo pode ser resumido da seguinte forma: (FS) + Luz → (¹FS*) ou (³FS*) como ilustrado na figura 2. Nesse estado excitado, o fotossensibilizador pode participar de reações de oxidação ou redução (RETTIG; MCCORMICK, 2021).

Existem dois caminhos principais para a geração de ERO. Nas reações do Tipo I, ilustrado pela figura 2, ocorre transferência de elétrons para substratos biológicos, resultando na formação de radicais que reagem com o oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânions superóxido (O₂^{•-}) e radicais hidroxila ([•]OH) (VASSENA et al., 2014). Nas reações do Tipo II, a transferência de energia (fótons) produz oxigênio singleto (¹O₂) (HAMBLIN, 2016).

Concentrações definidas de espécies reativas, como H₂O₂, O₂^{•-} e [•]OH, determinam diversas respostas celulares. Essas respostas podem levar à indução, redução ou inibição do crescimento, bem como à ativação de mecanismos relacionados à tolerância, aclimatação ou defesa contra o estresse ambiental (SZECHYŃSKA-HEBDA et al., 2022). Sabe-se que bactérias anaeróbicas não são uniformemente sensíveis ao oxigênio, já que aeração incidental frequentemente ocorre em vários habitats (GLIŃSKI; STĘPNIEWSKI et al., 2018). Em anaeróbios facultativos, o oxigênio molecular pode prejudicar o metabolismo de diversas maneiras: neutralizando diretamente enzimas baseadas em radicais, oxidando centros metálicos enzimáticos de baixo potencial e desencadeando a formação rápida de O₂^{•-} e H₂O₂ (SEN; IMLAY, 2021).

A técnica de fotoinativação vai interagir com as biomoléculas da célula, assim causando algum desequilíbrio e conseqüentemente sua lise. As modificações com o maior impacto biológico são aquelas que afetam os grupos laterais dos aminoácidos e os que mais são suscetíveis a oxidação são: cisteína, metionina, fenilalanina, tirosina, histidina e triptofano (KLOTZ; KRÖNCKE; SIES, 2003). Em particular, o grupo tiol de resíduos de cisteína são altamente sensíveis a oxidação da qual deve criticamente perturbar a homeostase da célula, e a tioredoxina é a chave que envolve a regulação proteica da cisteína e seu processo de redução (CEJUDO et al., 2014). Então nota-se que os aminoácidos contendo enxofre tem uma maior reatividade a ERO (¹O₂), dando indícios de uma interação entre a técnica e as bactérias, interferindo, de alguma forma, no metabolismo da cisteína. Como sabemos, a cisteína é a peça

final do metabolismo assimilativo das BRS, sendo que também precisa da redução de uma tioredoxina para a sua formação. O que sugere uma possibilidade da ação da ERO no consórcio bacteriano reduzindo a população se tornando assim um alvo para a fotoinativação.

No momento de aplicação da luz visível, o FS dentro da célula reagiria na presença da luz, uma ação *in situ*, na região do citocromo impossibilitando que a célula continue a perpassar e manter o gradiente de prótons de hidrogênio e elétrons que são essenciais para a redução da fonte de carbono e redução dos compostos sulfurados. Além da destruição desse componente celular, as espécies reativas de oxigênio interagem com o grupo tiol dos aminoácidos, por exemplo, que são bastante sensíveis a oxidação. Sendo a cisteína o produto final da assimilação do sulfato, sua redução possibilitaria morte celular por mecanismos secundários devido a ausência desse recurso-chave em seu metabolismo.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a fotoinativação (FT) é um método eficaz para o tratamento do consórcio de BRS em todas as concentrações de fotossensibilizador (FS) e intensidades de luz testadas. O uso de luz Laser isoladamente não apresentou efeitos antimicrobianos. No entanto, quando as concentrações de DMMB excederam 1,0 µg/mL, foi observada uma leve redução na população microbiana. Com a aplicação da fotoinativação em todos os grupos experimentais, a atividade antimicrobiana foi evidente, alcançando uma redução mínima de 39,39% em comparação ao controle.

Notavelmente, em grupos com concentrações de DMMB superiores a 1,5 µg/mL, as reduções superaram 50%, com reduções de 70,6% e 70,1% observadas após 17,6 minutos utilizando 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL de DMMB, respectivamente, em um consórcio composto predominantemente por células planctônicas Gram-negativas. Além disso, a interação entre concentrações mais altas de FS e intensidades de luz aumentou significativamente o efeito da FT no consórcio, embora ambos os fatores também tenham contribuído de forma independente para uma maior taxa de atividade antimicrobiana.

A fotoinativação apresenta vantagens especiais por depender da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres para alcançar seus efeitos fototóxicos, um mecanismo que não induz resistência bacteriana e interage imediatamente com a célula alvo. Isso torna a FT uma alternativa promissora para o manejo de populações de BRS, pois não somente promove mecanismos de resistência, mas também é uma alternativa ambientalmente segura para ecossistemas aquáticos. Além disso, a FT pode ser integrada a outros métodos estabelecidos para mitigar os desafios ambientais e econômicos associados à indústria de óleo e gás. Além disso, deve-se pensar em como alocar a técnica nos sistemas, pensar em tecnologias e maneiras de aplicação que possam garantir o efeito esperado, possibilitando pesquisas e investigações futuras fomentando mais o desenvolvimento e aprimoramento da técnica em micro e macro escala.

8.0 REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **The Biochemical journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- ALMEIDA, E. S. C.; FREIRE, M. G. M.; RABELO, S. K. L. Avaliação dos efeitos da presença de bactérias redutoras de sulfato em linhas de produção de petróleo na bacia de campos. **PerspectivasOnLine**, v. 3, n. 10, p. 199-133, 2009.
- ALVES, E.; FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G.; CUNHA, A.; TOME, J.; ALMEIDA, A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n 2, p 141-64, 2014.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6102–6109, 2000.
- AUBERT, C.; BRUGNA, M.; DOLLA, A.; BRUSCHI, M.; GIUDICI-ORTICONI, M. T. A sequential electron transfer from hydrogenases to cytochromes in sulfate-reducing bacteria. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1476, n. 1, p. 85–92, 2000.
- BARBOSA, L. P.; COSTA, P. F.; BERTOLINO, S. M.; SILVA, J. C. C. D.; GUERRA-SÁ, R.; LEÃO, V. A.; TEIXEIRA, M. C. Nickel, manganese and copper removal by a mixed consortium of sulfate reducing bacteria at a high COD/sulfate ratio. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2171–2180, 2014.
- BARROS, A. C.; MELO, L. F.; PEREIRA, A. A Multi-Purpose Approach to the Mechanisms of Action of Two Biocides (Benzalkonium Chloride and Dibromonitripropionamide): Discussion of *Pseudomonas fluorescens*' Viability and Death. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 842414, 2022.
- BAUTISTA, L. F.; VARGAS, C.; GONZÁLEZ, N.; MOLINA, M. C.; SIMARRO, R.; SALMERÓN, A.; MURILLO, Y. Assessment of biocides and ultrasound treatment to avoid bacterial growth in diesel fuel. **Fuel Processing Technology**, v. 152, p. 56-63, 2016.
- BAGNATO, V. S. **Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde**. São Paulo: LF Editorial, 2008.
- BEJARANO, A. C.; HUGHES, S. A.; SAUNDERS, D. Hazard assessment of chemical constituents in biocide formulations used in offshore oil and gas operations. **Marine pollution bulletin**, v. 183, p. 114076, 2022.
- BENNET, D. Oilfield microbiology: effective evaluation of biocide chemicals. In: SPE/IATMI ASIA PACIFIC OIL & GAS CONFERENCE AND EXHIBITION, 2017. Proceedings [...]. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2118/186950-MS>. Acesso em: [30.10.2024].

BENNET, D.; HOFFMANN, H. Oilfield microbiology: molecular microbiology techniques used during a biocide evaluation. In: OFFSHORE TECHNOLOGY CONFERENCE ASIA, 2018, Kuala Lumpur, Malaysia. March 20–23, 2018.

BICK, J. A.; DENNIS, J. J.; ZYLSTRA, G. J.; NOWACK, J.; LEUSTEK, T. Identification of a new class of 5'-adenylylsulfate (APS) reductases from sulfate-assimilating bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 1, p. 135–142, 2000.

BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Direct $^1\text{O}_2$ optical excitation: A tool for redox biology. **Redox biology**, v. 13, p. 39–59, 2017.

BRADLEY, A. S.; LEAVITT, W. D.; JOHNSTON, D. T. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway: Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. **Geobiology**, v. 9, n. 5, p. 446–457, 2011.

BROEKGAARDEN, M.; WEIJER, R.; VAN GULIK, T. M.; HAMBLIN, M. R.; HEGER, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. **Cancer metastasis reviews**, v. 34, n. 4, p. 643–690, 2015.

BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo; Editora Pancast, p. 356, 1998.

CAFFREY, S. M.; PARK, H. S.; VOORDOUW, J. K.; HE, Z.; ZHOU, J.; VOORDOUW, G. Function of Periplasmic Hydrogenases in the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 17, p. 6159–6167, 2007.

CAMPANINI, B.; BENONI, R.; BETTATI, S.; BECK, C. M.; HAYES, C. S.; MOZZARELLI, A. Moonlighting O-acetylserine sulfhydrylase: New functions for an old protein. **Biochimica et biophysica Acta-Proteins and proteomics**, v. 1854, n. 9, p. 1184–1193, 2015.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 2000.

CEJUDO, F. J.; MEYER, A. J.; REICHHELD, J. P.; ROUTHIER, N.; TRAVERSO, J. A. Thiol-based redox homeostasis and signaling. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. 266, p. 1–3, 2014.

CHEN, J.; CESARIO, T. C.; RENTZEPIS, P. M. Time resolved spectroscopic studies of methylene blue and phenothiazine derivatives used for bacteria inactivation. **Chemical Physics Letters**, v. 498, n. 1–3, p. 81–85, 2010.

CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic therapy: Past, present and future. **Chemical Record**, v. 17, n. 8, p. 775–802, 2017.

CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1–19, 2018.

COSTA, P. F. **Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na remoção de sulfato e arsênio utilizando pó de penas de galinha como substrato orgânico**.

2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

COSTERTON, J. W.; ELLIS, B.; LAM, K.; JOHNSON, F; KHOURY, A. E. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 12, p. 2803-0, 1994.

CRANE, B. R.; GETZOFF, E. D. The relationship between structure and function for the sulfite reductases. **Current opinion in structural biology**, v. 6, n. 6, p. 744–756, 1996.

DAHLE, H.; BIRKELAND, N.-K. *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1539–1545, 2006.

DENG, Q; WU, X.; WANG, Y. LIU, M. Activity characteristics of sulfate reducing bacteria and formation mechanism of hydrogen sulfide. **Applied ecology and environmental research**, v. 16, n. 5, p. 6369–6383, 2018.

DYSART, J. S.; PATTERSON, M. S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. **Physics in medicine and biology**, v. 50, n. 11, p. 2597–2616, 2005.

EDINGTON, L. V.; KHEW, K. L; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

EDUOK, U.; OHAERI, E.; SZPUNAR, J. Accelerated corrosion of pipeline steel in the presence of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm due to carbon source deprivation in CO₂ saturated medium. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 105, p. 110095, 2019.

GARAPATI, C.; BODDU, S. H.; JACOB, S.; RANCH, K. M.; PATEL, C.; BABU, R. J.; TIWARI, A. K.; YASIN, H. Photodynamic therapy: A special emphasis on nanocarrier-mediated delivery of photosensitizers in antimicrobial therapy. **Arabian journal of chemistry**, v. 16, n. 4, p. 104583, 2023.

GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. **Methods**, v. 109, p. 158–166, 2016.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 354–360, 2002.

GIBSON, G. R. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. **The Journal of applied bacteriology**, v. 69, n. 6, p. 769–797, 1990.

GLIŃSKI, J.; STEPNIEWSKI, W. **Soil aeration and its role for plants**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2018.

GREIN, F.; RAMOS, A. R.; VENCESLAU, S. S.; PEREIRA, I. A. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. **Biochimica et biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 145–160, 2013.

GRIGORYAN, A. A.; JALIQUE, D. R.; MEDIHALA, P.; STROES-GASCOYNE, S.; WOLFAARDT, G. M.; MCKELVIE, J.; KORBER, D. R. Bacterial diversity and production of sulfide in microcosms containing uncompacted bentonites. **Heliyon**, v. 4, n. 8, p. e00722, 2018.

GU, T.; JIA, R.; UNSAL, T.; XU, D. Toward a better understanding of microbiologically influenced corrosion caused by sulfate reducing bacteria. **Journal of materials science & technology**, v. 35, n. 4, p. 631–636, 2019.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current opinion in microbiology**, v. 33, p. 67–73, 2016.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Inorganic salts and antimicrobial photodynamic therapy: Mechanistic conundrums? **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3190, 2018.

HANCOCK, R. E.; FARMER, S. W.; LI, Z. S.; POOLE, K. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 1991.

HEIDELBERG, J. F.; SESHADRI, R.; HAVEMAN, S. A.; HEMME, C. L.; PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; FRASER, C. M. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 554–559, 2004.

HICKS, J. L.; MULLHOLLAND, C. V. Cysteine biosynthesis in *Neisseria* species. **Microbiology**, v. 164, n. 12, p. 1471–1480, 2018.

HICKS, J. L.; OLDHAM, K. E.; MCGRAVIE, J.; WALKER, E. J. Combatting antimicrobial resistance via the cysteine biosynthesis pathway in bacterial pathogens. **Bioscience reports**, v. 42, n. 10, p. 1-25, 2022.

HU, X.; HUANG, Y. Y.; WANG, Y.; WANG, X.; HABLIM, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in microbiology**, v. 9 n. 1299, p. 1-24, 2018.

HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYWNTAYEV, T.; TANAKA, M.; HABLIM, M. R. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an *in vitro* study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in surgery and medicine**, v. 44, n. 6, p. 490–499, 2012.

ILHAN-SUNGUR, E.; OZOULMEZ, D.; ÇOTUK, A.; CANSEVER, N.; MUYZER, G. Isolation of a sulfide-producing bacterial consortium from cooling-tower water: Evaluation of corrosive effects on galvanized steel. **Anaerobe**, v. 43, p. 27–34, 2017.

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

JIA, R.; UNSAL, T.; XU, D.; LEKBACH, Y.; GU, T. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 137, p. 42–58, 2019.

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

KAHRILAS, G. A.; BLOTEVOGEL, J.; STEWART, P. S.; BORCH, T. Biocides in hydraulic fracturing fluids: A critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 1, p. 16–32, 2015.

KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 31–42, 2017.

KASIMOVA, K. R.; SADASIVAM, M.; LANDI, G.; SARNA, T.; HAMBLIN, M. R. Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 13, n. 11, p. 1541–1548, 2014.

KLOTZ, L.-O.; KRÖNCKE, K.-D.; SIES, H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 2, n. 2, p. 88–94, 2003.

KREMER, M. K.; MEHNERT, D. U.; MONEZI, T. A.; MOURA, E.; SILVEIRA, M.; SOARES, H. M. Fagos de bactérias redutoras de sulfato em água de produção de um reservatório de petróleo *offshore*: método tentativo de concentração e purificação. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 25, n. 4, p. 619–626, 2020.

KUSHKEVYCH, I.; CEJNAR, J.; TREMI, J.; DORDEVIC, D.; KOLLAR, P.; VITEZOVA, M. Recent advances in metabolic pathways of sulfate reduction in intestinal bacteria. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 698, 2020.

KUSHKEVYCH, I. V. Dissimilatory sulfate reduction in the intestinal sulfate-reducing bacteria. **Biological studio**, v. 10, n. 1, p. 197–228, 2016.

LAVANIA, M.; SARMA, P. M.; MANDAL, A. K.; CHEEMA, S.; LAI, B. Efficacy of natural biocide on control of microbial induced corrosion in oil pipelines mediated by *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. **Journal of environmental sciences**, v. 23, n. 8, p. 1394–1402, 2011.

LI, X.; BAI, H.; YANG, Y.; YOON, J.; WANG, S.; ZHANG, X. Supramolecular antibacterial materials for combatting antibiotic resistance. **Advanced Materials**, v. 31, n. 5, p. e1805092, 2019.

LILLIG, C. H.; PRIOR, A.; SCHWENN, J. D.; ASLUND, F.; RITZ, D.; VLAMIS-GARDIKAS, A.; HOLMGREN, A. New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase. **The journal of biological chemistry**, v. 274, n. 12, p. 7695–7698, 1999.

LIU, H.; GU, T.; ASIF, M.; ZHANG, G.; LIU, H. The corrosion behavior and mechanism of carbon steel induced by extracellular polymeric substances of iron-oxidizing bacteria. **Corrosion science**, v. 114, p. 102–111, 2017.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. Microbiologically Influenced Corrosion. **K-O Encyclopedia of Chemical Technolgy**. 2009;1–42.

LIWA, A. C.; JAKA, H. Antimicrobial resistance: mechanisms of action of antimicrobial agents. *in* I.; KUNDU, K.; KUNDU, S. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**. ed. Méndez-Vilas A. 876–885, 2015.

MAGALHÃES, R. S. **Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 8, p. 974–983, 2009.

MARIETOU, A.; RØY, H.; JØRGENSEN, B. B.; KJELDSSEN, K. U. Sulfate transporters in dissimilatory sulfate reducing microorganisms: A comparative genomics analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 309, 2018.

MATIAS, P. M.; PEREIRA, I. A.; SOARES, C. M.; CORRONTO, M. A. Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 89, n. 3, p. 292–329, 2005.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MCFARLAND, J. Nephelometer. An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. **JAMA: the journal of the American Medicinal Association**. 49(14), p.1176-1178, 1907.

MESQUITA, M. Q.; DIAS, C. J.; NEVES, M. G. P. M. S.; ALMEIDA, A.; FAUSTINO, M. A. F. Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2424, 2018.

MINNOCK, A.; VERNON, D. I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J. H.; BROWN, S. B. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 2000.

MOISEEV, D. V.; JAMES, B. R. Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium salts: their properties, hazards and toxicities. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 195, n. 4, p. 263–279, 2020.

MONTEIRO, J. S. C.; OLIVEIRA, S. C.; SANTOS, G. M.; SAMPAIO, F. J. P.; SOARES, L. G. P.; PINHIRO, A. L. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red Laser. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 1, p. 29–34, 2017.

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

NGUYEN, T.; RODDICK, F.; FAN, L. Biofouling of water treatment membranes: A review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures. **Membranes**, v. 2, n. 4, p. 804–840, 2012.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 67, n. 4, p. 593–656, 2003.

ODOM, J. M.; PECK, H. D., Jr. Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. **FEMS microbiology letters**, v. 12, n. 1, p. 47–50, 1981.

OH, H. N.; YOO, D.; PARK, S.; LEE, S.; KIM, W. K. Developmental neurotoxicity induced by glutaraldehyde in neuron/astrocyte co-cultured cells and zebrafish. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 242, n. 113891, p. 113891.

ORTEGA, M. E.; FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A.; BURGOS, M. J. G.; ABRIOUEL, H.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 162, n. 1, p. 13–25, 2013.

PAL, M. K.; GHOSH, T. C.; GHOSH, J. K. Studies on the conformation of and metal ion binding by teichoic acid of *Staphylococcus aureus*. **Biopolymers**, v. 30, n. 3–4, p. 273–277, 1990.

PAREY, K.; FRITZ, G.; ERMLER, U.; KRONECK, P. M. Conserving energy with sulfate around 100 °C – structure and mechanism of key metal enzymes in hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus*. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 5, n. 4, p. 302–317, 2013.

PEREIRA, B. M. P.; SALIM, M. A.; RAI, N.; TAGKOPOULOS, I. Tolerance to glutaraldehyde in *Escherichia coli* mediated by overexpression of the aldehyde reductase YqhD by YqhC. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1622, 2021.

PEREIRA, G. F.; PILZ-JUNIOR, H. L.; CORAÇÃO, G. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23027, 2021.

PEREIRA, S. P. P.; OLIVEIRA, R.; COELHO, S.; MUSSO, C.; SOARES, A. M.; DOMINGUES, I.; NOGUEIRA, A. J. From sub cellular to community level: toxicity of glutaraldehyde to several aquatic organisms. **The Science of the total environment**, v. 470–471, p. 147–158, 2014.

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

PILLAY, C. S.; HOFMEYR, J.-H. S.; ROHWER, J. M. The logic of kinetic regulation in the thioredoxin system. **BMC systems biology**, v. 5, n. 15, p. 1–15, 2011.

PINHEIRO, A. L. B.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F. A. A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo: Santos, cap.1, p.3-15. 2010.

RABEH, W. M.; COOK, P. F. Structure and mechanism of O-acetylserine sulfhydrylase. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 26, p. 26803–26806, 2004.

RAPACKA-ZDOŃCZYK, A.; WOŹNIAK, A.; MICHALSKA, K.; PIERAŃSKI, M.; OGONOWSKA, P.; GRINHOLC, M.; NAKONIECZNA, J. Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 642609, 2021.

RASHEED, P. A.; PANDEY, R. P.; JABBAR, K. A.; SAMARA, A.; ABDULLAH, A. M.; MAHMOUD, K. A. Chitosan/Lignosulfonate nanospheres as "green" biocide for controlling the microbiologically influenced corrosion of carbon steel. **Materials**, v. 13, n. 11, p. 2848, 2020.

REDMOND, R. W.; KOCHEVAR, I. E. Symposium-in-print: singlet oxygen invited review. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1178–1186, 2006.

REN, Y.; LIU, H.; LIU, X.; ZHENG, Y.; LI, Z.; LI, C.; YEUNG, K. W. K.; ZHU, S.; LIANG, Y; CUI, Z.; WU, S. Photoresponsive materials for antibacterial applications. **Cell reports. Physical science**, v. 1, n. 11, p. 100245, 2020.

RETTIG, I. D.; MCCORMICK, T. M. Enrolling reactive oxygen species in photon-to-chemical energy conversion: fundamentals, technological advances, and applications. **Advances in Physics X**, v. 6, n. 1, p. 1950049, 2021.

ROSÁRIO, M. O H. V. **Isolamento e identificação de molecular de bactérias redutoras de sulfato de amostras de água produzida em campo de petróleo**. 2014. 82 f. Dissertação (mestrado em biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2014.

SAMPAIO, F. J. P.; OLIVEIRA, S. C. P. S.; CRUGEIRA, P. J. L.; MONTEIRO, J. S. C.; FAGNANI, S. R. C. A.; PEPE, I. M.; ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, A. L. B. aPDT using nanoconcentration of 1,9-dimethylmethylene blue associated to red light is efficacious in killing *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in vitro. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 200, n. 111654, p. 111654, 2019.

SCHWENN, J. D.; SCHRIEK, U. A new role for thioredoxin in assimilatory sulphate reduction: Activation of the adenylylsulphate kinase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CW 15. **FEBS letters**, v. 170, n. 1, p. 76–80, 1984.

SEN, A.; IMLAY, J. A. How microbes defend themselves from incoming hydrogen peroxide. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 667343, 2021.

SHI, X.; GAO, G.; TIAN, J.; WANG, X. C.; JIN, X.; JIN, P. Symbiosis of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in sewer systems. **Environment international**, v. 143, p. 105923, 2020.

SILVA, P.; OLIVEIRA, S. H.; VINHAS, G. M.; CARVALHO, L. J.; BARAÚNA, O. S.; URTIGA FILHO, S. L.; LIMA, M. A. G. A. Tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate

(THPS) with biopolymer as strategy for the control of microbiologically influenced corrosion in a dynamic system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 160, p. 108272, 2021.

SINGH, N. K.; SINGH, R. Modeling and statistical analysis of heat-shocked sulfate-reducers and methanogens rich consortiums for hydrogen and methane production in a bio-electrochemical cell. **International journal of hydrogen energy**, v. 46, n. 51, p. 25819–25831, 2021.

SOROKIN, D. Y.; TOURAVA, T. P.; PANTELEEVA, A. N.; MUYZER, G. *Desulfonatrobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2107–2113, 2012.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 143–166, 2011.

SUÁREZ, J. I.; AYBAR, M.; NANCUCHEO, I.; POCH, B.; MARTÍNEZ, P.; RITTMANN, B. E.; SCHWARZ, A. Influence of operating conditions on sulfate reduction from real mining process water by membrane biofilm reactors. **Chemosphere**, v. 244, n. 125508, p. 125508, 2020.

SZECZYŃSKA-HEBDA, M.; GHALAMI, R. Z.; KAMRAN, M.; VAN BREUSEGEM, F.; KARPÍŃSKI, S. To be or not to be? Are reactive oxygen species, antioxidants, and stress signalling universal determinants of life or death? **Cells (Basel)**, v. 11, n. 24, p. 4105, 2022.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, 2005.

THAUER, R. K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 41 n.1, p.100–180, 1977.

TOLEDANO, M. B.; KUMAR, C.; LE MOAN, N.; SPECTOR, D.; TACNET, F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3598–3607, 2007.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: REVISÃO. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 04, p. 1010–1020, 2010.

UNSAI, T.; JIA, R.; KUMSERANEE, S.; PUNPRUK, S.; GU, T. Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of carbon steel in hydrotest using enriched artificial seawater inoculated with an oilfield biofilm consortium. **Engineering failure analysis**, v. 100, p. 544–555, 2019.

VASSENA, C.; FENU, S.; GIULIANI, F.; FANTETTI, L.; RONCUCCI, G.; SIMONUTTI, G.; ROMANO, C. L.; FRANCESCO, R.; DRAGO, L. Photodynamic antibacterial and antibiofilm activity of RLP068/Cl against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* forming biofilms on prosthetic material. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 1, p. 47–55, 2014.

VIKRAM, A.; BOMBERGER, J. M.; BIBBY, K. J. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3433–3440, 2015.

WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 4, p. 263–272, 2005.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; GASKELL, M.; MARSHALL, B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 823–825, 1999.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; RICE, L.; BURROW, S. M.; WARING, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, n. 3, p. 233–239, 1997.

WEN, J.; ZHAO, K.; GU, T.; RAAD, I. I. A green biocide enhancer for the treatment of sulfate-reducing bacteria (SRB) biofilms on carbon steel surfaces using glutaraldehyde. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 1102–1106, 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**, v. 28, n. 2, p. 431–435, 2012.

XIAOJIA, Y.; SHAO, J.; LIU, Z.; ZHANG, D.; CUI, L.; DU, C.; LI, X. Stress-assisted microbiologically influenced corrosion mechanism of 2205 duplex stainless steel caused by sulfate-reducing bacteria. **Corrosion Science**, v. 173, p. 108746, 2020.

XUE, T. W.; XI, J. X.; CHUAN, C.; DE-FENG, X.; RUO-CHEN, Z.; XU, Z.; YUAN, Y.; AI-JIE, W.; NAN-QI, R.; DU-JONG L. The microbial zonation of SRB and soNRB enhanced the performance of SR-DSR process under the micro-aerobic condition. **Environment International**, 132, 2019.

WILLIAMS, S. J.; SENARATNE, R. H.; MOUGOUS, J. D.; RILEY, L. W.; BERTOZZI, C. R. 5'-adenosinephosphosulfate lies at a metabolic branch point in mycobacteria. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 36, p. 32606–32615, 2002.

WÓJCIK-AUGUSTYN, A.; JOHANSSON, A. J.; BOROWSKI, T. Reaction mechanism catalyzed by the dissimilatory adenosine 5'-phosphosulfate reductase. Adenosine 5'-monophosphate inhibitor and key role of arginine 317 in switching the course of catalysis. **Biochimica et biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1862, n. 1, p. 148333, 2021.

XU, D.; GU, T. The war against problematic biofilms in the oil and gas industry. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 5, p. 7-5, 2015.

XU, D.; JIA, R.; LI, Y.; GU, T. Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, P. 1-10, 2017.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. A synergistic d-tyrosine and tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate biocide combination to mitigate an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 3067–3074, 2012.

XU, D.; WEN, J.; FU, W.; GU, T.; RAAD, I. d-amino acids for the enhancement of a binary biocide cocktail consisting of THPS and EDDS against an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1641–1646, 2012.

YANG, H.; LI, X.; CAO, X.; LU, S.; ZHENG, X. The toxicity assessment of 14 biocides for industrial circulating cooling water system by damage/repair pathway profiling analysis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 100, n. 104156, p. 104156, 2023.

ZHOU, H.; HUANG, D.; SUN, Z.; CHEN, X. Effects of intestinal *Desulfovibrio* bacteria on host health and its potential regulatory strategies: a review. **Microbiology Research**, v. 284, p. 127725, 2024.

ZHOU, X.; PALACIOS, E. F.; DORADO, A. D.; GAMISANS, X.; GABRIEL, D. Assessing main process mechanism and rates of sulfate reduction by granular biomass fed with glycerol under sulfidogenic conditions. **Chemosphere**, v. 286, n. 131649, p. 131649, 2022.

9.0 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

DOS SANTOS, G. V.; MOURA, H. F. S; CRUGEIRA, P. J. L.; SILVA, A. P. L. T.;
CASTRO, I. C. V.; COSTA, W. L. R.; ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, A. L. B.

Photoinactivation of sulfate-reducing bacteria using 1,9-dimethyl-methylene blue - DMMB
and Laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 263, n.

113103, p. 113103, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2025.113103>.

Acesso em: [24.01.2025].