UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Matheus da Silva Camargo

APLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A REMOÇÃO DE FERRO EM ÁGUAS DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

Porto Alegre
2018

Matheus da Silva Camargo

APLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A REMOÇÃO DE FERRO EM ÁGUAS DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biotecnologia.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientadora: Profª. Drª. Marilene Henning Vainstein
Co-orientadora: Drª. Amanda Pasinato Napp

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora do trabalho de conclusão de curso, Professora Marilene Henning Vainstein, pelo apoio, acessibilidade e disposição de toda estrutura necessária para realização deste projeto.

À minha orientadora de iniciação científica, Professora Juliana Severo Fagundes Pereira, pela confiança, oportunidade e ensinamentos durante os três anos de iniciação;

Aos professores Diogo Pompéu de Moraes e Roberta Bussamara Rodrigues da Silva, pelo suporte durante a execução deste trabalho;

À amiga, co-orientadora e conselheira, Amanda Pasinato Napp pelo apoio desde o delineamento do projeto até a escrita, pelos conselhos profissionais e pessoais e pelo carinho;

À amiga e colega de laboratório Camila Cerveira, pelo apoio na execução deste projeto, pela amizade e pelos lanches pós-laboratório;

À minha cúmplice e melhor amiga Rafaela Sampaio por toda amizade, parceria e pelos momentos de descontração, mesmo nos momentos mais difíceis da graduação;

Aos amigos e colegas de iniciação científica, Renê Gabriel e Jhulia Boff pelo auxílio nas análises e companheirismo;

A todos os demais colegas e professores dos laboratórios K217 e K219 do instituto de química e 217, 219 e 220 do centro de biotecnologia pela parceria e apoio;

Aos amigos que fiz durante a graduação e que pretendo levar para toda a vida, Alexandra Dall'Agnol, Julia Heinzmann, Kaira Nunes e Luciano Zancan;

Aos meus pais pelo apoio incondicional para a realização da graduação, pelo carinho e pelos ensinamentos.

RESUMO

A água de produção é o resíduo de maior volume gerado durante a extração de petróleo, esse efluente possui características químicas provenientes do tipo rochoso do reservatório de extração do óleo e composição bastante complexa, como a presença de sólidos dissolvidos, metais em concentrações elevadas, óleos e graxas, entre outros. A presença de metais como ferro e bário nestas águas, em contato com sulfatos e hidróxidos, favorece a formação moléculas de baixa solubilidade que podem formar incrustações, danificando tubulações e dificultando o escoamento do óleo. Uma das alternativas para a remoção destes metais é o emprego de microrganismos como processo de biorremediação. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a obtenção e seleção de microrganismos para subsequente aplicação na remoção de ferro em águas de produção. Para isso, os metais presentes em quatro amostras de água de produção de petróleo foram determinados por técnicas de absorção atômica com chama (F AAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os dados obtidos foram utilizados como base para os testes de isolamento e tolerância a metais durante a seleção dos microrganismos. Na etapa de isolamento, as amostras foram pré-concentradas e semeadas em meios de culturas sólidos, Luria-Bertani (LB) e Sabouraud (SB), por 24 horas a 30 ^{o}C. As colônias morfologicamente diferenciadas foram repicadas até total isolamento. Os isolados foram então selecionados frente aos íons metálicos Ba^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+} e Sr^{2+} e a capacidade de desenvolvimento em meios contendo baixa disponibilidade de nutrientes, condições similares as águas de produção de petróleo. Os isolados que apresentaram maior resistência aos metais foram identificados molecularmente por sequenciamento do DNA ribossomal (região 16S para bactérias e ITS para levedura), sendo três pertencentes ao gênero *Bacillus* e o terceiro identificado como *Rhodotorula mucilaginosa*. Os quatro micro-organismos isolados, bem como um controle positivo *Bacillus subtilis* ATCC (6633) foram testados quanto à remoção de ferro em soluções sintéticas e em amostras de água de produção de petróleo. Para as amostras sintéticas, os microrganismos que obtiveram melhor remoção foram AS1, AS3 e o controle, apresentando 93, 87 e 77% de remoção de Fe, respectivamente. Já nas amostras reais foi observada a interferência da matriz salina e de alta concentração de metais, sendo os valores encontrados de remoção para AS1, AS3 e *Bacillus subtilis* de 21, 25 e 13%, respectivamente.

Palavras-chave: Remoção de ferro, biorremediação, águas de produção.

ABSTRACT

Produced water is the largest volume waste generated during the extraction of petroleum, this effluent has chemical characteristics derived from the rocky type of the oil extraction reservoir and it has a very complex composition, including dissolved solids, metals in high concentrations, oils and greases, and others. The presence of metals such as iron and barium in these waters, in contact with sulfates and hydroxides, promotes the formation of molecules with low solubility that can form incrustations, damaging pipes and hampering the flow of the oil. One of the alternatives for the removal of these metals is the use of microorganisms as a bioremediation process. In this context, this work has the objective of obtaining and selecting microorganisms for subsequent application in the removal of iron in production waters. In order to achieve this goal, the metals present in four samples of produced water were determined by flame atomic absorption (F AAS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The obtained data were used as the basis for the tests of isolation and tolerance to metals during the selection of the microorganisms. In the isolation step, the samples were preconcentrated and seeded in solid culture media, Luria-Bertani (LB) and Sabouraud (SB), for 24 hours at 30 °C. The morphologically differentiated colonies were repeatedly streaked to complete isolation. The isolates were then selected against the Ba^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+} and Sr^{2+} metal ions and the development capacity in media containing low availability of nutrients, conditions similar to the produced waters. The isolates that showed the greatest resistance to the metals were molecularly identified by sequencing the ribosomal DNA (16S region for bacteria and ITS for yeast), three belonging to the genus Bacillus and the fourth identified as Rhodotorula mucilaginosa. The four isolated microorganisms, as well as a positive control Bacillus subtilis ATCC (6633), were tested for iron removal in synthetic solutions and in produced water samples. For the synthetic samples, the microorganisms that obtained the best removal were AS1, AS3, and the control, presenting 93, 87, and 77% of Fe removal, respectively. In the produced water samples, the interference of the matrix of saline and high concentration of metals was observed, with removal values for AS1, AS3, and Bacillus subtilis of 21, 25, and 13%, respectively.

Keywords: Iron removal, bioremediation, produced water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Extração facilitada de óleo pela injeção de água no poço.....11
Figura 2 – Meios de permeação de metais em camadas lipídicas..... 15
Figura 3 – Teste de sensibilidade para os quatro isolados e o controle *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) em concentrações crescentes de ferro.....26
Figura 4 – Remoção de ferro em diferentes tempos de incubação.....27
Figura 5 – Porcentagem de ferro aderido e/ou absorvido pelos microrganismos em diferentes tempos.....28
Figura 6 – Remoção de ferro em 24 horas de incubação.....28
Figura 7 – Remoção de ferro em amostras de águas de produção.....29

Figura 1.1 – Anexo 1 – Morfologias celulares dos isolados AS1 e AS3 e controle *B. subtilis* ATCC 6633.....39

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ATCC – American Type Culture Collection (Coleção de culturas americana)

ATP – Adenosina trifosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

F AAS – Espectrômetro de absorção atômica com chama

ICP-OES – Espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

LB – Luria-Bertani

MW-UV – Micro-ondas e ultra-violeta

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SB – Sabouraud

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
1.1. Indústria petrolífera 10
1.2. Águas de produção de petróleo 10
1.3. Métodos de remoção de metais e biorremediação 12
1.3.1. Mecanismos de ligação célula-metal 13
1.3.1.1. Exopolímeros 13
1.3.1.2. Sideróforos 14
1.3.1.3. Biossurfactantes 14
2. JUSTIFICATIVA 17
3. OBJETIVOS 18
3.1. Objetivo geral 18
3.2. Objetivos específicos 18
4. MATERIAIS E MÉTODOS 19
4.1. Obtenção e caracterização das águas de produção 19
4.1.1. Preparo das amostras – Decomposição por radiação micro-ondas e ultra-violeta 19
4.1.2. Determinação de metais por técnicas de espectrometria de absorção e emissão atômica 19
4.2. Isolamento de microrganismos 20
4.3. Seleção de microrganismos por tolerância a metais 20
4.4. Teste de sensibilidade em diferentes concentrações de ferro 20
4.5. Identificação molecular por sequenciamento de DNA 21
4.6. Avaliação da remoção de ferro em amostras sintéticas 21
4.7. Avaliação da remoção de ferro em amostras de água de produção 22
5. RESULTADOS 23
5.1. Determinação de metais em amostras de água de produção de petróleo 23

5.2. Isolamento dos microrganismos presente nas amostras 23

5.3. Teste de tolerância às concentrações de metais em meio nutritivo 24

5.3.1. Teste de tolerância às concentrações de metais em meio mínimo 25

5.3.2. Teste de sensibilidade – Concentração de ferro x Concentração de células 26

5.4. Morfologia celular e identificação molecular 26

5.5. Remoção de ferro em soluções sintéticas de metais 27

5.6. Remoção de ferro em amostras de água de produção 29

6. DISCUSSÃO 30

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 32

8. REFERÊNCIAS 34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Indústria petrolífera

O petróleo é considerado uma das mais importantes fontes energéticas da sociedade contemporânea. A vasta aplicabilidade possibilita a transformação em inúmeros produtos, dentre eles alguns combustíveis (ITE et al., 2013; HASSANI; SILVA; AL KAABI, 2017). Considerado o seu elevado potencial energético, este recurso natural recebeu enorme procura e consequente abertura de poços durante o século XX devido a revolução das máquinas movidas a combustível e a expansão da indústria automobilística (HUGHES; RUDOLPH, 2011; SALAMEH, 2014). Em virtude disso, as indústrias petrolíferas e petroquímicas ganharam enorme poder, com grande impacto no âmbito político e econômico, gerando desenvolvimento e renda em diversos países (JAFARINEJAD, 2017).

Entretanto, a extração do óleo bruto gera uma enorme quantidade de resíduos, tanto sólidos quanto líquidos, sendo o de maior volume a água de produção (VEIL; CLARK, 2011). A geração deste resíduo é concomitante a extração do óleo e, portanto, estas águas contêm uma alta concentração de sais provenientes do tipo rochoso da jazida, além de uma enorme quantidade de óleos emulsionados devido à pressão e temperatura exercidas durante a extração (LEE; NEFF, 2011).

1.2. Águas de produção de petróleo

As águas produzidas no processo de extração podem ser divididas em duas classes de acordo com a sua fonte de geração: (i) as águas de formação, oriundas do processo de formação e maturação da jazida; e (ii) as águas de injeção que são inseridas para aumentar a pressão nos poços e consequentemente facilitar o escoamento do óleo (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011). As proporções de água de produção geradas podem ser variáveis de acordo com tempo da jazida, localização e forma de manutenção da pressão (caso inserido CO_2 ou água de injeção). Entretanto, estima-se que para cada barril de petróleo, podem ser gerados de 0,5 a 9 barris de água de produção (VEIL; CLARK, 2011).

Em relação às águas de formação, sabe-se que devido à baixa concentração de oxigênio durante o processo de formação da jazida, alguns metais, incluindo ferro, usualmente encontram-se na fração solúvel e em elevadas concentrações (AZETSU-SCOTT et al., 2007;

NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011). Além disso, quando estas águas são bombeadas até a superfície, formam precipitados na forma de óxidos, hidróxidos e sais de sulfato quando em contato com água do mar (AZETSU-SCOTT et al., 2007). Em virtude disso, alguns outros metais podem co-precipitar com os sais formados, gerando pequenas partículas sólidas que, como absorventes, acabam aglomerando e formando grânulos. De maneira geral, hidróxidos de ferro e magnésio são responsáveis pelo início da cascata de formação de precipitados (BEA et al., 2010; BOZKURT; MORENO; NERETNIEKS, 2000).

Além dos constituintes das águas de formação, outros contaminantes também são encontrados nas águas de produção, como, água do mar, água doce e produtos químicos utilizados como facilitadores de extração que são usualmente injetados no poço para aumentar as taxas de extração do óleo (NEFF; SAUER; MACIOLEK, 1992). A injeção de água, ou em alguns casos CO_2 gasoso, para manter a pressão e aumentar a recuperação de óleo é o processo mais aplicado atualmente nas diferentes plataformas. Nas estações marítimas normalmente utiliza-se água proveniente do mar ou a re-injeção das águas de produção. Os efeitos deste processo para o reservatório e para as linhas de produção da plataforma dependem da composição química das águas injetadas, entretanto, existem algumas similaridades.

A Figura 1 demonstra a utilização de água de injeção como forma de manter a pressão nos poços de extração de petróleo. É possível observar também que a interface água/óleo não é bem definida, sendo ambos extraídos concomitantemente.

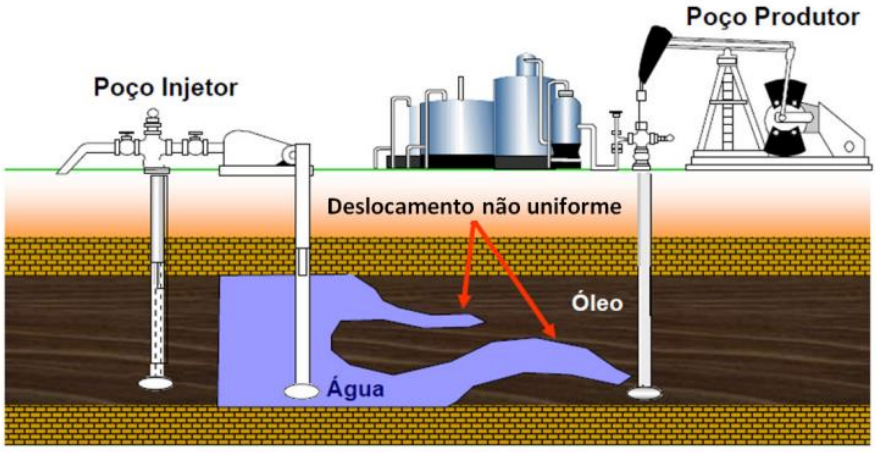

Figura 1. Extração facilitada de óleo pela injeção de água no poço. Fonte: (MIRANDA, 2010).

A presença de ferro, magnésio e bário, juntamente com demais íons divalentes na água de produção pode causar problemas de incrustações, principalmente quando a água de injeção for proveniente do mar, que costuma conter um elevado teor de sulfato (ANTHONI, 2006). Além disso, os diversos produtos auxiliares adicionados na água de injeção, para promover melhores recuperações de óleo e prevenir uma série de inconvenientes (formação de emulsões estáveis, agentes químicos xenobióticos, entre outros), estão também presentes no efluente final. Ainda, sabe-se que inúmeros compostos orgânicos constituintes do petróleo, que permanecem na água de produção mesmo após seu tratamento, são potencialmente carcinogênicos e/ou são capazes de promover bioacumulação em seres vivos (NWAICHI; WEGWU; NWOSU, 2014).

Em termos de geração das águas de produção, de acordo com Lee & Neff, em 2005, a média do volume de água de produção descarregada na costa brasileira foi de 73 milhões de metros cúbicos no ano, isso representou 3% do total anual gerado no mundo.

1.3. Métodos de remoção de metais e biorremediação

Alguns estudos relatam técnicas voltadas à remoção de metais pesados em diversos efluentes, como por exemplo, precipitação química, oxidação e redução, filtração, troca-iônica, osmose reversa, evaporação e tratamento eletroquímico (GUNATILAKE, 2015; JAIN et al., 2017; QDAIS; MOUSSA, 2004). Técnicas biológicas, como a utilização de microrganismos para o tratamento dos mais diversos tipos de efluentes, tornaram-se mais recorrentes. Partindo do princípio que as células microbianas têm capacidade de adsorver, absorver e degradar diferentes compostos desde matéria orgânica, óleos e até metais, nos últimos anos houve um enorme aumento nas pesquisas e aplicações de métodos biológicos de tratamento, também conhecidos como biorremediação (SINGH et al., 2017).

Além disso, os processos de tratamento envolvendo microrganismos são de grande relevância não somente pela facilidade da aplicação e manutenção, mas também pelo menor custo associado, eficiência e baixo impacto ambiental, com pouca ou nenhuma geração de resíduos (O’BRIEN; BUCKLING, 2015). Em relação aos microrganismos, diversas bactérias são descritas como efetivos adsorventes de metais em solução devido à grande área superficial por unidade de peso (MORIWAKI et al., 2013; TUSON; WEIBEL, 2013).

1.3.1. Mecanismos de ligação célula-metal

Os mecanismos envolvidos nos processos de interação célula-metal são diversos, porém, dentre eles, é importante destacar: (i) a ligação de metais a corpos extracelulares que possibilita e captura e o impedimento da entrada dos íons, quando indesejáveis, na célula; (ii) a associação de metais a grupos funcionais aderidos à superfície da célula, a qual ocorre com um amplo espectro de metais, incluindo cadmio, chumbo, zinco e ferro; (iii) a presença de grupos sufidril, carboxil, hidroxil, sulfato, amino, amido e fosfato, os quais estão envolvidos no processo de captura e na forte interação com íons catiônicos (TUSON; WEIBEL, 2013).

Além disso, a interação microrganismo-metal pode ocorrer por vias de internalização responsáveis, na maioria dos casos, pela aquisição de metais essenciais para a célula (Figura 2). Os transportadores de membrana e bombas de fluxo internalizam alguns metais presentes no meio extracelular devido à similaridade dos íons e pressão osmótica. Este evento, apesar de poder chegar a níveis tóxicos para as células, possui grande aplicação para a biorremediação de metais, uma vez que é uma interação forte e possibilita e remoção do metal do meio pela precipitação da biomassa microbiana.

O estudo da ligação de metais por células tem muitas vertentes, seja na saúde, para a compreensão de captação de metais durante infecções (CASSAT; SKAAR, 2013), na ecologia para a dinâmica e ciclagem de minerais, muitas vezes fixados por microrganismos (HAFERBURG; KOTHE, 2007), ou mesmo no tratamento de efluentes, usadas como veículos de absorção, concentração e remoção de metais indesejados (TUNALI; ÇABUK; AKAR, 2006). Além dos eventos de absorção/internalização dos metais pelas células, existem outras três classes de moléculas responsáveis pela ligação de metais no meio extracelular com grande potencial para aplicação na biorremediação, são elas:

1.3.1.1. Exopolímeros

A ligação extracelular também pode ocorrer, usualmente devido a ação de polissacarídeos, carboidratos e algumas vezes, ácidos nucleicos e ácidos graxos (SCHIEWER; VOLESKY, 2000). Este mecanismo, que pertencente ao processo de formação de biofilmes, oferece à célula proteção contra dissecação, fagocitose e parasitismo, e a entrada de moléculas tóxicas comuns em ambientes naturais. Os exopolímeros (EPS) são particularmente eficientes na ligação de metais pesados, como chumbo, cádmio e urânio. Os grupos funcionais presentes

nestas moléculas são, geralmente, carregados negativamente e, por isso, a eficiência de ligação aos metais está ligada a carga e ao pH do meio (WILDE et al., 2006). A detoxificação via EPS ocorre devido a imobilização e prevenção da entrada do metal na célula. *Micrococcus luteus* e *Azobacter* spp., por exemplo, realizam a imobilização de chumbo por EPS, possibilitando a resistência das células no meio e consequente desenvolvimento da colônia microbiana, mesmo em condições tóxicas (CHEN et al., 1995).

1.3.1.2. Sideróforos

Outro tipo de molécula, produzida por microrganismos e com alta capacidade de ligação à metais, são os sideróforos, estes são excelentes complexantes de ferro e possuem baixo peso molecular. Sua função biológica basal é captar ferro em ambientes de baixa disponibilidade do metal e facilitar o transporte até as células (AHMED; HOLMSTRÖM, 2014). Entretanto, alguns metais com similaridade ao ferro podem interagir com esta molécula, como alumínio, gálio e cromo na sua forma trivalente (GLASAUER et al., 2013). A ligação dos metais a uma molécula orgânica, como o sideróforo, também fornece proteção às células, uma vez que a toxicidade é reduzida quando formado o complexo quelante. Um exemplo é a redução da toxicidade de cobre em cianobactérias pela presença de sideróforos (HUERTAS et al., 2014).

1.3.1.3. Biossurfactantes

Os biossurfactantes por sua vez, são uma classe de compostos produzidos por diversos microrganismos que em sua maioria são exportados para o meio extracelular (VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015). Apesar da aplicação de biossurfactantes ser fortemente voltada para os efluentes do petróleo, com o objetivo de diminuir a tensão superficial entre dois líquidos e/ou formar micelas para captação do óleo, Maier & Soberon-Chavez mostraram a viabilidade da aplicação de biossurfactantes como complexantes de metais, como cadmio, chumbo e zinco (SOBERÓN-CHÁVEZ; MAIER, 2011).

A ação dos biossurfactantes, diferentemente dos sideróforos, não está associada diretamente a um mecanismo de resistência a metais, mas sim ao aumento da solubilidade destes no meio. Contudo, assim como para os sideróforos e demais moléculas ligantes de metais, o complexo biossurfactante-metal não apresenta toxicidade para as células microbianas (RIZZO et al., 2015).

Apesar de ainda não existirem estudos mostrando a influência da presença de metais e a produção de biossurfactantes como forma de defesa, existem evidências de que é mais provável isolar microrganismos produtores de biossurfactantes em ambientes contaminados com metais do que ambientes não contaminados (GOVARTHANAN et al., 2017).

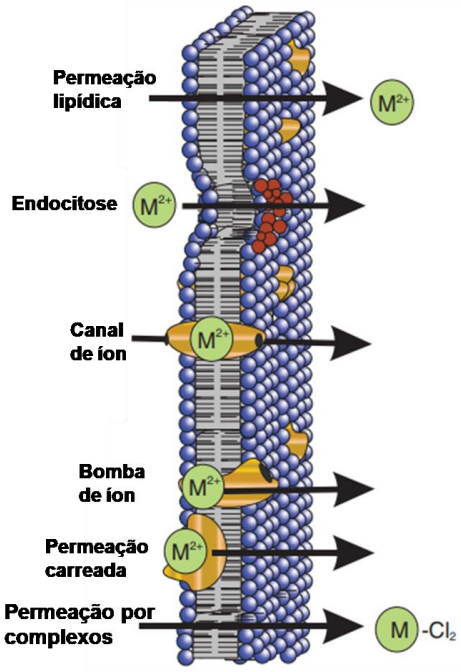

Figura 2. Meios de permeação de metais em camadas lipídicas. Representado por M^{2+} ou somente M quando complexado os metais entre as vias de permeação na membrana celular. Dependendo da condição e do elemento, os metais podem ser transportados por vias dependentes de ATP (ex. permeação carreada e bomba de íon), ou por meios não dependentes de ATP (ex. permeação lipídica). Fonte: Adaptado de SIMKISS; TAYLOR (1989).

Os microrganismos possuem formas consideráveis de resistência à metais devido a sua exposição elevada desde os primórdios da existência da vida microbiana na terra. A contaminação antropogênica impulsionou a necessidade pelo melhor compreensão dos mecanismos de defesa das espécies capazes de tolerar condições estressantes de metais no meio, com intuito de propor métodos de remediação baseados na utilização de organismos.

A longa exposição dos microrganismos à ambientes com altas concentrações de metais, possibilitou a seleção e evolução de marcas moleculares e/ou fisiológicas determinantes para a sobrevivência de gêneros e espécies em diferentes meios. Muitas dessas marcas, devido ao tempo de exposição, já se encontram associadas aos cromossomos, mas algumas ainda são passíveis de mobilidade genética, como plasmídeos e transposons

(BELLIVEAU et al., 1987). Neste sentido, a resistência a metais pode ser dividida em três categorias: (a) Mecanismos gerais, não envolvidos e/ou dependentes de estresse por metais; (b) Mecanismos gerais que são ativados em casos de estresse por metais; e (c) Mecanismos específicos para resistência que são ativados em casos específicos de presença de metais (HASSEN et al., 1998).

Mecanismos gerais usualmente são destinados a outras funções, no entanto, por apresentarem afinidade por íons metálicos, acabam funcionando como forma de defesa. A produção de biofilmes, por exemplo, é utilizada como forma de proteção, adesão e manutenção da colônia microbiana, mas ainda assim protege as células da entrada de metais indesejados pela complexação destes com a matriz extracelular (TEITZEL; PARSEK, 2003).

Desta forma, a aplicação de microrganismos visando compreender a relação com íons metálicos têm ganhado destaque como forma de remover e recuperar metais em efluentes da indústria petrolífera. Atualmente, não existe lesgilação especificando a concentração máxima permitida de metais em águas de produção, entretanto, é de grande importância, tanto ambiental quanto econômica, uma investigação na concentração de determinados elementos, uma vez que alguns podem causar entupimentos e desgastes nas linhas de produção. Devido a isso, propostas de medidas eficazes de tratamento das águas são necessárias, seja para seu descarte apropriado ou reinjeção.

Além disso, os mecanismos utilizados pelas células microbianas durante a remoção de metais ainda não foram completamente elucidados, e por isso, torna-se de grande importância o desenvolvimento de novos estudos para melhorar o seu entendimento e possibilitar a sua aplicação como processo de biorremediação.

2. JUSTIFICATIVA

A água de produção é caracterizada por sua grande complexidade devido ao número de compostos orgânicos e inorgânicos presentes de forma dispersa e/ou dissolvida (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011). Os hidrocarbonetos são os principais constituintes presentes na forma dispersa (gotículas de óleo), enquanto que na forma dissolvida encontram-se uma grande variedade de compostos orgânicos como, por exemplo, cetonas, ácidos carboxílicos e fenóis (LEE; NEFF, 2011). Além destes, também são encontrados metais, dissolvidos ou precipitados, os quais são de grande preocupação ambiental e industrial. Estas características acarretam impactos à vida marinha pela alteração dos perfis fisico-químicos das águas, à saúde humana devido aos possíveis eventos de bioacumulação de elementos tóxicos ocasionados pela ingestão de peixes e frutos do mar (MARCUSSEN et al., 2007) e às linhas de produção pela acumulação de sedimentos de ferro, bário, magnésio e demais metais divalentes, impedindo a produção de petróleo (NEFF; LEE; DEBLOIS, 2011).

Apesar da falta de uma lei específica para regulamentar e fiscalizar o descarte de águas de produção quanto às concentrações de metais, os investimentos no desenvolvimento de novos métodos são de grande importância para o tratamento desses efluentes e minimização dos danos anteriormente citados. O tratamento, entretanto, requer um método com alta eficácia, baixo impacto ambiental (resíduos químicos, sólidos ou xenobióticos) e baixo valor associado. A utilização de células microbianas para remoção de metais entra neste cenário de forma promissora, quando consideradas as capacidades de absorver e adsorver metais, ou mesmo de degradar compostos aromáticos. Desta forma, a biorremediação possibilita o tratamento de diferentes componentes, mesmo em amostras complexas de águas de produção.

A utilização de microrganismos provenientes de amostras residuais tem grande potencial devido a vasta biodiversidade de espécies presentes, as quais podem conter um amplo espectro de atividades metabólicas em relação aos diferentes contaminantes. Com adequados métodos de seleção e direcionamento das linhagens isoladas, é possível designar o melhor tratamento para determinados poluentes. Neste trabalho, portanto, foi realizado o isolamento e a aplicação de microrganismos para a remoção de ferro em águas de produção, visando a melhoria da qualidade das águas produzidas, seja para descarte ou reutilização.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar e aplicar microrganismos para a remoção de ferro em diferentes águas de produção de petróleo.

3.2. Objetivos específicos

a. Determinar a concentração de metais em quatro amostras de água de produção de petróleo;
b. Isolar microrganismos das amostras de águas de produção;
c. Selecionar os microrganismos com maior capacidade de desenvolvimento em meios contendo concentrações de ferro;
d. Identificar os microrganismos selecionados por sequenciamento de DNA ribossomal;
e. Avaliar a remoção de ferro pelos microrganismos selecionados em soluções sintéticas;
f. Avaliar a remoção de ferro pelos microrganismos selecionados em amostras de água de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e caracterização das águas de produção

Quatro amostras de água de produção foram utilizadas (A, B, C e D). Sendo A e B da costa brasileira, porém sem localização conhecida, e C e D dos estados do Espírito Santo e Sergipe, respectivamente.

As metodologias para decomposição e determinação de metais foram adaptadas de Souza e colaboradores, 2017.

4.1.1. Preparo das amostras – Decomposição por radiação micro-ondas e ultra-violeta

A caracterização prévia para quantificação de metais nas amostras de água de produção de petróleo foi realizada pela decomposição da matriz através da ação de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio como agentes oxidantes, além da irradiação de ondas de micro-ondas e ultravioleta (MW-UV), facilitando a decomposição. O procedimento foi realizado em um forno de micro-ondas Anton Paar. A redução do teor de carbono orgânico total (TOC) serviu como parâmetro para determinar a relação inicial/final de compostos orgânicos presentes na solução de decomposição.

4.1.2. Determinação de metais por técnicas de espectrometria de absorção e emissão atômica

Após a decomposição das amostras de águas de produção por MW-UV foi realizada a determinação de Ba^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Na^{+} e Sr^{2+} por espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Os metais Ca^{2+}, Fe^{3+} e Na^{+} também foram determinados por espectrômetro de absorção atômica com chama (F AAS) devido à alta concentração esperada.

4.2. Isolamento de microrganismos

As quatro amostras de água de produção de petróleo foram utilizadas para o isolamento de microrganismos. Estas foram pré-concentradas em membrana 0,22 µm estéril e o material retido no filtro foi suspendido em água destilada estéril (1 mL) e semeado em meios de cultura Sabouraud (SB) e Luria-Bertani (LB) cultivados a 30 °C por até 5 dias.

As colônias com morfologia macroscópica diferenciada foram selecionadas e repicadas até total isolamento e armazenadas em glicerol (20%) a – 80ºC.

Composição dos meios: LB (10 g L^{-1} triptona, 5 g L^{-1} extrato de levedura e 5 g L^{-1} NaCl); SB (20 g L^{-1} glicose e 10 g L^{-1} NaCl).

4.3. Seleção de microrganismos por tolerância a metais

Os microrganismos obtidos, juntamente com o controle positivo *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), foram cultivados a 30 °C em meios sólidos (LB ou SB) contendo a maior concentração dos quatro metais encontrada entre as quatro águas de produção de petróleo (Ca^{2+} 3500 mg L^{-1}; Ba^{2+} 40 mg L^{-1}; Fe^{3+} 40 mg L^{-1} e Sr^{2+} 140 mg L^{-1}). O perfil de crescimento foi observado a cada 24 horas. Os isolados que não apresentaram crescimento e/ou aparecimento de colônias em relação aos demais, foram descartados do estudo. Além disso, uma etapa adicional de seleção foi realizada no intuito de observar o crescimento dos microrganismos em meios com baixa disponibilidade de nutrientes (glicose 0,5%, NH_4NO_3 0,1% e KH_2PO_4 0,1%) juntamente à concentração de Ca^{2+}, Ba^{2+}, Fe^{3+} e Sr^{2+}, simulando as condições das águas de produção (PONTECORVO, 1949). Além disso, os microrganismos selecionados foram caracterizados morfologicamente por coloração de Gram (MCCLELLAND, 2001).

4.4. Teste de sensibilidade em diferentes concentrações de ferro

Para observar a tolerância específica para as concentrações de ferro, os microrganismos selecionados e o controle positivo *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foram cultivados em meio líquido LB (30 °C por 24h a 200 rpm) seguido por duas lavagens com solução NaCl 0.85%, para remoção de todo conteúdo nutritivo do meio, a concentração de

células foi então padronizada por espectroscopia ótica a 600 nm para densidade óptica de 0,8 e, em seguida, diluída em séries de 10, 100, 1000, 10000 e 100000 vezes. Uma alíquota de 3 µL de cada diluição, incluindo a concentrada, foi dispensada em placas de meio sólido LB contendo diferentes concentrações de ferro, variando de 1 a 10 vezes a concentração do íon (40, 80, 200 e 400 mg L^{-1}).

4.5. Identificação molecular por sequenciamento de DNA

Os microrganismos isolados foram cultivados em meio líquido LB ou SB por 24h a 30°C e 200 rpm, após foram lavados com solução de NaCl 0.85%, e submetidos ao protocolo de extração de material genômico com pérolas de vidro (FREDRICKS; SMITH; MEIER, 2005). A confirmação da extração foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0.8% e as amostras foram armazenadas a -20°C.

Foram utilizados *primers* de amplificação das regiões 16S e ITS, para bactérias e leveduras, respectivamente. As condições utilizadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região 16S foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 30 ciclos (95°C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 2 min) e 10 minutos de extensão final a 72° C. Para a amplificação da região ITS na levedura BS1 as condições foram: 94 °C por 5 min de desnaturação inicial, 35 ciclos (94 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e 30 s) e extensão final de 6 min a 72 °C. Após os produtos de DNA foram purificados com o kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific).

O sequenciamento foi realizado pela ATCGenes análises moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS) em um sequenciador AS 3500xl Genetic Analyzer – Applied Biosystems. As sequências de nucleotídeos obtidas foram tratadas e alinhadas para obtenção de *contigs* na ferramenta PHPH disponibilizada pela Embrapa (TOGAWA, et al., 2006). Os resultados foram comparados com as sequências de nucleotídeos de espécies de referência obtidas EMBL/GenBank database, usando NCBI BLAST (ELEANOR; LANGENAU, 2011).

4.6. Avaliação da remoção de ferro em amostras sintéticas

Para avaliar o potencial de aplicação dos isolados selecionados na remoção de ferro das águas de produção, um teste inicial foi realizado em frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo uma solução de 40 mg L^{-1} de ferro em água destilada. Uma concentração conhecida

de células foi aplicada sobre a amostra sintética para atingir a densidade óptica final de 0,8. Os frascos de solução de interação célula-metal, bem como os respectivos controles (somente metal e somente célula), foram incubados em agitador orbital a 30 °C por até 48 h com agitação de 200 rpm.

Alíquotas de 5 ml foram retiradas nos tempos de 0,5; 2; 6; 12; 24 e 48 horas para observação da remoção em diferentes tempos de interação. Após a interação, as células foram separadas por centrifugação a 9000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado em tubos de Falcon (50 mL) e o restante do material sólido (células com ferro internalizado ou fortemente aderido) foi submetido à digestão ácida com HNO_3 14 M por 24 horas.

O sobrenadante, o produto de lavagem das células e o digerido foram analisados por F AAS para a determinação da concentração de ferro.

Todos os testes foram realizados em triplicatas e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foi utilizada como controle.

4.7. Avaliação da remoção de ferro em amostras de água de produção

O mesmo procedimento empregado às amostras de soluções sintéticas foi realizado para as amostras de água de produção. Entretanto, uma etapa de centrifugação foi acrescentada para remoção dos grânulos presentes nas amostras.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação de metais em amostras de água de produção de petróleo

Na tabela 1 estão dispostos os valores encontrados para os 5 analitos quantificados em ICP-OES e F AAS nas quatro amostras de água de produção de petróleo digeridas por MW-UV.

Tabela 1. Caracterização química das amostras de água de produção de petróleo.

Analito	**Amostras**				LQ*
	A	**B**	**C**	**D**	
Ba	9,00 ± 0,43	5,59 ± 0,12	1,72 ± 0,12	38,3 ± 0,9	0,006
Ca	3551 ± 163	445 ± 3	2315 ± 83	1957 ± 81	0,462
Fe	1,06 ± 0,03	0,82 ± 0,01	1,29 ± 0,02	41,2 ± 1,0	0,021
Na	16849 ± 518	4358 ± 110	38608 ± 979	14678 ± 476	0.103
Sr	120 ± 5	24,7 ± 0,9	69,8 ± 2,4	138 ± 2	0,004

*Limite de quantificação. Valores em µg g^{-1}.

5.2. Isolamento dos microrganismos presente nas amostras

As diferenças morfológicas das colônias foram utilizadas como parâmetro para o isolamento dos diferentes microrganismos presentes nas quatro amostras. Foram observados aspectos como: regularidade das bordas, presença ou ausência de pigmentação/cor, cremosidade, brilho ou opacidade e formação de relevo. Fungos filamentosos não foram considerados no isolamento, somente bactérias e leveduras.

Desta forma, foram identificadas 26 colônias morfologicamente diferentes, como pode ser observado na tabela 3.

A nomenclatura respectiva para cada microrganismo isolado está relacionada à amostra de água de origem (A, B, C e D), meio de cultivo de crescimento (L = LB; S = Sabouraud) e ordem de isolamento.

Tabela 3. Microrganismos isolados a partir de águas de produção.

Amostra	Meio de cultura	
	Luria-Bertani	**Sabouraud**
A	-	AS1
	-	AS3
B	BL1	BS1
	BL2	BS2
	BL3	BS3
	BL4	BS4
	BL5	-
	BL6	-
	BL7	-
C	CL1	-
	CL2	-
	CL3	-
	CL4	-
	CL5	-
D	DL1	DS1
	DL2	-
	DL3	-
	DL4	-
	DL5	-
	DL6	-
	DL7	-

5.3. Teste de tolerância às concentrações de metais em meio nutritivo

Os 26 isolados foram observados quanto ao crescimento em meios de seleção para tolerância para os quatro íons metálicos (Ba^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+} e Sr^{2+}) durante 4 dias de incubação. As colônias que apresentaram maior facilidade no desenvolvimento foram consideradas promissoras. As linhagens que se desenvolveram com alguma deficiência foram desconsideradas. A tabela 4 indica os selecionados na primeira etapa de tolerância à metais.

Tabela 4. Microrganismos com tolerância às concentrações de metais infundidos em meios LB e SB.

Amostra	Meio de cultura	
	Luria-Bertani	**Sabouraud**
A	-	AS1
	-	AS3
B	BL2	BS1
	BL5	-
	BL6	-
C	CL2	-
	CL3	-
	CL4	-
D	DL3	DS1
	DL6	-
	DL7	-
	DL8	-

5.3.1. Teste de tolerância às concentrações de metais em meio mínimo

Para a seleção dos microrganismos capazes de se desenvolver em meios com baixa disponibilidade de carbono, os microrganismos resistentes a primeira etapa, foram semeados em meios de baixa disponibilidade energética suplementados de metais. Neste experimento, foram considerados todos os microrganismos que apresentaram desenvolvimento de colônia, mesmo que tardio. Na tabela 5 estão apresentados os isolados que demonstraram desenvolvimento nesta etapa de seleção.

Tabela 5. Microrganismos tolerantes às condições de baixa disponibilidade energética e concentrações de metais.

Amostra	Meio de cultura	
	Luria-Bertani	**Sabouraud**
A	-	AS1 AS3
B	BL5	BS1

5.3.2. Teste de sensibilidade – Concentração de ferro x Concentração de células

O teste de sensibilidade foi utilizado para observar o limite de tolerância dos diferentes microrganismos isolados em relação ao controle (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), sendo as linhagens AS1, AS3 e BS1 as que apresentaram maior tolerância, resistindo a elevadas concentrações de ferro.

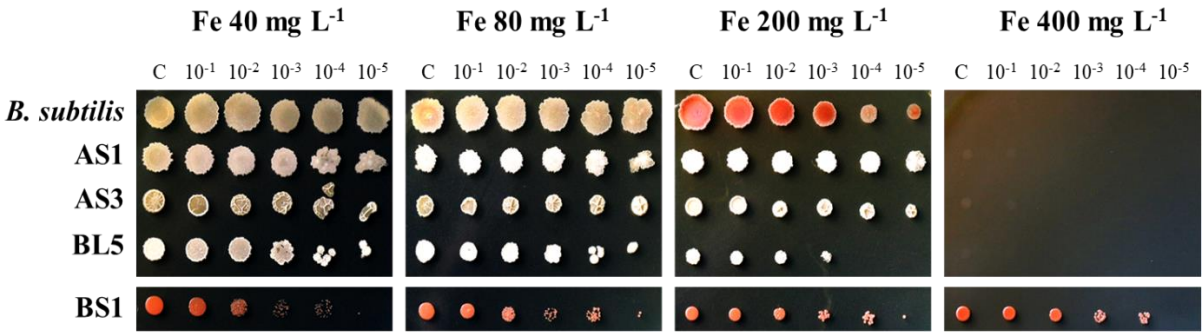

Figura 3. Teste de sensibilidade para os quatro isolados e o controle *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) em concentrações crescentes de ferro. Cada ponto de desenvolvimento de colônia representa a diluição da suspensão de células O.D. 0,8 até a diluição de 10^{-5}, sendo C o controle *B. subtilis*. A concentração dos metais suplementados em meio sólido LB foi realizada na escala de 1, 2, 5 e 10 em relação a inicial (determinada pela concentração do íon ferro encontrada na amostra D de água de produção). (A) Isolados bacterianos em meio LB + Fe observados após 24 horas de incubação a 30 °C. (B) Levedura isolada em diferentes concentrações celulares em meio SB + Fe observada após 48 horas de incubação a 30 °C.

5.4. Morfologia celular e identificação molecular

Após os testes de seleção previamente descritos, os microrganismos nomeados por AS1, AS3, BL5 e BS1 tiveram a morfologia observada por teste de Gram e foram identificados por métodos moleculares de sequenciamento de DNA. Foram analisadas as sequencias parciais dos genes 16S e ITS (para o isolado BS1) e os resultados encontrados para cada microrganismo estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6. Identificação celular e molecular dos microrganismos selecionados.

Microrganismo isolado	Morfologia celular	Identificação
AS1	Bacilo Gram-positivo	*Bacillus* sp.
AS3	Bacilo Gram-positivo	*Bacillus* sp.
BL5	Bacilo Gram-positivo	*Bacillus* sp.
BS1	Leveduriforme	*Rhodotorula mucilaginosa*

5.5. Remoção de ferro em soluções sintéticas de metais

Após a interação célula-solução sintética foram obtidas 2 fases: (i) sobrenadante, constituído pela solução da primeira centrifugação e (ii) precipitado, correspondente às células lavadas que poderiam conter ferro internalizado e/ou fortemente aderido.

O sobrenadante foi passível de quantificação diretamente, necessitando apenas de diluições para adequação à curva de calibração. A fração precipitada (células) foi digerida em HNO_3 14 M bidestilado até completa decomposição do material orgânico e solubilização dos componentes inorgânicos.

A concentração de ferro foi determinada por F AAS em ambas frações, os resultados obtidos estão dispostos na figura 4 (porcentagem de ferro no sobrenadante, da qual foi atrelada a taxa de remoção do metal) e figura 5 (porcentagem de ferro nas células após digestão, utilizada para complementação dos resultados obtidos no sobrenadante). Os valores foram calculados em função da concentração inicial de ferro, obtida da solução controle.

As recuperações, concentração de ferro nas células e concentração de ferro no sobrenadante em relação a concentração inicial, permaneceram entre 95 e 105%, resultado satisfatório considerando os desvios analíticos e limitações da técnica de espectrometria.

A remoção de ferro foi considerada pela concentração final no sobrenadante em relação a concentração inicial determinada nas soluções controle.

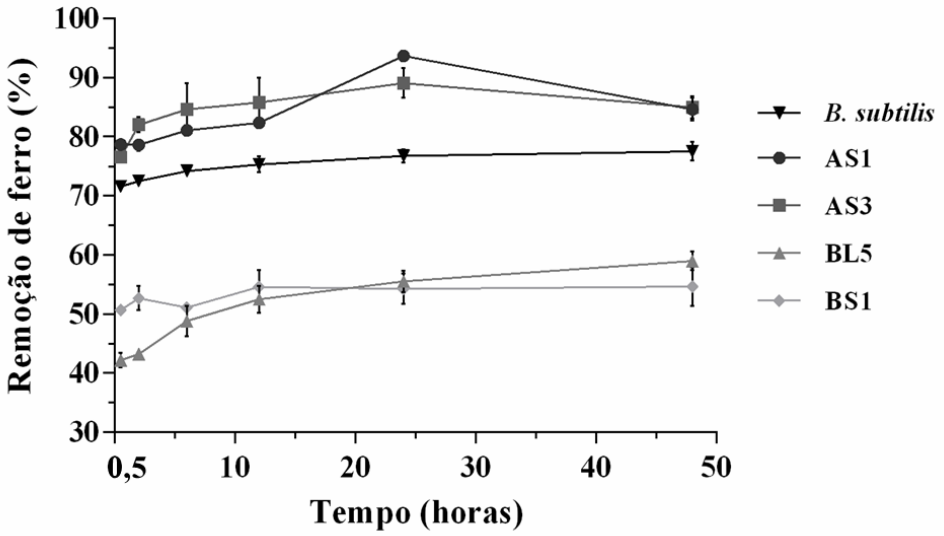

Figura 4. Remoção de ferro em diferentes tempos de incubação. O controle (*B. subtillis* ATCC 6633) apresentou média de remoção de 75%, enquanto AS3 e AS1, de 80 e 85%, respectivamente. Os isolados BL5 e BS1 apresentaram valores inferiores, próximos a 50%. Remoção calculada em função da concentração de ferro encontrada no sobrenadante.

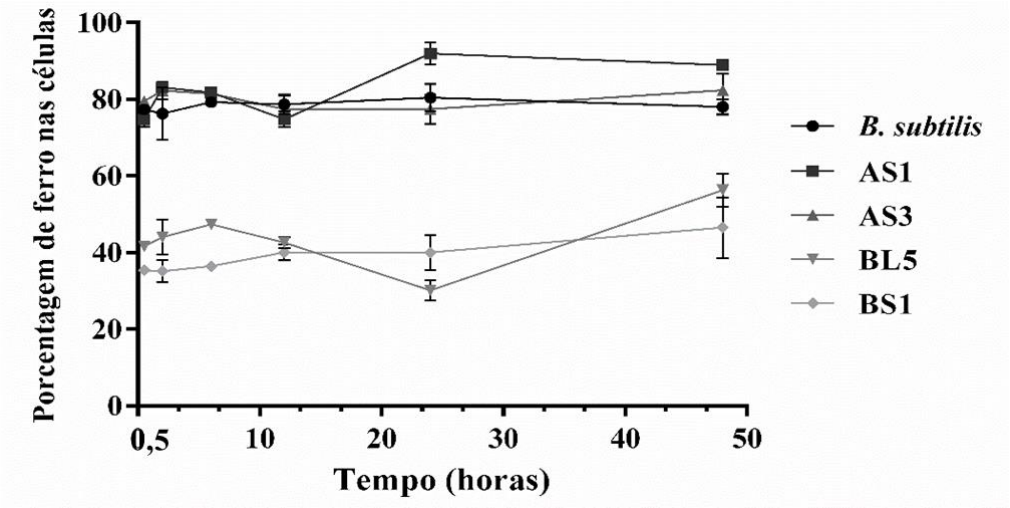

Figura 5. Porcentagem de ferro aderido e/ou absorvido pelos microrganismos em diferentes tempos. A concentração de ferro encontrada nas células foi utilizada para complementação dos dados obtidos no sobrenadante (efluente tratado). No tempo de 24 horas, a quantidade de ferro determinada nos isolados AS1 e AS3 foram de 91 e 79%, enquanto o controle foi de 80%. Os isolados BL5 e BS1 apresentaram interação máxima com ferro no tempo de 48 horas, sendo 56 e 46%, respectivamente.

O tempo de 24 horas de interação apresentou maior taxa de remoção de ferro, chegando a 93% para o isolado AS1. Em virtude disso, foram realizados testes estatísticos para determinar se, nesta condição, havia diferença significativa entre os melhores microrganismos isolados, e entre os isolados e o controle positivo (figura 4).

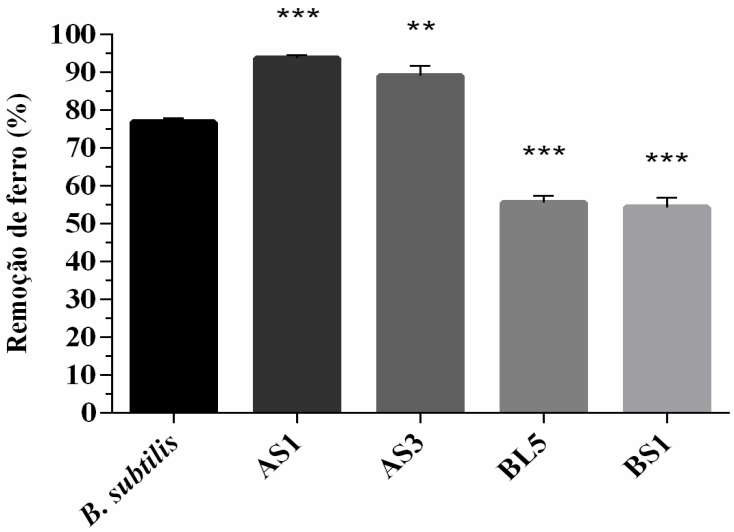

Figura 6. Remoção de ferro em 24 horas de incubação. A remoção observada para os isolados AS1 e AS3 foi significativamente superior ao encontrado para o controle. Enquanto os isolados BL5 e BS1 exibiram valores significativamente inferiores ao

Bacillus subtilis. Valores correspondentes à média de triplicatas ± SD. (**) Resultado com diferença significativa em relação ao controle. Teste t, significância de 95% (p = 0,015). (***) Resultado com diferença significativa em relação ao controle. Teste t, significância de 95% (p < 0,0001)

5.6. Remoção de ferro em amostras de água de produção

Devido a presença de partículas sólidas contendo ferro insolúvel, as amostras foram inicialmente centrifugadas para a retirada do material particulado e, em sequência, acrescidas de padrão de Fe 1000 mg L^{-1} para a concentração de 40 mg L^{-1}.

No intuito de observar os efeitos da matriz de água de produção sobre a remoção mediada por células microbianas, foram aplicados os três melhores microrganismos testados.

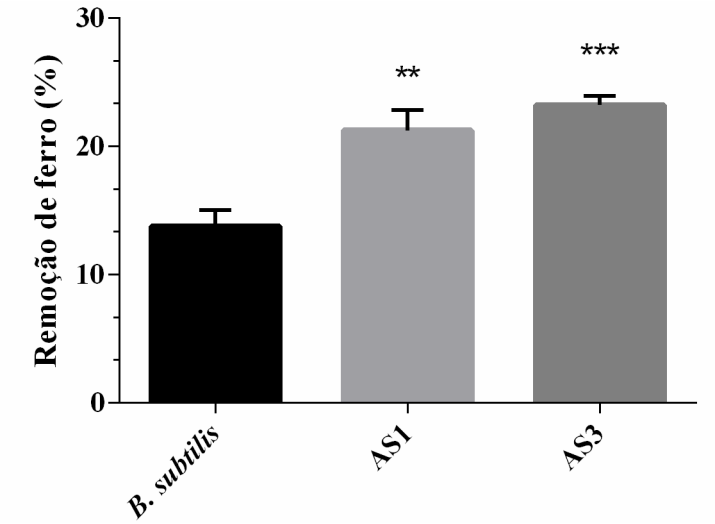

Figura 7. Remoção de ferro em amostras de águas de produção. Porcentagens de remoção de ferro em amostras de água de produção em 24 horas de interação para os isolados AS1, AS3 e controle *B. subtilis* (ATCC 6633). Valores correspondentes à média de triplicatas ± SD. (**) Resultado com diferença significativa em relação ao controle. Teste t, significância de 95% (p = 0,015) (***) Resultado com diferença significativa em relação ao controle. Teste t, significância de 95% (p = 0,0001).

6. DISCUSSÃO

As concentrações de ferro encontradas nas amostras de água de produção foram condizentes com as demais descritas na literatura (LEE; NEFF, 2011). A amostra D exibiu concentração de ferro próxima a 40 mg L^{-1} e foi utilizada como referência para os testes de remoção, esta apresenta um valor médio entre os demais encontrados em outros estudos (IGUNNU; CHEN, 2014). Este valor, apesar de ser próximo ao usualmente encontrado em águas de produção, é 20 a 1000 vezes maior do que o encontrado em amostras de água do mar, que varia de 0,0008 a 2,0 mg L^{-1} (WORSFOLD et al., 2014).

Esta diferença significativa demonstra a dimensão da poluição gerada pelo descarte incorreto do efluente. Considerando a fato de que os organismos marinhos estão habituados às baixas concentrações de metais na água do mar, a alteração destes níveis, pela adição de água de produção ao ambiente, pode acarretar danos severos à biodiversidade (FERREIRA et al., 2013).

A capacidade do microrganismo BS1 (*Rhodotorula mucilaginosa*) de se desenvolver mesmo em meios com elevadas concentrações de ferro (800 mg L^{-1}) provavelmente está associada à mecanismos de efluxo de metais da célula (GHOSH et al., 1999; MACIASZCZYK-DZIUBINSKA; WAWRZYCKA; WYSOCKI, 2012). Assim como existem bombas e canais de incorporação de metais, existe o mecanismo oposto para regulação da homeostase e do balanço osmótico intra/extracelular. A levedura BS1, neste caso, provavelmente mantém a concentração dos metais balanceada, de forma que permita a sobrevivência da célula no meio. Os demais isolados e o controle possivelmente não possuem mecanismos fortes para regulação do balanço osmótico, sendo vulneráveis a entrada excessiva de metais no meio intracelular, podendo chegar a níveis tóxicos para a célula (TSAI; HSU; ROSEN, 1997).

A identificação dos microrganismos selecionados obtidos a partir de sequenciamento de DNA, pertencentes ao gênero *Bacillus*, corroboram a literatura e a utilização de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) como controle para este trabalho (BEVERIDGE; MURRAY, 1980; FOWLE; FEIN, 1999; MULLEN et al., 1989). Este gênero é amplamente descrito como capaz de adsorver ou absorver metais, inclusive metais tóxicos (ARIVALAGAN et al., 2014; OVES; KHAN; ZAIDI, 2013; OZDEMIR et al., 2017; TOURNEY et al., 2009). A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* também é descrita como um microrganismo ambiental e foi

isolada anteriormente em efluentes contendo elevadas concentrações de mercúrio (LIU et al., 2017).

Para a remoção de ferro em amostras sintéticas, é possível observar que a aplicação dos microrganismos isolados resultou em melhores taxas de remoção quando comparados ao controle *B. subtilis* ATCC 6633. Este resultado é instigante quando comparado ao observado macroscopicamente nas colônias cultivadas em meio contendo ferro. O isolado AS1 apresenta colônias de coloração branco-amarelado, o microrganismo AS3 exibe principalmente nas bordas das colônias uma coloração laranja e, curiosamente, o controle uma coloração vermelha intensa, assim como a solução de ferro utilizada nos testes (Figura 1.1 – Anexo I).

Uma hipótese para essa comparação é a diferença na forma ou coordenação que o ferro é capturado pelas células, sendo o controle capaz de assimilar ferro no estado de oxidação 3+ como por exemplo óxido ou hidróxido; o isolado AS1 pode estar assimilando ferro na forma reduzida, captando como sulfeto ou fosfato e, o isolado AS3, por apresentar uma coloração celular intermediária, possivelmente é capaz de assimilar ambas as condições, ferro no estado de oxidação 2+ ou 3+ (GÜTLICH; GASPAR; GARCIA, 2013; OWEN; JOHN, 2001).

É possível estabelecer, também, algumas relações entre os níveis de remoção encontrados para os isolados e a tolerância destes em meios sólidos contendo ferro. A levedura BS1, conforme comentado anteriormente, possivelmente utiliza mecanismos de efluxo para sobrevivência em meios estressantes. Indícios destes mecanismos são observados novamente na etapa de remoção, onde a levedura interage com cerca de 50% do metal na concentração de 40 mg L^{-1}. Já os isolados AS1 e AS3, por provavelmente não regularem o balanço inta/extracelular de ferro, possuem maiores taxas de absorção e adsorção de ferro nas células (93 e 87%, respectivamente).

Dessa forma, a remoção de ferro pode estar atrelada à interação da célula com o metal, porém, é necessário um equilíbrio entre a capacidade de sobrevivência em meios contendo alta concentração de metais e com a não-expulsão dos íons após ligação/internalização.

Quanto à análise de remoção em diferentes tempos, o tempo de 24 horas foi estabelecido em virtude da elevada remoção encontrada para os isolados AS1 e AS3. Entretanto, é válido ressaltar que os valores para remoção em 2 horas, ou mesmo 30 minutos, podem ser considerados satisfatórios dependendo da aplicação e do efluente a ser tratado.

Em contrapartida, a remoção diminuída observada em amostras de água de produção pode ser explicada devido a presença de diversos metais na matriz que, em altas concentrações, dificultam a entrada de ferro nas células. Além disso, a presença de demais

íons divalentes no meio satura os grupamentos aniônicos presentes intra e extracelularmente. Ainda assim, consideradas as proporções relativas de ferro em relação aos íons de cálcio e estrôncio (cátions de carga 2+), a remoção de cerca de 25% para o isolado AS3 mostrou especificidade para a ligação a ferro.

Alguns ajustes no tempo de incubação, concentração de células, agitação e reaplicação de inóculos ainda podem ser realizados almejando melhores taxas de remoção para cada isolado. Ainda é possível implementar o sistema de remoção à suportes, na forma imobilizada ou então liofilizando as células para aplicação de biomassa seca.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A biorremediação entra no cenário de tratamento de efluentes de forma promissora. A aplicação de microrganismos para remoção de metais cresce significativamente devido ao interesse ambiental e econômico. Alguns metais, como ferro, bário e estrôncio, não geram a devida preocupação por não apresentarem riscos severos à saúde, entretanto, é emergente a procura por novos métodos de tratamento para remoção destes metais em linhas de produção as quais podem causar danos.

Neste trabalho, foi realizada a prospecção de microrganismos em amostras de efluentes provenientes da extração de petróleo (águas de produção) para a aplicação como método de remoção de ferro, visando a diminuição dos danos gerados pelo metal na contaminação ambiental e no entupimento e desgaste de bombas usadas durante a extração do óleo. Do total de 25 isolados, 2 se mostraram promissores juntamente ao controle positivo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os isolados AS1 e AS3 apresentaram remoção de ferro entre 87 e 93% nas amostras sintéticas. Já durante o tratamento das amostras reais de águas de produção, o microrganismo AS3 apresentou remoção de cerca de 25%, evidenciando o efeito da matriz sobre a capacidade de absorção de metais pelas células.

Considerando a elevada remoção de ferro em amostras sintéticas pelos dois dos microrganismos isolados, é importante salientar a necessidade de continuar investigando os mecanismos associados a interação do metal às células microbianas. Visto que também existe um potencial de aplicação ambiental e econômico atrelado a recuperação de metais, como por exemplo prata, ouro, cério, lantânio, os quais são considerados valiosos.

A aplicação das células em escala piloto ainda é uma perspectiva, entretanto, existem inúmeros trabalhos possibilitando o uso das mesmas na forma planctônica, conforme este

trabalho, associada à suportes ou mesmo em biofilmes. Além dessa meta, ainda se destacam outras perspectivas, como:

- Observar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os depósitos de ferro sobre a parede celular microbiana e/ou na matriz extracelular em biofilmes;
- Desenvolver métodos para especificar os metais a serem internalizados, possibilitando a abrangência da aplicação do método como forma de recuperação de metais preciosos em efluentes;
- Analisar microrganismos provenientes de outros efluentes com altas concentrações do ferro quanto aos mesmos testes deste trabalho;
- Analisar a remoção de bário, cálcio e estrôncio, metais também responsáveis por danos em linhas de produção;
- Quantificar a remoção dos demais metais presentes nas amostras de água de produção, visto a diminuição de remoção de ferro na presença da matriz da água de produção.

8. REFERÊNCIAS

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

ANTHONI, Floor. **The chemical composition of seawater**. 2006.

ARIVALAGAN, Pugazhendhi et al. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using Bacillus cereus. **Ecological Engineering**, [s. l.], 2014.

AZETSU-SCOTT, Kumiko et al. Precipitation of heavy metals in produced water: Influence on contaminant transport and toxicity. **Marine Environmental Research**, [s. l.], 2007.

BEA, S. A. et al. Geochemical and environmental controls on the genesis of soluble efflorescent salts in Coastal Mine Tailings Deposits: A discussion based on reactive transport modeling. **Journal of Contaminant Hydrology**, [s. l.], 2010.

BELLIVEAU, B. H. et al. Metal resistance and accumulation in bacteria. **Biotechnology advances**, [s. l.], 1987.

BEVERIDGE, T. J.; MURRAY, R. G. E. Sites of metal deposition in the cell wall of Bacillus subtilis. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], 1980.

BOZKURT, S.; MORENO, L.; NERETNIEKS, I. Long-term processes in waste deposits. **Science of the Total Environment**, [s. l.], 2000.

CASSAT, James E.; SKAAR, Eric P. Iron in infection and immunity. **Cell host & microbe**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 509–519, 2013.

CHEN, J. H. et al. MOBILIZATION OF ADSORBED CADMIUM AND LEAD IN AQUIFER MATERIAL BY BACTERIAL EXTRACELLULAR POLYMERS. **Water Research**, [s. l.], 1995.

E. ITE, Aniefiok et al. Petroleum Exploration and Production: Past and Present Environmental Issues in the Nigeria's Niger Delta. **American Journal of Environmental Protection**, [s. l.], 2013.

ELEANOR Y. CHEN AND DAVID M. LANGENAU. Manual of Environmental Microbiology. **Methods Cell Biol.**, [s. l.], 2011.

FERREIRA, Micheli da Silva et al. Contaminação por metais traço em mexilhões Perna perna da costa brasileira. **Ciência Rural**, [s. l.], 2013.

FOWLE, David A.; FEIN, Jeremy B. Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: Testing the chemical equilibrium model. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], 1999.

FREDRICKS, David N.; SMITH, Caitlin; MEIER, Amalia. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 2005.

GHOSH, Mallika et al. Pathways of As(III) detoxification in Saccharomyces cerevisiae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], 1999.

GLASAUER, S. M. et al. Metals and Metalloids, Transformation by Microorganisms. In: **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. [s.l: s.n.].

GOVARTHANAN, M. et al. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing heavy metal resistant Rahnella sp. RM isolated from chromium-contaminated soil. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], 2017.

GUNATILAKE, S. K. Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater. **Multidisciplinary Engineering Scinece Studies (JMESS)**, [s. l.], 2015.

GÜTLICH, Philipp; GASPAR, Ana B.; GARCIA, Yann. **Spin state switching in iron coordination compoundsBeilstein Journal of Organic Chemistry**, 2013.

HAFERBURG, Götz; KOTHE, Erika. **Microbes and metals: Interactions in the environmentJournal of Basic Microbiology**, 2007.

HASSANI, Hossein; SILVA, Emmanuel Sirimal; AL KAABI, Ahmed Mohamed. The role of innovation and technology in sustaining the petroleum and petrochemical industry. **Technological Forecasting and Social Change**, [s. l.], 2017.

HASSEN, A. et al. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, [s. l.], 1998.

HUERTAS, María et al. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and

Arsenic Homeostasis Mechanisms. **Life**, [s. l.], 2014.

HUGHES, Larry; RUDOLPH, Jacinda. **Future world oil production: Growth, plateau, or peak?Current Opinion in Environmental Sustainability**, 2011.

IGUNNU, Ebenezer T.; CHEN, George Z. Produced water treatment technologies. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, [s. l.], 2014.

JAFARINEJAD, Shahryar. Pollutions and Wastes From the Petroleum Industry. In: **Petroleum Waste Treatment and Pollution Control**. [s.l: s.n.].

LEE, Kenneth; NEFF, Jerry M. **Produced Water - Environmental risks and advances in mitigation technologies.** [s.l: s.n.].

LIU, Bing et al. Hg tolerance and biouptake of an isolated pigmentation yeast Rhodotorula mucilaginosa. **PLoS ONE**, [s. l.], 2017.

MACIASZCZYK-DZIUBINSKA, Ewa; WAWRZYCKA, Donata; WYSOCKI, Robert. **Arsenic and antimony transporters in eukaryotesInternational Journal of Molecular Sciences**, 2012.

MARCUSSEN, Helle et al. Food safety aspects of toxic element accumulation in fish from wastewater-fed ponds in Hanoi, Vietnam. **Tropical Medicine and International Health**, [s. l.], 2007.

MCCLELLAND, R. Gram’s stain: the key to microbiology. **MLO medical laboratory observer**, [s. l.], 2001.

MIRANDA, A. C. **Formação de emulsões no escoamento multifásico de óleo e água em meios porosos**. 2010.

MORIWAKI, Hiroshi et al. Adsorption of rare earth ions onto the cell walls of wild-type and lipoteichoic acid-defective strains of Bacillus subtilis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], 2013.

MULLEN, M. D. et al. Bacterial sorption of heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], 1989.

NEFF, J. M.; SAUER, T. C.; MACIOLEK, N. Composition, Fate and Effects of Produced Water Discharges to Nearshore Marine Waters. In: **Produced Water:**

Technological/Environmental Issues and Solutions. [s.l: s.n.].

NEFF, Jerry; LEE, Kenneth; DEBLOIS, Elisabeth M. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects. In: **Produced Water**. [s.l: s.n.].

NWAICHI, E. O.; WEGWU, M. O.; NWOSU, U. L. Distribution of selected carcinogenic hydrocarbon and heavy metals in an oil-polluted agriculture zone. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], 2014.

O'BRIEN, Siobhan; BUCKLING, Angus. The sociality of bioremediation: Hijacking the social lives of microbial populations to clean up heavy metal contamination. **EMBO reports**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1241–1245, 2015.

OVES, Mohammad; KHAN, Mohammad Saghir; ZAIDI, Almas. Biosorption of heavy metals by Bacillus thuringiensis strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], 2013.

OWEN, A. Y.; JOHN, W. Meat Color. In: **Meat Science and Applications**. [s.l: s.n.].

OZDEMIR, Sadin et al. Resistance, bioaccumulation and solid phase extraction of uranium (VI) by Bacillus vallismortis and its UV–vis spectrophotometric determination. **Journal of Environmental Radioactivity**, [s. l.], 2017.

PONTECORVO, G. Auxanographic Techniques in Biochemical Gene. **Journal of General Microbiology**, [s. l.], 1949.

QDAIS, Hani Abu; MOUSSA, Hassan. Removal of heavy metals from wastewater by membrane processes: A comparative study. **Desalination**, [s. l.], 2004.

RIZZO, Carmen et al. Biosurfactant activity, heavy metal tolerance and characterization of Joostella strain A8 from the Mediterranean polychaete Megalomma claparedei (Gravier, 1906). **Ecotoxicology**, [s. l.], 2015.

SALAMEH, Mamdouh G. **Oil WarsSSRN**. [s.l: s.n.].

SCHIEWER, S.; VOLESKY, B. Biosorption processes for heavy metal removal. **Environmental Microbe-Metal Interactions**, [s. l.], 2000.

SIMKISS; TAYLOR. Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms. **Aquatic Sciences**, [s. l.], 1989.

SINGH, Pardeep et al. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 155–201, 2017.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R. M. Biosurfactants: A general overview. **Biosurfactants**, [s. l.], 2011.

SOUZA, J. P. et al. Microwave-assisted ultraviolet digestion: An efficient method for the digestion of produced water from crude oil extraction and further metal determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, [s. l.], 2017.

TEITZEL, Gail M.; PARSEK, Matthew R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 2313–2320, 2003.

Togawa, R.C.; Brigido, M.M.; Santos, C.M.R.; Júnior M.T. (2006). The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in Musa acumitana. **XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)** - Aguas de Lindoia - SP - Brazil - 2006.

TOURNEY, Janette et al. Physical and chemical effects of extracellular polymers (EPS) on Zn adsorption to Bacillus licheniformis S-86. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], 2009.

TSAI, Kan Jen; HSU, Ching Mei; ROSEN, Barry P. Efflux mechanisms of resistance to cadmium, arsenic and antimony in prokaryotes and eukaryotes. **Zoological Studies**, [s. l.], 1997.

TUNALI, Sibel; ÇABUK, Ahmet; AKAR, Tamer. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], 2006.

TUSON, Hannah H.; WEIBEL, Douglas B. Bacteria-surface interactions. **Soft matter**, [s. l.], v. 9, n. 18, p. 4368–4380, 2013.

VEIL, John; CLARK, Corrie. Produced Water Volume Estimates and Management Practices. **SPE Production & Operations**, [s. l.], 2011.

VIJAYAKUMA, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications.

Research Journal of Microbiology, [s. l.], 2015.

WILDE, Karyn L. et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (Chlorella sp.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], 2006.

WORSFOLD, Paul J. et al. **Determination of dissolved iron in seawater: A historical reviewMarine Chemistry**, 2014.

ANEXO I

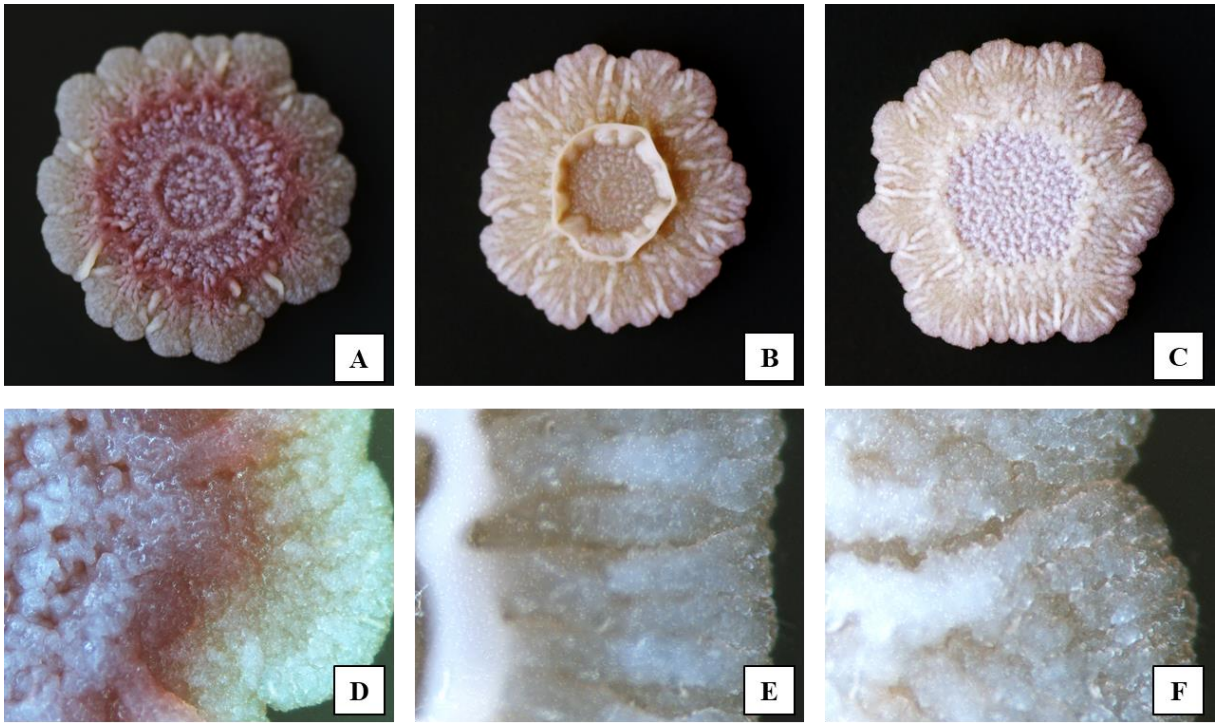

Figura 1.1. Morfologias celulares dos isolados AS1 e AS3 e controle *B. subtilis* ATCC 6633. Crescimento dos três microrganismos com maiores taxas de remoção de ferro em meio LB sólido suplementado de Fe 40 mg L^{-1} em 72 horas de incubação a 30 °C. Representado por (A) e (D) o controle *B. subtilis* com coloração avermelhada. Em (B) e (E) é possível observar a coloração levemente laranja presente e o relevo característico nas colônias do isolado AS3. (C) e (F) representam o isolado AS1, coloração branca no centro e amarelada nas bordas. (D), (E) e (F) com aumento de 10 vezes e as três primeiras sem aumento.