



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro de Tecnologia e Ciências  
Instituto de Química

Kelly Yaeko Miyashiro de Almeida

**Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em  
amostras de petróleo**

Rio de Janeiro

2007

Kelly Yaeko Miyashiro de Almeida

**Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em amostras de petróleo**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadores: Prof. Aderval Severino Luna  
Prof<sup>a</sup>. Márcia Monteiro Machado Gonçalves

Rio de Janeiro  
2007

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

A447 Almeida, Kelly Yaeko Miyashiro de.  
Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em amostras de petróleo. / Kelly Yaeko Miyashiro de. - 2007.  
77 f.

Orientador: Aderval Severino Luna.  
Orientador: Márcia Monteiro Machado Gonçalves.  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Bactérias redutoras de sulfato - Teses. 2. Bactérias anaeróbicas – Teses. 3. Petróleo – Teses. I. Luna, Aderval Severino. II. Gonçalves, Márcia Monteiro Machado. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 579.66

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Kelly Yaeko Miyashiro de Almeida

**Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em amostras de petróleo**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de janeiro de 2007.

Banca Examinadora:

---

Prof. Aderval Severino Luna (Orientador)  
Instituto de Química da UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Márcia Monteiro Machado Gonçalves (Orientadora)  
Instituto de Química da UERJ

---

Prof. Antonio Carlos Augusto da Costa  
Instituto de Química da UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Eliana Flávia Camporese Sérvulo  
Escola de Química da UFRJ

---

Prof. Edmar das Mercês Penha  
Instituto de Química da UERJ

Rio de Janeiro  
2007

## **AGRADECIMENTOS**

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos os que me apoiaram, encorajaram e me auxiliaram durante este trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Márcia Monteiro Machado Gonçalves e ao Prof. Aderval Severino Luna pela orientação, pela enorme disponibilidade, paciência, incentivo e atenção dedicada a este trabalho.

Ao Professor Antônio Carlos Augusto da Costa pelos ensinamentos adquiridos, sempre prestativo aos meus questionamentos.

Aos profissionais do Laboratório de Bioprocessos da UERJ (Márcia Carreira, Vanessa Marcondes, Gustavo de Souza, Marta Picardo e Ellen Soares) pela ajuda e bom convívio durante a execução do trabalho.

Ao CENPES/PETROBRÁS pelo fornecimento das amostras.

Ao Instituto Nacional de Tecnologia pela realização das análises de caracterização das amostras.

Às amigas Renata Maria e Ligia Meres pela intensa amizade, boas e produtivas conversas, além momentos extremamente divertidos que, sem dúvida, marcaram muito a minha vida. Amigas, obrigada pela oportunidade de crescer ao lado de vocês.

Às minhas amigas Zila e Vanessa pela amizade construída durante a pós-graduação e pelo constante incentivo e apoio.

Aos meus pais, Carlos e Wilma, pelo constante apoio em todas as decisões e momentos da minha vida. Muito obrigada pela educação, amor e o respeito presente em nossa família. Vocês são o motivo da minha vida e pelos quais nutro uma imensa admiração e gratidão.

A Alex F. da Costa, por seu Amor, pela imensa compreensão e paciência nos momentos em que estive ausente.

## RESUMO

ALMEIDA, Kelly Yaeko Miyashiro de. *Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em amostras de petróleo*. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

Foi examinado o efeito dos surfactantes polisorbato 60 (Tween 60), polisorbato 80 (Tween 80), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e lauril sulfato de sódio (SDS) na estimativa da densidade de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT) em amostras de petróleo. Para a realização dos experimentos, foram selecionadas três amostras com diferentes proporções de óleo e água de forma a representar amostras reais. A primeira amostra contém uma alta proporção de óleo, a segunda uma proporção média e a última amostra uma baixa proporção de óleo. A densidade bacteriana foi estimada através do método do Número Mais Provável (NMP). As concentrações dos surfactantes empregadas neste estudo foram estabelecidas através de estudo anterior. Os resultados demonstram que nas amostras com alta e média proporção de óleo, a adição dos surfactantes não foi favorável a um aumento na quantificação de BRS. Por outro lado, o Tween 60 e o Tween 80 mostraram um aumento significativo na quantificação de BANHT quando aplicados na concentração de 0,01% e 0,03% m/v, respectivamente. O CTAB favoreceu o crescimento de BRS e BANHT na amostra com baixa proporção de óleo quando sua concentração foi de 0,001% m/v e 0,0001% m/v, respectivamente.

Palavras-chave: Bactéria redutora de sulfato (BRS). Surfactante. Bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT). Petróleo.

## **ABSTRACT**

The effect of the surfactants (Tween 60), polyoxyethylene monooleate (Tween 80), cetyl, trimethyl ammonium bromide (CTAB) and sodium dodecyl sulfate (SDS) on the estimation of bacterial density (sulfate reducing bacteria – SRB and General Anaerobic Bacteria – GanB) was examined in the petroleum samples. In order to carry out the experiments, we selected three different mixtures of oil and water to be representative of the real samples. The first one contains a high proportion of oil, the second contains a medium proportion and the last one contains a low proportion. The most probable number (MPN) was used to estimate the bacterial density. The concentrations of the surfactants used in this work were determined in a previous study. The results showed that the addition of surfactants did not improve the SRB quantification for the high or medium proportion of oil of the petroleum samples. On other hand, Tween 60 and Tween 80 showed a significantly increase on the GanB quantification when their concentrations were 0.01% and 0.03% m/v, respectively. CTAB increased the SRB and GanB estimation for the low proportion of oil of the petroleum sample when its concentration was 0.001% and 0.0001% m/v, respectively.

**Keywords:** Sulfate-reducing bacteria (SRB). Surfactant. General anaerobic bacteria (GAnB). Petroleum.

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	1
	<b>Introdução</b> .....	1
	<b>Objetivos</b> .....	3
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
1.1	<b>Recuperação secundária do petróleo e suas implicações na indústria petrolífera</b> .....	4
1.1.1	<u>Acidificação biogênica (souring biogênico)</u> .....	5
1.1.2	<u>Processos corrosivos associados à ação de microorganismos</u> ..	6
1.1.3	<u>Biofilmes</u> .....	8
1.2	<b>Consórcio microbiano: microbiologia e bioquímica do processo anaeróbico</b> .....	11
1.2.1	<u>Processo biológico anaeróbico: primeiro estágio</u> .....	12
1.2.2	<u>Processo biológico anaeróbico: segundo estágio</u> .....	14
1.2.3	<u>Processo biológico anaeróbico: terceiro estágio</u> .....	14
1.3	<b>Bactérias redutoras de sulfato (BRS)</b> .....	15
1.3.1	<u>Metabolismo das BRS</u> .....	22
1.4	<b>Surfactantes</b> .....	24
1.4.1	<u>Concentração micelar crítica (CMC) e balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)</u> .....	25
1.4.2	<u>Os surfactantes e solubilização do petróleo</u> .....	28
1.5	<b>Quantificação celular</b> .....	30
1.5.1	<u>Considerações teóricas do número mais provável</u> .....	30
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
2.1	<b>Caracterização da amostra</b> .....	35
2.1.1	<u>Determinação da concentração de sulfetos totais nas amostras</u> .....	35
2.2	<b>Quantificação de BRS e BANHT</b> .....	37
2.3	<b>Seleção dos surfactantes</b> .....	39
2.4	<b>Meios de cultura</b> .....	41
2.4.1	<u>Meio Postgate E – modificado</u> .....	41
2.4.2	<u>Meio de cultura para Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)</u> .....	42
2.4.3	<u>Solução Diluição</u> .....	43
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
3.1	<b>Determinação dos sulfetos totais nas amostras de petróleo</b> .....	45
3.2	<b>Quantificação da população de bactérias redutoras de sulfato e bactérias anaeróbias heterotróficas totais na ausência de surfactante</b> .....	46
3.3	<b>Efeito do surfactante Tween 60 na quantificação microbiana</b> .....	48
3.4	<b>Efeito do surfactante Tween 80 na quantificação microbiana</b> .....	53
3.5	<b>Efeito do surfactante CTAB na quantificação microbiana</b> ....	57
3.6	<b>Efeito do surfactante SDS na quantificação microbiana</b> .....	61
3.7	<b>Considerações finais</b> .....	65
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
4.1	<b>Bactérias redutoras de sulfato</b> .....	67



4.2	<b>Bactérias anaeróbias heterotróficas totais</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
	<b>ANEXO I</b> Fundamentos Teóricos das Distribuições Binomial e de Poisson .....	78
	<b>ANEXO II</b> .....	87

## INTRODUÇÃO

A recuperação secundária do petróleo, através da injeção de água do mar nos reservatórios de campos marítimos (offshore), tem se intensificado durante os últimos anos na tentativa de aumentar a produção do petróleo. A qualidade do fluido de injeção é um fator de extrema importância para manter a produtividade dos poços de petróleo e auxiliar no controle de fenômenos de corrosão desencadeados pela atividade dos microrganismos.

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) apresentam-se como um dos mais comuns e problemáticos tipos de microrganismos de grande importância em termos econômicos para a indústria petrolífera (HAMILTON & LEE, 1995). Os efeitos causados pela atividade de BRS nas indústrias de petróleo podem ser evidenciados, principalmente, devido aos problemas ligados à corrosão induzida por microrganismos (CIM) e toxicidade relacionados com a geração do gás sulfídrico.

A formação do  $H_2S$  nos reservatórios de petróleo promove graves danos devido aos problemas relacionados à sua ação corrosiva, com efeito na vida útil dos materiais de produção, no transporte e refino, bem como na qualidade do fluido, a qual pode ser comprometida, levando a gastos elevados para o seu tratamento (PENNA *et al.*, 2003).

Na indústria do petróleo, o  $H_2S$  pode estar presente nos reservatórios e nos fluidos dos campos onde existe a necessidade de injeção de água do mar. Sua formação pode ser resultante de mecanismos de dissolução de sulfetos minerais, da decomposição de substâncias orgânicas sulfuradas e da atividade das BRS.

O  $H_2S$  apresenta alta toxicidade e a intoxicação por essa substância pode ter efeitos prejudiciais à saúde humana dependendo da concentração do gás no ar, da duração e da frequência da exposição, e da susceptibilidade individual.

De acordo com Maxwell *et al.* (2002), embora seja extremamente difícil estimar os custos relacionados aos processos corrosivos atribuídos à atividade de microrganismos (BRS e outras bactérias) na indústria de petróleo, nos últimos

anos, vêm sendo verificado custos na ordem de 10 a 45 milhões de dólares relativos às ações de controle e substituição de equipamentos e linhas. Os custos envolvendo em especial o controle da atividade de BRS são também significativos, com valores anuais da ordem de 150 mil dólares por plataforma, somente para o uso de produtos biocidas. Assim, consideráveis esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de estudos para verificação de melhoria de técnicas para quantificação desses microrganismos de forma a fornecer um diagnóstico para estabelecimento de procedimentos efetivos de prevenção e controle.

Em geral, os métodos mais utilizados para quantificar BRS apresentam-se em duas categorias: métodos de detecção direta e métodos de culturas. Embora os métodos de detecção direta sejam promissores, ainda estão em fase de desenvolvimento, não tendo, muitas vezes, sua aplicação adequada devido aos problemas encontrados quando empregados *in situ* (FLEMMING & INGVORSEN, 1998) e, também, há limitações do uso devido ao alto custo desses novos sistemas de análise (RUBIO, 2005).

Dessa forma, a técnica do Número Mais Provável (NMP) permanece como um método representativo para quantificação de BRS e vem sendo empregado durante muitas décadas.

Em amostras contendo substâncias hidrofóbicas, a quantificação de microrganismos como as BRS e as Bactérias Anaeróbicas Heterotróficas Totais (BANHT), poderá ser comprometida por conta da baixa solubilização dessas substâncias na fase aquosa.

O estudo da influência de surfactantes no crescimento de BRS e BANHT em amostras contendo óleo pode tornar-se uma alternativa na melhoria do método do NMP nessas condições. Os surfactantes são substâncias que apresentam na mesma molécula uma porção polar e outra apolar, o que lhe confere uma dupla afinidade.

Muitos estudos com emprego de surfactantes na biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados têm sido desenvolvidos de forma a promover uma maior solubilização dos contaminantes na presença dessas substâncias. Os

trabalhos partiram da hipótese de que uma maior solubilização dos contaminantes em solução propiciaria uma maior disponibilidade dessas substâncias aos microrganismos envolvidos e, conseqüentemente, uma maior taxa de biodegradação.

Um outro aspecto favorável à utilização de surfactante está na adição do mesmo na quantificação dos parâmetros relacionados à atividade microbiana em tanques de armazenamento. A extensão com que essa adição compromete os parâmetros monitorados, não é claramente evidenciada na literatura, mas já está sendo explorada.

## **OBJETIVO**

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a influência do emprego de diferentes classes de surfactantes, dois representantes da classe dos não-iônicos, o Tween 60 (Polisorbato 60) e o Tween 80 (Polisorbato 60), um aniônico, o SDS (Lauril Sulfato de Sódio), e por último, o surfactante catiônico CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) na quantificação microbiana em amostras coletadas nos tanques de óleo, com o emprego do método do Número Mais Provável (NMP).

Os grupos microbianos avaliados foram:

- Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)
- Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Recuperação secundária do petróleo e suas implicações na indústria petrolífera

A extração do petróleo dos reservatórios nas plataformas em campos marítimos (offshore) é realizada pelos processos de recuperação primária e recuperação secundária.

Na recuperação primária (Figura 1a), o petróleo é obtido através da pressão interna contida no interior do próprio reservatório, proveniente da ação de gases e vapor de água subterrâneos, suficiente para induzir o fluxo ascendente do petróleo através dos poços até a superfície (CORRÊA, 2003). Esse processo propicia uma baixa recuperação da quantidade total do óleo presente nos reservatórios, inferior a 30% (DAVIDOVA *et al.*, 2001 *apud* NASCIMENTO, 2006).

A recuperação secundária (Figura 1b) consiste na injeção de um fluido (água ou gás) no interior do reservatório. O fluido injetado tem a função de deslocar o petróleo remanescente contido nos reservatórios até os poços produtores de modo a fornecer um estímulo adicional na recuperação. A recuperação secundária aumenta a capacidade de recuperação do petróleo não obtida com a recuperação primária (CORRÊA, 2003).

A água do mar tem sido amplamente utilizada como fluido de injeção devido às facilidades (disponibilidade e viabilidade frente às fontes de água doce).

A eficiência da recuperação secundária está relacionada ao controle de parâmetros ligados à qualidade da água a ser injetada no reservatório. Fatores como a presença de bactérias de diferentes grupos fisiológicos, o teor de oxigênio dissolvido e a presença de partículas em suspensão estão associados a fenômenos de corrosão, os quais implicam em sérios problemas para a indústria petrolífera (PENNA, 2004).

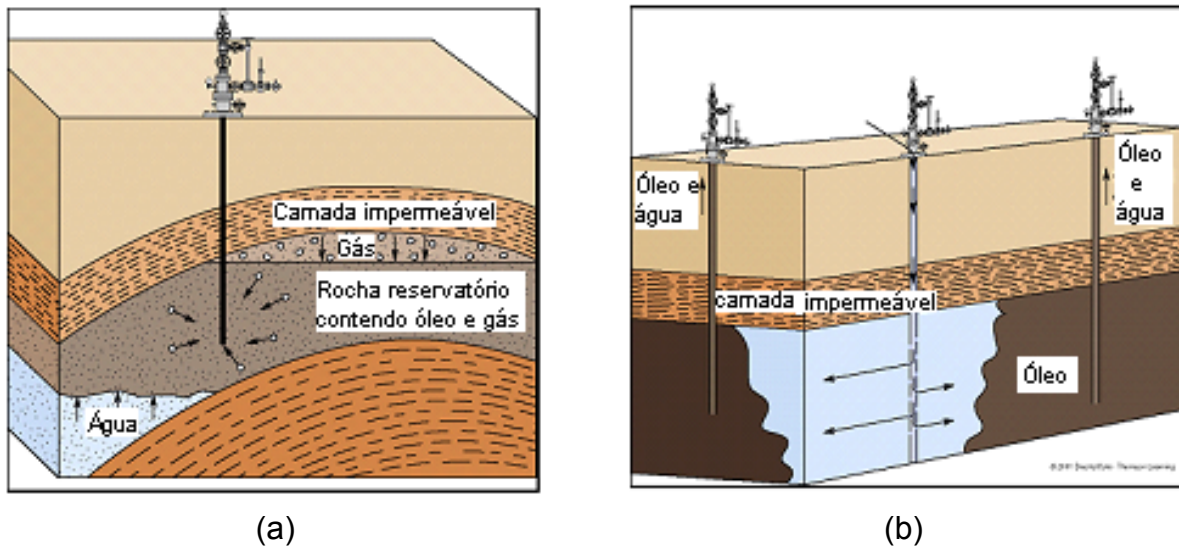


Figura 1 – Representação do processo de recuperação primária 1(a) e recuperação secundária 1(b) (Adaptado de CORRÊA, 2003).

As BRS têm sido apontadas como um dos mais comuns e problemáticos tipos de microrganismos em termos econômicos para a indústria de petróleo nos processos de recuperação secundária.

Os efeitos causados pela atividade de BRS na indústria do petróleo podem ser evidenciados principalmente devido aos problemas ligados a corrosão induzida por microrganismos (CIM) e a geração biogênica do  $H_2S$ , processo conhecido como *souring* biogênico, que promove a acidificação dos reservatórios, comprometendo a qualidade do fluido.

#### 1.1.1 Acidificação biogênica (*souring* biogênico)

Segundo Farquhar (1997), o *souring* biogênico é definido como sendo um processo no qual alguns reservatórios apresentam um aumento na produção de gás sulfídrico ( $H_2S$ ) durante o período da produção em campo.

A água do mar empregada na recuperação secundária em campos offshore como fluido de injeção é rica em íons sulfato. Esses íons são reduzidos a sulfeto pela ação das BRS, o sulfeto produzido reage com o hidrogênio formando o sulfeto de hidrogênio, mecanismo biótico de geração de  $H_2S$ . Segundo

Nascimento (2006) há ainda mais quatro tipos de processos associados à geração de H<sub>2</sub>S:

- craqueamento térmico;
- dissolução de material pirítico;
- reações de oxi-redução de produtos sequestrantes de oxigênio
- redução dos íons sulfato por ação termoquímica.

O ambiente anaeróbio criado no interior do sistema de recuperação secundária de petróleo favorece o crescimento bacteriano, em especial da BRS em consórcio com outros microrganismos facultativos e anaeróbios. As BRS não são capazes de degradar biopolímeros como o amido, glicogênio, proteínas ou lipídeos, necessitando, assim, da atuação de outros grupos de microrganismos (precursores), os quais fornecem substrato e condições suficientes para o seu desenvolvimento.

A formação do H<sub>2</sub>S nos reservatórios de petróleo promove graves danos gerando grandes despesas às indústrias petrolíferas. A ação corrosiva do H<sub>2</sub>S implica numa redução da vida útil dos materiais de produção, transporte e refino além de interferir na qualidade do petróleo produzido.

Elevadas concentrações de H<sub>2</sub>S presentes nos fluidos produzidos (água oleosa, óleo e gás) geram graves problemas relacionados à saúde humana e ao meio ambiente. A sua ação tóxica pode levar um indivíduo à morte pela paralisia das vias respiratórias quando o mesmo está exposto a quantidades acima do limite tolerável. De acordo com a NR-15 da Portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho o limite de tolerância de exposição ao gás sulfídrico é de 8 ppm para uma jornada de 8 horas/dia.

#### 1.1.2 Processos corrosivos associados à ação de microrganismos

A Corrosão Influenciada por Microrganismos (CIM) é um termo utilizado para o processo no qual a corrosão é iniciada ou acelerada pela atividade de microrganismos sem alterar as características das reações eletroquímicas (VIDELA, 2003). Pode ser referida também por outros termos como: corrosão

microbiológica, corrosão induzida microbiologicamente, corrosão assistida microbiologicamente, entre outras nomenclaturas (PENNA, 2004).

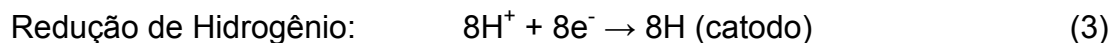
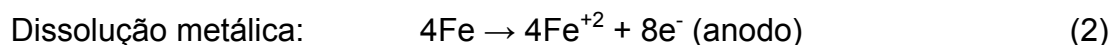
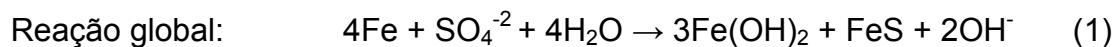
De acordo com Gentil (1996), há muitos ambientes que podem proporcionar condições favoráveis ao crescimento de microrganismos e desencadear fenômenos de corrosão. No conjunto formado por esses ambientes podem ser citados: a água do mar, de rios, de sistemas de refrigeração, regiões pantanosas, sedimentos oleosos, solos contendo resíduos orgânicos ou sais como sulfatos, nitratos, fosfatos ou ainda enxofre (GENTIL, 1996).

A participação dos microrganismos na corrosão raramente é realizada através de um mecanismo simples ou por uma única espécie microbiana (VIDELA & SALVAREZZA, 1994). Segundo Penna (2004) das consequências decorrentes da CIM podem ser encontradas em diferentes casos:

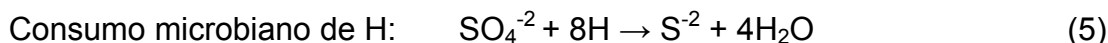
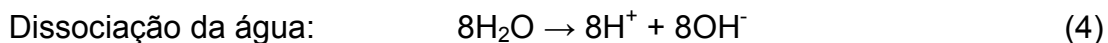
- alteração da interface metal/solução pela atividade microbiana e
- formação de biofilmes, potencializando o efeito das atividades metabólicas microbianas.

Existem vários modelos que pretendem explicar o mecanismo através do qual as BRS participam da CIM. Dentre estes mecanismos, a primeira interpretação eletroquímica de um caso de biocorrosão mencionado em literatura foi a teoria da despolarização catódica apresentada por Wolzogen Kuhr and Van der Vlugt em 1934 (ODOM, 1993; HAMILTON & LEE, 1995; LI, 2003).

As reações envolvidas na teoria da despolarização catódica são apresentadas a seguir (VIDELA, 2003):







Tal mecanismo propõe que o hidrogênio adsorvido na superfície do metal, oriundo da dissociação da água, é removido pela ação das BRS através da enzima hidrogenase, despolarizando a região do catodo.

Na ausência das BRS, o hidrogênio ficaria adsorvido ao metal, polarizando-o. O efeito da polarização faz com que ocorra uma inibição do processo corrosivo através da formação de um filme de H<sub>2</sub> na superfície do metal.

De acordo com Videla & Herrera (2005) a teoria da despolarização catódica tem sido questionada nas últimas décadas por desconsiderar o efeito corrosivo dos produtos de corrosão (sulfeto de hidrogênio e/ou sulfeto ferroso) e a ação dos demais microrganismos envolvidos no processo, admitindo apenas a ação das espécies hidrogenases positivas.

### 1.1.3 Biofilmes

Os microrganismos são estruturas simples, que estão presentes nos mais diversos habitats, mas capazes de desenvolverem comportamentos bastante complexos. Apresentam-se nos ambientes aquosos, tanto na forma planctônica com na forma sésil (COSTERTON *et al.*, 1987; CHAKRALIS & MARSHALL, 1990). Na forma planctônica os microrganismos encontram-se em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que, na forma sésil se encontram aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes.

Segundo Machado (2005) existem várias definições de biofilme, mas, no geral, estes podem ser definidos como sendo uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido e que é, essencialmente, constituída por um aglomerado de células microbianas,

por água e pelos seus produtos de excreção, as substâncias poliméricas extracelulares (SPE).

As SPE consistem de uma mistura complexa de macromoléculas como polissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, sendo o conteúdo dessas macromoléculas variável, dependendo da espécie de microrganismo envolvido e das condições de crescimento (BEECH *et al.*, 2005).

O crescimento de bactérias no interior dos biofilmes aderidos às superfícies facilita o desenvolvimento de um consórcio estruturado, o que potencializa o efeito das atividades metabólicas dos microrganismos envolvidos. Tal fato é uma das evidências práticas do envolvimento de microrganismos nos processos corrosivos.

Nos estágios iniciais de formação de um biofilme, as bactérias sésseis se apresentam justapostas, possibilitando a formação de microcolônias de espécies simples ou mistas (COSTERTON *et al.*, 1995). Segundo Penna (2004) a microcolônia é a organização básica do biofilme em crescimento, podendo ser comparada ao tecido epitelial como organização fundamental na formação dos órgãos de organismos superiores.

A dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Costerton *et al.* (2002) apresenta cinco fases para o processo de formação de um biofilme:

1 - Inicialmente o substrato torna-se condicionado, as células planctônicas são transportadas do meio aquoso para o substrato e uma fração de células ficam aderidas ao mesmo.

2 - As células aderidas passam a se desenvolver, originando microcolônias que iniciam a excreção da SPE, a qual auxilia numa maior adesão (irreversível) das células e criam condições favoráveis (microclima) ao estabelecimento de outros organismos, os colonizadores secundários.

3 - Posteriormente ocorre a formação da arquitetura primária do biofilme apresentando coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células.

4 – As células e outras matérias particuladas se aderem ao biofilme, aumentando o acúmulo do mesmo. As células sésseis continuam a se reproduzir e excretar as SPE, o biofilme forma uma camada confluyente de crescente espessura sobre a superfície.

5 - O biofilme já se apresenta maduro, nessa etapa ocorre desprendimento de algumas células localizadas mais próximas à superfície do biofilme nas camadas mais externas.

O processo de formação de um biofilme está representado na Figura 2.

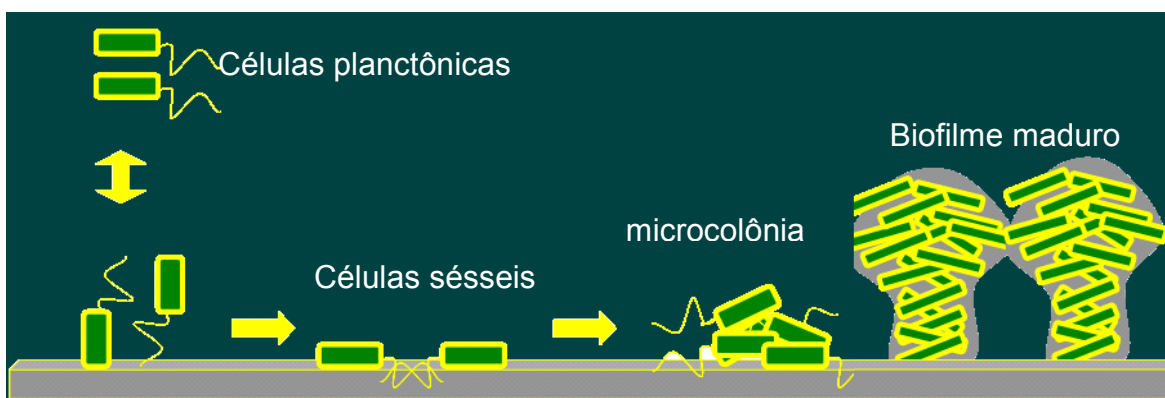


Figura 2 – Representação do processo de formação de um biofilme.

A presença de biofilmes na indústria do petróleo está diretamente relacionada em grande parte aos processos corrosivos que ocorrem em sistemas de perfuração, recuperação, transporte e armazenamento de petróleo, além dos problemas com a perda de injetividade e a acidificação dos reservatórios (NASCIMENTO, 2006).

A complexidade das populações microbianas presentes no biofilme, bem como sua espessura, criam um ambiente de aeração diferencial através das várias

camadas ao longo de sua estrutura. Assim, há o estabelecimento de condições apropriadas ao desenvolvimento de microrganismos anaeróbios (SIMÕES, 2005), incluindo as BRS. Dessa forma, desde que na base do biofilme haja condições de anaerobiose, poderá ocorrer a proliferação de BRS, apesar da presença de oxigênio dissolvido no fluido (HAMILTON & LEE, 1995).

A dinâmica do crescimento destas populações bacterianas leva à produção de elevado gradiente de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e à queda de potencial redox na interface com o metal, além de produção de outros metabólitos ácidos agressivos (dióxido de carbono e ácidos orgânicos). O transporte de bactérias e de produtos de corrosão para o reservatório petrolífero pode gerar o plugueamento de poços injetores, diminuindo a produção de petróleo (PENNA, 2004).

De acordo com Videla & Herrera (2005) a adesão de microrganismos é amplamente aceita como um estágio inicial importante na indução do processo da CIM, já que se apresenta como um processo de acumulação de produtos isenta de uniformidade ao longo do tempo e espaço.

## **1.2 Consórcio microbiano: microbiologia e bioquímica do processo anaeróbio.**

A conversão dos compostos orgânicos pode ser descrita como um processo fermentativo, onde os microrganismos envolvidos apresentam uma relação de interdependência, simbiose, de forma que um grupo produz o substrato e as condições de microclima necessárias ao crescimento do outro até a completa oxidação da matéria orgânica. Assim, o processo biológico anaeróbio representa um sistema ecológico delicadamente balanceado, onde cada microrganismo possui uma função essencial.

A redução dos sulfatos, pela BRS, ocorre nas etapas finais deste processo, constituindo-se, também, em etapa do ciclo do enxofre.

O processo anaeróbio é dividido em três estágios:

- ▶ Primeiro Estágio: Hidrólise e Fermentação
- ▶ Segundo Estágio: Acetogênese e Desidrogenação
- ▶ Terceiro Estágio: Metanogênese

Na Figura 3 está representado um esquema do processo de degradação anaeróbia apresentando as três principais etapas envolvidas no processo bem como as diferentes classes de microrganismos responsáveis por cada etapa.

#### 1.2.1 Processo biológico anaeróbio: primeiro estágio

A primeira etapa da degradação anaeróbia corresponde a Hidrólise e Fermentação dos compostos orgânicos de cadeias longas. Nesta etapa há a atuação das bactérias fermentativas hidrolíticas, as quais são responsáveis pela hidrólise de polímeros - como carboidratos, proteínas e lipídeos, que são convertidos em moléculas menores, representadas por seus respectivos monômeros; os açúcares, aminoácidos e ácidos graxos. Essa conversão é realizada através da ação de exoenzimas (lípsases, proteases, celulasas e amilases) excretadas pelas células desse grupo de bactérias.

Os monômeros produzidos são assimilados pelas células, metabolizados por rotas fermentativas dando origem a outros compostos, os ácidos orgânicos voláteis (principalmente ácido acético), hidrogênio e dióxido de carbono.

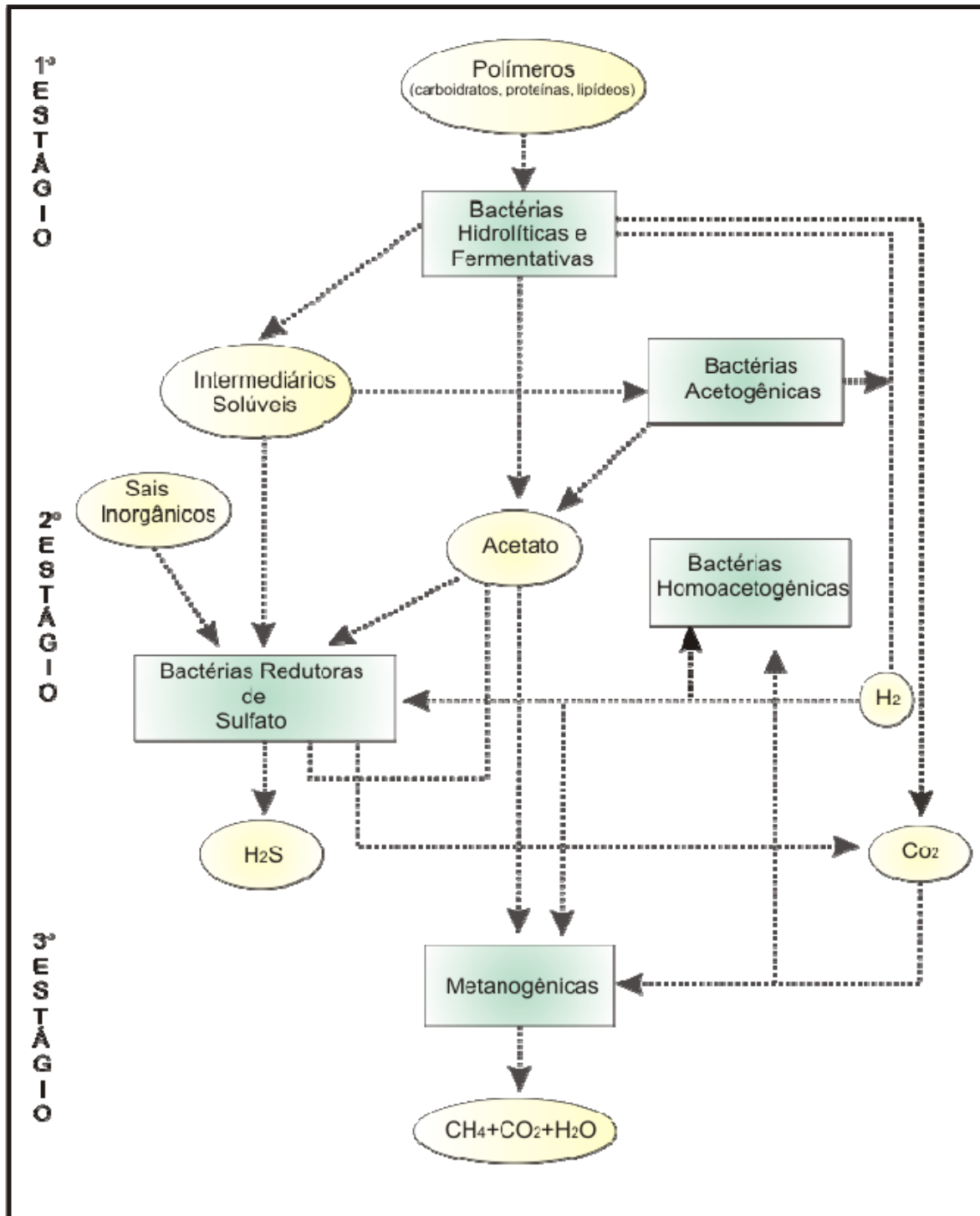


Figura 3 – Representação dos estágios da fermentação anaeróbica. (Adaptado de GONÇALVES, 2001).

As bactérias hidrolíticas fermentativas compreendem uma grande variedade de espécies, muitas são anaeróbias estritas, como as do gênero *Clostridium*, e algumas são facultativas, como as do gênero *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Escherichia* (GONÇALVES, 2001).

### 1.2.2 Processo biológico anaeróbio: segundo estágio

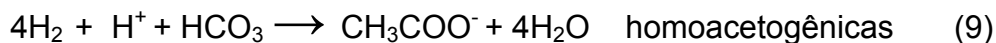
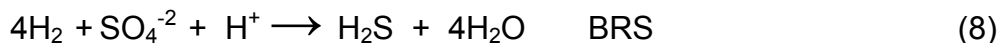
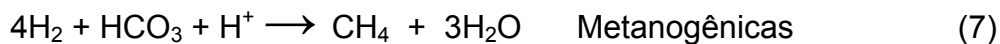
Após a conversão dos polímeros ocorrida na primeira etapa, os monômeros correspondentes são utilizados por um outro grupo de bactérias, as acetogênicas, que são responsáveis pela conversão dos aminoácidos, açúcares e os ácidos orgânicos em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. O hidrogênio produzido é consumido pelo grupo de bactérias metanogênicas hidrogenotróficas e convertido em metano, pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), e ainda pelas bactérias homoacetogênicas.

As BRS são normalmente encontradas em associação com as metanogênicas. A redução dos íons sulfato a sulfeto é energeticamente favorecida em relação à produção de metano. Em sistemas anaeróbios com concentrações baixas de íons sulfato elas exercem o papel de formadoras de substratos metanogênicos, principalmente acetato e hidrogênio a partir de outros substratos orgânicos solúveis (VAZOLLER, 1993). No entanto, em presença de elevadas concentrações de íons sulfato, as BRS passam a competir com as metanogênicas pelo mesmo substrato, isto é, acetato e H<sub>2</sub> (LIMA, 1996).

### 1.2.3 Processo biológico anaeróbio: terceiro estágio

A terceira etapa do processo de degradação anaeróbia tem como principal atuação as *Archae* metanogênicas que produzem o metano através da conversão do hidrogênio (homohidrogenotróficas) e através do acetato (acetotróficas). As espécies mais comuns de metanogênicas homohidrogenotróficas são representadas pelas espécies *Methanobacterium bryantii*, *Methanospirillum hungatei* e *Methanosarcina barkeri* e o principal gênero que compreende as acetotróficas são as *Methanosarcinas sp.* e *Methanothrix sp.* (VAZZOLER, 1993).

As reações de consumo de hidrogênio pelas bactérias metanogênicas, BRS e homoacetogênicas estão descritas nas reações 7, 8 e 9, respectivamente.



### 1.3 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) são um grupo distinto de microrganismos procarióticos, encontrados em uma variedade de nichos, que contribuem com diversas funções essenciais em muitos ambientes anaeróbios.

Esses microrganismos apresentam como principal característica a utilização do íon sulfato como acceptor final de elétrons para realização do seu processo bioenergético. Esse processo é denominado redução desassimilativa do íon sulfato.

Na redução desassimilativa, o íon sulfato atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica da mesma forma como atua o oxigênio na respiração convencional. Uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, porém, a maior parte é excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a  $\text{H}_2\text{S}$  livre (POSTGATE, 1984). Esse processo difere da redução assimilativa, realizada pelos demais seres (animais, fungos, vegetais e a maioria das bactérias), por não incorporar o sulfeto originado da redução do sulfato às várias moléculas orgânicas como os aminoácidos e as coenzimas (SINGLETON, 1993).

Uma ampla variedade de substratos pode ser utilizada pelas BRS, desde ácidos graxos a hidrocarbonetos aromáticos mais complexos (AKAGI, 1995), sendo que a maioria utiliza compostos orgânicos de baixo peso molecular, como



álcoois, ácidos graxos, lactato, acetato e piruvato. Na Tabela 1 encontram-se listados os substratos energéticos para as BRS, agrupados por classe conforme Colleran *et al.* (1995) *apud* Gonçalves (2001).

Tabela 1- Possíveis substratos energéticos para as BRS

<i>Classe das substâncias</i>	<i>Nome das substâncias</i>
Sais dos ácidos carboxílicos alifáticos	Formato, acetato, propionato, butirato, isobutirato, 2 metil butirato, 3 metil butirato, piruvato e lactato
Sais dos ácidos dicarboxílicos	Succinato, fumarato, malato, oxalato, maleinato, glutarato, pimelato
Álcoois	Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, isobutanol, 1-pentanol, etilenoglicol, 1,2-propanodiol, glicerol
Aminoácidos	Glicina, serina, alanina, cisteína, cistina, treonina, valina, leucina, isoleucina, aspartato, glutamato, fenilalanina
Açúcares	Frutose, glicose, manose, xilose, raminose
Compostos aromáticos	Acima de 35 compostos aromáticos, incluindo benzoato, fenol, indol, resorcinol, catecol, p-cresol, quinolina, fenilactato, vanilina, etc
Compostos inorgânicos	H <sub>2</sub>
Diversos	Betaína, colina, furfural, acetona, ciclohexanona

As BRS podem ser consideradas como um grupo taxonomicamente variado de bactérias que estão relacionadas de acordo com alguns aspectos fisiológicos e ecológicos (POSTGATE, 1984). A taxonomia desse grupo de microrganismos era considerada relativamente simples, entretanto pela descoberta de espécies representativas desse grupo, através do desenvolvimento de novas técnicas de

estudos genéticos ao longo dos anos, foi revelada a sua complexidade (SINGLETON, 1993; CASTRO *et al.*, 2000).

Segundo Gonçalves (2001), as BRS compreendem cerca de 20 gêneros representativas do Domínio Bacteria e um de Archae, apresentando diferentes características morfológicas e capacidade metabólica.

Quanto à morfologia, esses microrganismos se apresentam de forma variada, podendo existir na forma de bacilos ou víbrios, esféricas, ovais, ou ainda como células isoladas, em pares ou agregadas.

Segundo Fauque (1995), em ambientes naturais, a capacidade de adaptação a fatores físico-químicos e biológicos podem ser decisivos no crescimento e atividade dos microrganismos.

As BRS apresentam um crescimento mais favorável em condições aproximadamente neutras com uma faixa ideal de pH em torno de 7,0 a 7,8, e variações de 5,5 a 9,0. Alguns estudos observaram a presença de BRS em ambientes altamente ácidos com valores de pH em torno de 2,5 a 4,5 (GYURE *et al.*, 1990; FAUQUE, 1995), tal fato estabeleceu que as BRS encontradas em ambientes ácidos corresponderiam a um micronicho mais favorável a essa condição.

A temperatura favorável ao crescimento das BRS está relacionada com o meio ambiente do qual foram isoladas. Esses microrganismos apresentam uma ampla distribuição, podendo ser encontradas em solos, águas marinhas, poços artesianos, áreas geotérmicas, depósitos sulfurosos, entre outros (BARTON & TOMEI, 1995). Sendo que a grande maioria das espécies de BRS são mesofílicas, a melhor faixa de temperatura adequada ao crescimento desses microrganismos é de 28°C a 38°C, apresentando um limite superior de crescimento de até 45°C. As BRS termofílicas, representadas por algumas espécies do gênero *Desulfotomaculum* e as espécies do gênero *Thermodesulfobacterium*, apresentam uma faixa de temperatura ótima de crescimento que varia de 54°C a 70°C, com

um limite superior de crescimento entre 56°C e 85°C. Já as termófilas do gênero *Archaeoglobus* apresentam uma faixa de temperatura de crescimento de aproximadamente 83°C.

Uma espécie psicrófila também foi identificada, representativa do gênero *Desulfohopalus* sp. adaptada a crescer em temperaturas que variam de 0°C a 24°C (MADIGAN *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, as BRS eram vistas não só como organismos heterotróficos anaeróbios, mas também como organismos incapazes de tolerar o oxigênio, restritas a zonas anóxicas (BAUMGARTNER *et al.*, 2006). No entanto, a realização de pesquisas demonstrou que esses microrganismos têm a capacidade de sobreviver na presença de oxigênio molecular, podendo permanecer viável quando expostas a ambientes com oxigênio (FAUQUE, 1995; JOHNSON *et al.*, 1997; GONÇALVES, 2001; BAUMGARTNER *et al.*, 2006).

Os esquemas tradicionais para classificar as BRS utilizam-se de diferentes propriedades atribuídas a esses microrganismos, o que possibilita encontrar uma variedade de tipos de classificação realizada por diferentes pesquisadores. As Tabelas 2 e 3 foram compiladas baseadas em literatura (ODOM, 1993; FAUQUE, 1995; CASTRO *et al.*, 2000; MADIGAN *et al.*, 2004) e apresenta as principais características dos gêneros que compõe as BRS. Na Figura 4 é possível visualizar três espécies de BRS representativas dos gêneros mais conhecidos, *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*.

Tabela 2- Principais características dos gêneros de BRS que realizam oxidação incompleta de compostos orgânicos até acetato

Gênero	Morfologia	Célula Parede/membrana	Formação de esporos	Temperatura crescimento	Nº de espécies
<i>Desulfovibrio</i>	Vibrios ou bacilos	Gram (+)	Não	Mesofílica	11
				Termofílica	1
<i>Desulfotomaculum</i> <sup>(a)</sup>	Bacilos curvos	Gram (+)	endosporos	Mesofílica	6
				Termofílica	4
<i>Desulfomicrobium</i>	Bacilos	Gram (-)	Não	Mesofílica	3
<i>Desulfobulbus</i>	Células ovais ou em forma de limão	Gram (-)	Não	Mesofílica	3
<i>Desulfobotulus</i>	Víbrio	Gram (-)	Não	Mesofílica	1
<i>Desulfohalobium</i>	Bacilos curvos	Gram (-)	Não	Mesofílica	1
<i>Desulfofustis</i>	Bacilos	-	-	-	-
<i>Desulfobacula</i>	Células ovais ou esféricas	-	-	-	1
<i>Desulforhapalatus</i>	Bacilos curvos	Gram (-)	-	Mesofílica	1
				Psicrófila	1
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Bacilos pequenos	Gram (-)	-	Termofílica	2

\* Número de espécies de acordo com a temperatura de crescimento

(a) Algumas espécies têm a capacidade de realizar a oxidação completa dos compostos orgânicos até CO<sub>2</sub>

(Adaptado de ODOM, 1993; FAUQUE, 1995; CASTRO *et al.*, 2000; MADIGAN *et al.*, 2004)

Tabela 3- Principais características dos gêneros de BRS que realizam oxidação completa de compostos orgânicos até CO<sub>2</sub>.

<i>Gênero</i>	<i>Morfologia</i>	<i>Célula Parede/membrana</i>	<i>Formação de esporos</i>	<i>Temperatura crescimento</i>	<i>Nº de espécies</i>
<i>Desulfobacter</i>	Vibrios, bacilos, bacilos ovais	Gram (-)	Não	Mesofílica	4
<i>Desulfobacterium</i>	Células ovais ou em forma de limão Bacilos curvos ou ovais	Gram (-)	Não	Mesofílica	7
<i>Desulfococcus</i>	Células esféricas ou em forma de limão	Gram (-)	Não	Mesofílica	2
<i>Desulfomonile</i>	Bacilos	Gram (-)	Não	Mesofílica	1
<i>Desulfonema</i>	Células filamentosas	Gram variável	Não	Mesofílica	2
<i>Desulfosarcina</i>	Células agrupadas cúbica	Gram (-)	Não	Mesofílica	1
<i>Desulfoarculus</i>	Víbrios	Gram (-)	Não	Mesofílica	1
<i>Desulfacinum</i>	Células ovais ou esféricas	Gram (-)	-	Termofílica	1
<i>Desulforhabdus</i>	Bacilos	Gram (-)	Não	-	-
<i>Thermodesulforhabdus</i>	Bacilos	Gram (-)	-	Termofílica	1
<i>Archaeoglobus</i> *	Células esféricas	-	-	Termofílica	2

\* Pertence ao Domínio Archae

(Adaptado de ODOM, 1993; FAUQUE, 1995; CASTRO *et al.*, 2000; MADIGAN *et al.*, 2004)

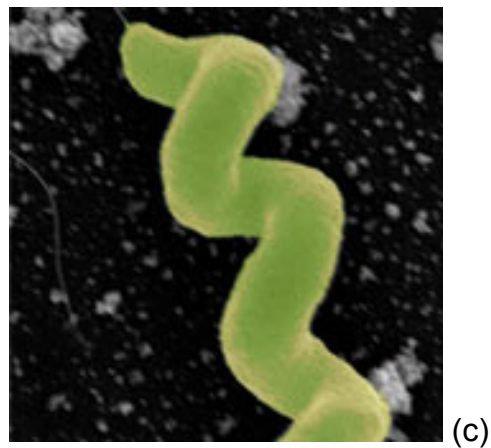
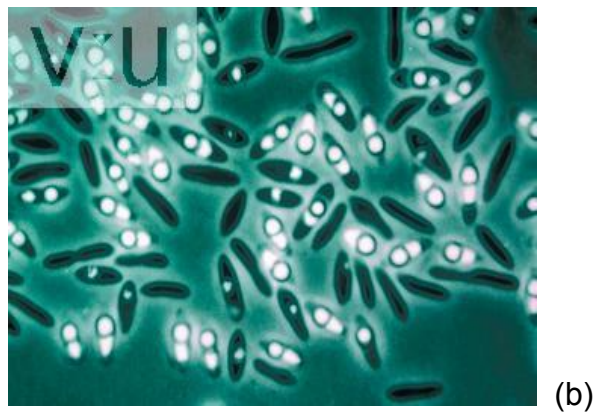
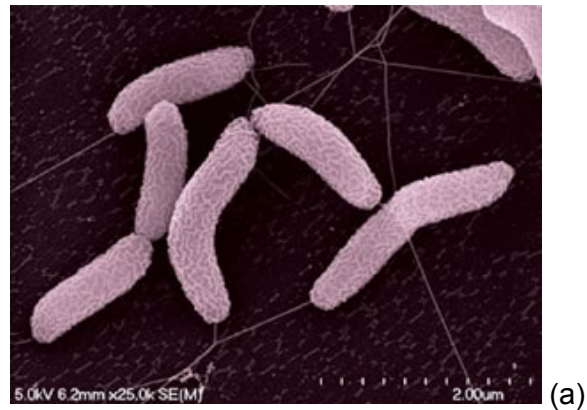


Figura – 4a *Desulfovibrio desulfuricans* ([www.lbl.gov](http://www.lbl.gov)) e 4b *Desulfotomaculum acetoxidans* ([www.visualsunlimited.com/.../303/303910.jpg](http://www.visualsunlimited.com/.../303/303910.jpg)) e 4c *Desulfovibrio vulgaris* (<http://www.genomenewsnetwork.org/articles/2004/08/19/genomesworld.php>).

### 1.3.1 Metabolismo das BRS

A redução do sulfato a  $H_2S$  é uma redução de oito elétrons e ocorre por meio de alguns estágios intermediários. O íon sulfato por ser estável, não pode ser reduzido antes de sua ativação. A ativação é realizada pelo ATP. A enzima ATP sulfurilase catalisa a ligação de um íon sulfato a um fosfato do ATP, levando à formação de AFS (adenosina fosfosulfato). Na redução desassimilativa, o sulfato do AFS é diretamente reduzido à sulfito pela enzima AFS redutase. Uma vez que o sulfito é formado, a enzima sulfito redutase catalisa sua conversão em sulfeto. (MADIGAN *et al.*, 2004).

As reações de transporte de elétrons ocorrem, a partir de uma força próton motiva (estado energizado da membrana) que dirige a síntese de ATP catalisada por uma ATPase (complexo enzimático de membrana). O citocromo é um dos principais carreadores de elétrons, responsável por receber os elétrons de uma hidrogenase e transferi-los para um complexo protéico associado à membrana, denominado Hcm, que os transporta através da membrana citoplasmática tornando-os disponíveis às AFS redutase e sulfito redutase (enzimas citoplasmáticas).

A enzima hidrogenase localizada na parte externa da membrana citoplasmática desempenha um papel fundamental para a conservação de energia durante a redução do sulfato realizada pelas BRS que crescem às custas do  $H_2$ , *per se*, ou de compostos orgânicos, como o lactato ou piruvato, conforme pode ser observado na Figura 5. Durante a oxidação do lactato a acetato observa-se a formação de  $H_2$ , que é permeável e difunde-se através da membrana. No lado externo da membrana é oxidado a  $H^+$  pelas hidrogenases, permitindo a formação da força próton motiva. Enquanto que os elétrons gerados durante a oxidação são primeiramente transferidos para o citocromo  $c_3$  (cyt  $c_3$ ) que, em seguida, os transfere para o complexo de citocromos (Hmc), responsável pelo transporte desses elétrons através da membrana até a flavodoxina e/ou ferredoxina. Essas enzimas irão fornecer os elétrons necessários para a formação do sulfito e para a sua redução até sulfeto. (MADIGAN *et al.*, 2004).

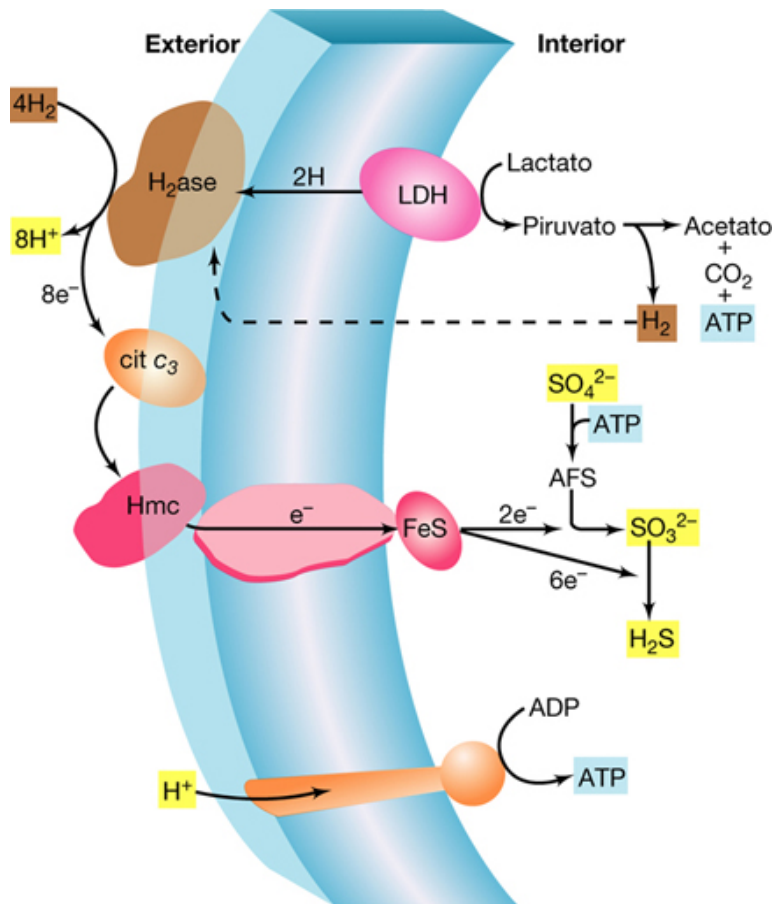


Figura 5 - Transporte de elétrons e conservação de energia nas BRS. (MADIGAN, *et al.* 2004). LDH - desidrogenase; H<sub>2</sub>ase - hidrogenase; cyt c<sub>3</sub> - citocromo c<sub>3</sub>; Hmc - complexo de citocromos; FeS - proteínas de Fe e S (flavodoxina e/ou ferredoxina); APS - adenosina fosfosulfato.



#### 1.4 Surfactantes

A definição do termo surfactante foi baseada na contração da palavra “surface – active - agent” em inglês, que descreve substâncias que possuem uma atividade superficial ou interfacial, caracterizada pela sua tendência de adsorver na superfície de sólidos bem como interfaces ar-água ou óleo-água.

Essas substâncias compreendem uma classe importante de produtos químicos muito utilizados em diversos setores industriais, uma vez que, devido a sua capacidade de alterar a tensão superficial e interfacial de fluidos, apresentam ação como substâncias detergentes, agentes humidificantes e emulsionantes (PIRES, 2002).

Os surfactantes possuem estrutura molecular anfipática, apresentando na mesma molécula uma porção hidrofílica (polar) e uma porção hidrofóbica (apolar) (ROCHA, 1999).

A classificação dos surfactantes é definida pela natureza da porção polar da molécula, ou seja, pelo caráter iônico da molécula. Dessa forma, quando a porção polar apresentar carga negativa, o surfactante é caracterizado como aniônico; carga positiva, catiônico; carga positiva e negativa, zwitteriônico ou anfotérico; e quando sem carga, não – iônico (PIRES, 2002).

A porção hidrofóbica, geralmente é constituída por uma cadeia de hidrocarbonetos enquanto que a porção hidrofílica apresenta grupos específicos de acordo com a classe do surfactante. Nos surfactantes aniônicos a porção hidrofílica é representada por um grupo sulfato, sulfonato ou carboxilato; enquanto que os grupos presentes nos surfactantes catiônicos são representados por sais quaternários de amônio e nos surfactantes não-iônicos por polioxietilenos (VOLKERING *et al.*, 1998).

Os grupos hidrofílicos são muitas vezes chamados "cabeças" e os grupos hidrofóbicos são chamados "caudas" (Figura 6).



Figura 6 – Monômero de surfactante: fração polar (cabeça) e a fração apolar (cauda).

#### 1.4.1 Concentração micelar crítica (CMC) e balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)

Uma característica importante dos surfactantes é a formação de micelas, que consistem em pequenos agregados de moléculas do surfactante.

O processo de micelização ocorre quando o surfactante é adicionado à água: uma parte é dissolvida como monômeros e outra parte forma uma monocamada na interface ar/água. As moléculas da monocamada estão em equilíbrio com os monômeros em solução, e a cada concentração de monômeros corresponde uma tensão superficial característica. Quando a concentração de monômero atinge um valor crítico, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC), o surfactante adicionado começa a associar-se na forma de micelas. Tal processo ocorre espontaneamente. Na Figura 7 está representada o processo de micelização.

A CMC depende da estrutura da parte hidrofóbica da molécula do surfactante, ou seja, do tamanho da molécula do hidrocarboneto, e das condições experimentais como a força iônica, a temperatura, contra-íons, etc (MANIASSO, 2001). Além disso, cada surfactante possui um valor específico de CMC (VOLKERING *et al.*, 1998). Esse valor pode ser determinado através do estudo de diferentes propriedades como condutividade elétrica, pressão osmótica, crioscopia, viscosidade, índice de refração (PIRES, 2002), viragem de cor com

corantes e espuma e pela determinação da tensão superficial (BEHRING *et al.*, 2004).

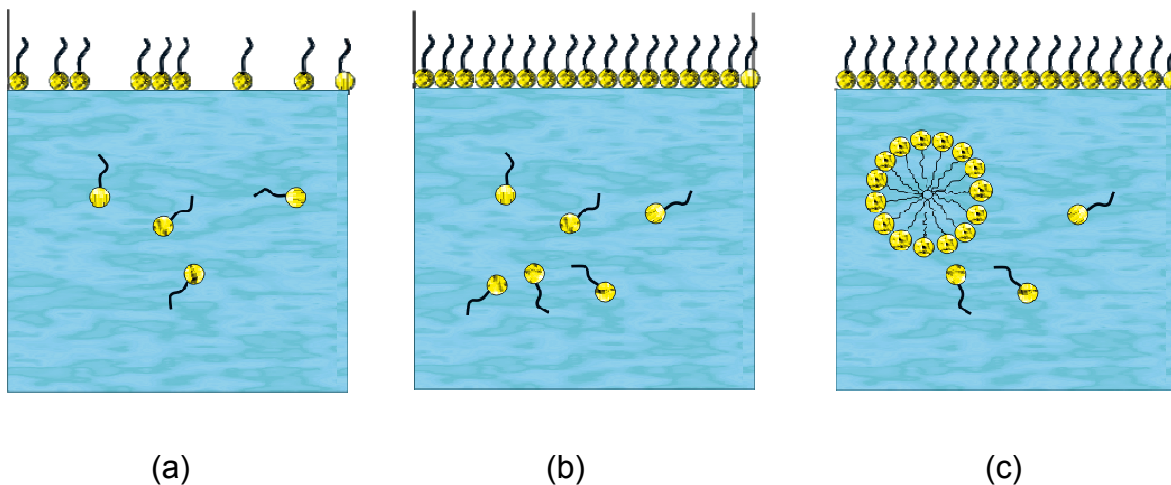


Figura 7 – Representação do Processo de Micelização: (a) e (b) Monômeros do surfactante dispersos na água, (c) Micelas formadas com aumento da concentração de surfactantes (Adaptado de MANIASSO, 2001).

O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações. Além da tensão superficial, outras propriedades físico-químicas, como pressão osmótica e condutividade (só para tensoativos iônicos), solubilidade e detergência também sofrem variações em função da concentração do surfactante. Na Figura 8 é representada a variação de algumas propriedades e nela pode-se observar a mudança de comportamento que as mesmas experimentam ao alcançar a CMC.

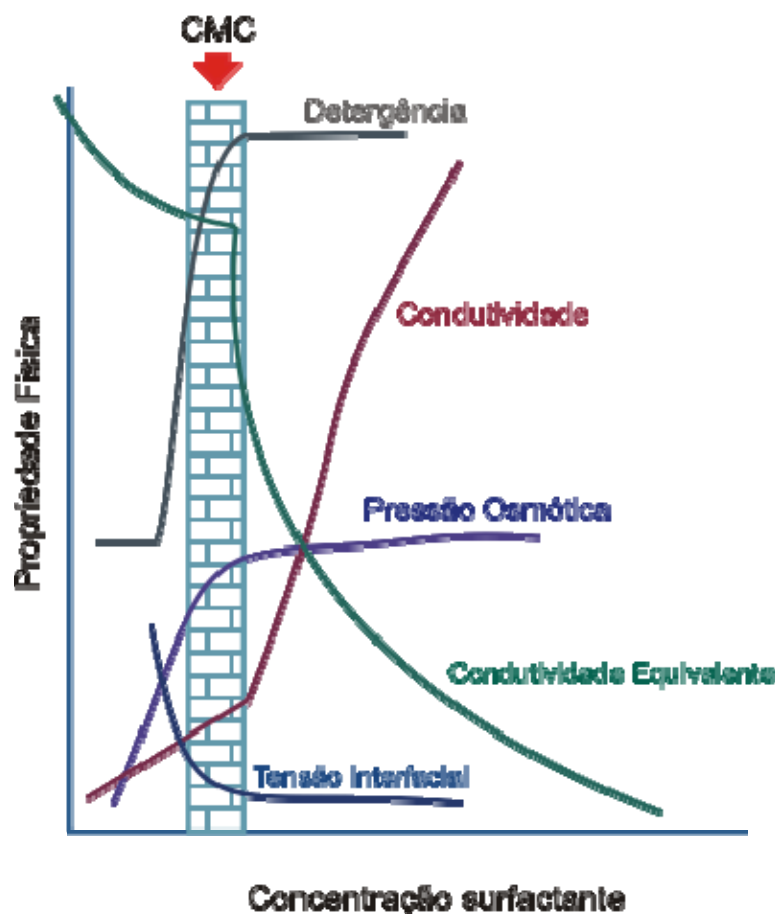


Figura 8 - Variação de algumas propriedades físico-químicas. A área hachurada corresponde à CMC (Adaptado de ELWORTHY (1968) *apud* PIRES (2002)).

Outro aspecto importante dos surfactantes é o valor de HLB, “balanço hidrofílico - lipofílico”, que é uma medida do tamanho e intensidade da porção hidrofílica e hidrofóbica da molécula do surfactante. O valor de HLB pode ser consultado para auxiliar na seleção preliminar do surfactante de acordo com a finalidade a que se pretende empregá-lo (LEE *et al.*, 2005; ROCHA, 1999).

De acordo com Lee *et al.* (2005), surfactantes que apresentam diferentes grupos funcionais, porém valores aproximados de HLB possuirão solubilidades similares. Assim, a máxima solubilização de uma dada família química de um surfactante será alcançada com um valor específico de HLB. Compostos onde o valor de HLB é elevado indicam que o número de grupos polares apresenta-se em

maior porcentagem em relação aos grupos apolares, demonstrando um caráter hidrofílico dominante, assim, com maior afinidade a fase aquosa.

Os surfactantes não-iônicos geralmente apresentam valores de HLB entre 8 a 16 (Tween, Brij, Triton) o que lhes conferem uma maior eficiência na solubilização de compostos orgânicos hidrofóbicos presentes no solo. A hidrofobicidade dessas substâncias está relacionada com o tamanho da cadeia de etoxilato presente, quanto maior a cadeia, maior o caráter hidrofóbico (TIEHM, 1994).

Quanto à toxicidade, os surfactantes catiônicos apresentam maior grau de toxicidade em relação aos demais, sendo mais nocivo e muitas vezes apresentam acentuada atividade bactericida. Em menor grau estão os surfactantes aniônicos seguidos pelos não – iônicos (VOLKERING, 1995).

#### 1.4.2 Os surfactantes e solubilização do petróleo

O petróleo consiste de uma mistura de inúmeras substâncias orgânicas, predominantemente de hidrocarbonetos, que diferem em solubilidade, volatilidade e susceptibilidade à degradação por microrganismos. Embora os hidrocarbonetos aromáticos possam ser degradados, a taxa e/ou habilidade desse processo diminui na mesma proporção do aumento de anéis benzênicos, baixa disponibilidade de oxigênio, nutrientes, entre outros fatores (CRAPEZ, 2001).

O óleo cru proveniente do petróleo é um material altamente hidrofóbico, o que lhe confere baixa solubilidade na água. Nesse contexto, o emprego de surfactantes tem sido amplamente estudado por diferentes autores (KUYUKINA *et al.*, 2005).

Segundo Volkering (1995) o efeito de surfactantes na biodisponibilidade de substâncias orgânicas pode ser explicada por três mecanismos:

- dispersão de hidrocarbonetos (fase líquida), levando a um aumento da área de contato, causada pela redução da tensão interfacial entre a fase aquosa e o hidrocarboneto;

- aumento da solubilidade da substância hidrofóbica causada pela presença de micelas em solução, as quais provocam a “divisão”, a partição do hidrocarboneto e transferem para a célula (Figura 9).

- facilitar o transporte do poluente da fase sólida para a fase aquosa.

Os dois últimos mecanismos podem causar um aumento na taxa de transferência de massa do hidrocarboneto para a fase aquosa.

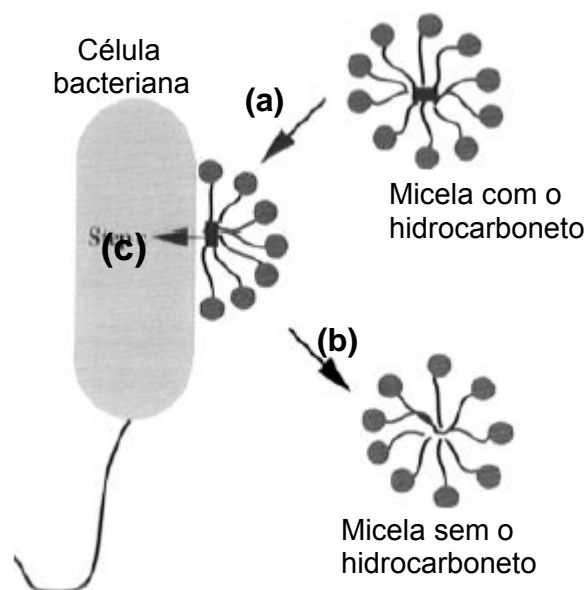


Figura 9 - Mecanismo de biodisponibilização do contaminante, no interior das micelas. (a) Transporte do hidrocarboneto através da micela para a proximidade da célula; (b) Troca do conteúdo micelar (c) Transferência do contaminante para a célula (GUHA & JAFFE, 1996)

Muitos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de aumentar a biodegradação de compostos poliaromáticos através do emprego de surfactantes sintéticos para um aumento da sua solubilização (VOLKERING *et al.*, 1995;

VOLKERING *et al.*, 1998; DOONG & LEI, 2003). No entanto, são encontrados na literatura resultados contraditórios relacionados a biodegradação de contaminantes, com efeitos inibitórios na presença de surfactantes (GRIMBERG *et al.*, 1995; STELMACK *et al.*, 1999) e aumento na taxa de biodegradação (VOLKERING *et al.*, 1995; TIEHM, 1996).

## 1.5 Quantificação celular

### 1.5.1 Considerações teóricas do número mais provável

Testes de diluição em série são normalmente empregados para estimar a concentração microbiana presente numa amostra quando outros métodos mais precisos de contagem direta não estão disponíveis. A literatura dos métodos estatísticos para a interpretação dos padrões de resultados positivos e negativos é ampla e variada, sendo difícil saber as razões pela qual um determinado método foi escolhido pelos organismos reguladores. Nesta dissertação foi incorporado um método robusto para a detecção da concentração microbiana desenvolvido pela US Food and Drug Administration - FDA utilizando uma planilha Excel (GARTHIRGHT & BLODGETT, 2003).

O número mais provável (NMP) é a concentração na qual o resultado observado ocorre com o máximo de probabilidade, sendo um tratamento padrão amplamente conhecido. McCrady (1915) foi o primeiro a publicar uma estimativa precisa do número de bactérias pelo método NMP. Posteriormente, Halvorson e Ziegler (1933), Eisenhart e Wilson (1943) e Cochran (1950) publicaram artigos sobre os fundamentos estatísticos do NMP.

Roussanov *et al.* (1996) desenvolveram um programa computacional baseado no tratamento *Bayesiano* para estimar a densidade bacteriana a partir dos dados de diluições em série. Este programa calcula um valor esperado, uma moda (equivalente ao tradicional NMP) e uma mediana, como estimativas pontuais da densidade bacteriana. O valor esperado ou esperança é o valor resumido que incorpora a forma e a assimetria da distribuição. Por outro lado, a moda (NMP)

somente utiliza o valor mais provável e ignora outros valores consistentes com os dados. Nesse caso, o NMP subestima a densidade bacteriana e usualmente produz erros enormes. Ainda assim, os autores recomendam usar a esperança como um estimador para muitos problemas de contagem microbiana. Posteriormente, Garthright (1997) explicou que a análise Bayesiana fornece resultados tendenciosos, pois a média da distribuição serve como um estimador pontual, porém o intervalo estimado é inconsistente com o uso da média. Em virtude deste fato, Roussanov *et al.* (1996) modificaram a proposição sugerindo apresentar os resultados em escala logarítmica, os quais fornecem médias próximas dos valores de NMP.

Irwin *et al.* (2000) recomendaram o método Gauss-Newton modificado como uma aproximação do NMP porque ele oferece uma maneira “mais suave” de avaliar a improbabilidade do resultado e ajustar os intervalos de confiança. Haas (1989) & Klee (1993) sugeriram o uso de NMP corrigido para contornar a tendência positiva nos valores aritméticos da estimativa do NMP. Uma tendência existe para uma determinada concentração se o valor esperado, para muitas repetições de um mesmo teste, for maior ou menor do que o valor real. Um estimador para a concentração não tendencioso, quando expresso em valores aritméticos, irá sempre ser tendencioso se for expresso em valores logarítmicos e vice-versa. Portanto, é necessário decidir qual é a unidade que a tendência deve ser considerada. Embora, Garthright (1996) tenha mostrado que a tendência possa ser corrigida em escala logarítmica, estas correções são muito pequenas e podem ser desprezadas. Por este motivo, a FDA prefere o método do NMP sem correção de tendência como uma estimativa pontual da densidade bacteriana.

Uma discussão deste método fornece o padrão para outros métodos: primeiro, determina a probabilidade de crescimento em um tubo; segundo, forma a função de probabilidade; terceiro, determina os valores dos parâmetros que maximizam a função de probabilidade para os dados observados (BLODGETT & GARTHRIGHT, 1998; BLODGETT, 2006; BLODGETT, 2005), estabelecendo as seguintes suposições:



- a) As bactérias são distribuídas aleatoriamente dentro das amostras;
- b) As bactérias são separadas, não formam aglomerados e não se repelem;
- c) Cada tubo, cujo inoculo contendo pelo menos um microrganismo será capaz de produzir um crescimento ou uma mudança detectável.
- d) Os tubos individuais das amostras são independentes.

Para a descrição matemática do modelo empregado para a estimativa do NMP, adicionou-se um texto introdutório (Anexo I), a respeito das distribuições Binomial e Poisson. Estas distribuições servem de base para a dedução da equação que estima a densidade microbiana. Portanto, seja  $\lambda$  a concentração do microrganismo na solução original,  $k$  o número de diluições,  $z_j$  o volume de amostra original colocada em cada tubo na  $j$ -ésima diluição,  $n_j$  o número de tubos na  $j$ -ésima diluição e  $x_j$  o número de tubos positivos em cada diluição. A distribuição de Poisson fornece a probabilidade para um tubo que, na  $j$ -ésima diluição, que não mostra crescimento é igual a  $\exp(-\lambda z_j)$ . Em conseqüência, a probabilidade do resultado expressa por uma distribuição binomial com o parâmetro da distribuição de Poisson igual a

$$\prod_{j=1}^k \binom{n_j}{x_j} \left(1 - e^{-\lambda z_j}\right)^{x_j} e^{-\lambda z_j (n_j - x_j)} \quad (10)$$

O número mais provável é o valor de  $\lambda$  que maximiza a equação (10) ou de forma equivalente, torna a primeira derivada do logaritmo natural da probabilidade igual à zero.

$$R(x_1, \dots, x_k; \lambda) = \sum_{j=1}^k x_j z_j / \left(1 - e^{-\lambda z_j}\right) - \sum_{j=1}^k n_j z_j = 0 \quad (11)$$

Reordenando-se a equação (11), obtém-se

$$\sum_{j=1}^K \frac{x_j z_j}{1 - \exp(-\lambda z_j)} = \sum_{j=1}^K n_j z_j \quad (12)$$

Geralmente, esta equação pode ser resolvida por um processo iterativo. Procedimentos iterativos, tal como o de Newton-Raphson, podem fornecer resultados precisos. No entanto, outros procedimentos iterativos requerem a definição de limites de confiança.

Os testes padrão de diluição em série utilizam um fator de diluição igual a 10, com o mesmo número de tubos em cada diluição e entre um e dez tubos por diluição. Os métodos preferidos da FDA são aqueles que utilizam três, cinco, oito e dez tubos por diluição. Normalmente emprega-se três tubos em cada diluição por motivos econômicos.

Algumas vezes ocorrem resultados que deveriam ser extremamente improváveis nas condições estabelecidas, pode-se então atribuir a estes resultados a violações dos pressupostos. Tais violações poderiam ser originadas de erros laboratoriais, da presença de contaminantes tóxicos, da interferência de outros microrganismos com o microrganismo em teste ou da aglomeração dos microrganismos. Nestes casos não deve-se considerar o NMP como uma estimativa confiável. Na verdade, resultados extremamente improváveis necessitam ser examinados para saber se eles devem ser tratados estatisticamente como valores atípicos (WOODWARD, 1957; TAYLOR, 1962; DE MAN, 1977). Em virtude destes problemas, Blodgett e Garthright (1998) publicaram um artigo com vários modelos matemáticos para estimar a concentração de microrganismo na presença de fatores interferentes.

Para as tabelas existentes no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) da FDA foi adotado um tratamento similar ao feito por De Man (1977). Para cada resultado, foi calculado o seu NMP e a probabilidade. Rejeita-se um resultado em particular como improvável se a probabilidade total de todos os resultados for menor ou igual a 0,99985. Por exemplo, no teste de diluição em série com três

tubos é tecnicamente possível obter o resultado (0, 0, 3) com um inoculo de (0,1; 0,01 e 0,001 g). Neste caso o NMP deve ser 9/g com uma probabilidade de  $4 \times 10^{-8}$ , entretanto adotando-se o critério de probabilidade, deve-se excluir este resultado. Por este motivo, adotou-se o *grau de improbabilidade* das tabelas padronizadas do BAM. A versão mais recente do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* e os manuais recentes do US Departamento de Agricultura adotam procedimento similar.

Atualmente existem muitos cálculos computacionais que estimam o NMP com a precisão necessária. Um dos métodos aceitos utiliza o cálculo do intervalo de confiança para o resultado do NMP. Um intervalo de confiança de 95% indica que a probabilidade é de 95% da concentração real estar contida no intervalo de confiança associado ao resultado do teste. De Man (1977) sugeriu um método amplamente adotado de calcular os intervalos de confiança que satisfaçam os critérios acima. Estes intervalos são mais estreitos que os derivados por outros métodos (por exemplo, GARTHRIGHT & BLODGETT, 1996) e não são exagerados para levar a uma grande imprecisão do NMP.

Os limites de confiança obtidos a partir da equação (12), citados neste trabalho, foram deduzidos por Blodgett (2006; *ibid.* 2005a; *ibid.* 2005b; *ibid.* 2000). Estes limites inferior e superior do NMP ( $\lambda$ ) são obtidos da combinação das desigualdades da equação (13)

$$\frac{\sum_{j=1}^K x_j}{\sum_{j=1}^K \left( n_j - \frac{x_j}{2} \right) v_j} \leq \lambda \leq \frac{\sum_{j=1}^K x_j}{\sum_{j=1}^K (n_j - x_j) v_j} \quad (13)$$

onde, no mínimo, um valor de  $x_j < n_j$ . Em conseqüência, os limites inferior e superior do NMP podem ser calculados pela equação acima sem fazer o uso de tabelas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

As populações microbianas (Bactérias Redutoras de Sulfato e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais) consideradas nos testes foram compostas pelas microbiotas naturais presentes nas amostras de óleo coletadas. As BRS e as BANHT foram quantificadas pelo método do Número Mais Provável (NMP).

### 2.1 Caracterização das amostras

As amostras empregadas no presente trabalho foram cedidas pelo CENPES/PETROBRÁS. As amostras foram coletadas nos tanques de armazenamento de óleo e de água localizados no terminal São Sebastião, município situado no litoral norte do estado de São Paulo.

Foram estabelecidas três amostras com diferentes proporções de óleo em relação à água a fim de que fosse avaliado o comportamento do crescimento de BRS e BANHT presentes nessas amostras.

As amostras foram classificadas em:

- ▶ A - Óleo contaminado com água;
- ▶ B - Óleo e água
- ▶ C – Água contaminada com óleo

#### 2.1.1 Determinação da concentração de sulfetos totais nas amostras

A presença de BRS na amostra pode ser verificada, por via indireta, através da determinação de sulfetos totais na amostra. Assim, foi determinada a concentração de sulfetos, solúveis e insolúveis, nas amostras A, B e C.

A determinação de sulfetos envolveu três etapas, a saber:

*1ª. Etapa: Determinação do H<sub>2</sub>S insolúvel.*

Foi adicionado 1 ml de HCl 6M em 50 ml de amostra acondicionada em frasco de vidro lacrado. Em seguida, os frascos foram colocados em banho-maria a 50°C por 30 minutos.

*2ª Etapa: Arraste do H<sub>2</sub>S por gás inerte (N<sub>2</sub>) e absorção em solução alcalina de sulfato de cádmio.*

Nessa etapa as amostras foram purgadas com nitrogênio utilizando um cateter parenteral. A agulha e o cateter plástico foram introduzidos através do septo de borracha, sendo a agulha introduzida até o seio do líquido. Em seguida o cateter plástico foi conectado ao sistema de absorção de H<sub>2</sub>S e a injeção do gás de arraste foi iniciada através da agulha. O sistema de absorção é constituído por um frasco impinger contendo 50 mL da suspensão de CdSO<sub>4</sub>.9H<sub>2</sub>O em meio alcalino, mantido sob refrigeração e em ausência de luz. A vazão de N<sub>2</sub> foi regulada em 100 mL/min com tempo de purga de 30 minutos.

*3ª Etapa: Quantificação do H<sub>2</sub>S por espectrofotometria - método do azul de metileno.*

O H<sub>2</sub>S foi precipitado como sulfeto de cádmio e, liberado em meio ácido reagindo com N,N,dimetil-pfenilenodiamina, em presença de cloreto férrico como catalisador, formando o núcleo do azul de metileno. A absorvância foi medida, após período de 20 minutos, em comprimento de onda de 670 nm. Para corrigir o deslocamento do zero, associado à coloração devida ao excesso de cloreto férrico, recomenda-se a adição de solução de fosfato monoácido de amônio.

## 2.2 Quantificação de BRS e BANHT

A quantificação dos grupos microbianos de interesse foi realizada utilizando-se o método do Número Mais Provável (NMP).

O NMP é um método que possibilita estimar a densidade de bactérias em uma amostra. O método baseia-se na utilização de uma série de frascos de volume pequeno (10 mL aproximadamente) contendo uma quantidade fixa (9 mL) de meio líquido seletivo para o microrganismo que se quer avaliar.

Este método assume que as bactérias são normalmente distribuídas no meio líquido, o que pressupõe que o número de organismos esperado seja igual em amostras do mesmo tratamento.

No presente trabalho foram realizadas diluições que variaram de  $10^0$  a  $10^8$  para cada grupo de microrganismo a ser quantificado. A inoculação foi realizada em triplicata para cada diluição efetuada. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

Assim, inicialmente, três frascos contendo o meio de crescimento, foram inoculados assepticamente com 1 mL da amostra. Adicionou-se igual volume de amostra (1 mL) à solução diluição correspondente à primeira diluição ( $10^1$ ). Posteriormente, os próximos frascos contendo o meio de cultura foram inoculados com 1 mL desta primeira diluição (1:10) e assim sucessivamente. Para uma melhor compreensão, na Figura 10 está representado um esquema do método do NMP.

Os frascos inoculados foram incubados em estufa a temperatura de 30°C por um período de 28 dias e o crescimento foi monitorado a cada 7 dias.

A positividade da presença de BRS nos frascos se manifesta através de um enegrecimento do meio decorrente da redução do sulfato a sulfeto, o qual, posteriormente, reage com o  $\text{Fe}^{+2}$  presente em solução, formando o sulfeto ferroso

A positividade do meio para o crescimento das BANHT é confirmada através da mudança de coloração e turvação aparente no meio de cultura.

A quantificação das BRS e BANHT nas três amostras estudadas (A, B e C) foi realizada na presença e na ausência dos surfactantes (controle). Os surfactantes foram adicionados em alíquotas de 0,2 mL à solução diluição, antes da inoculação.

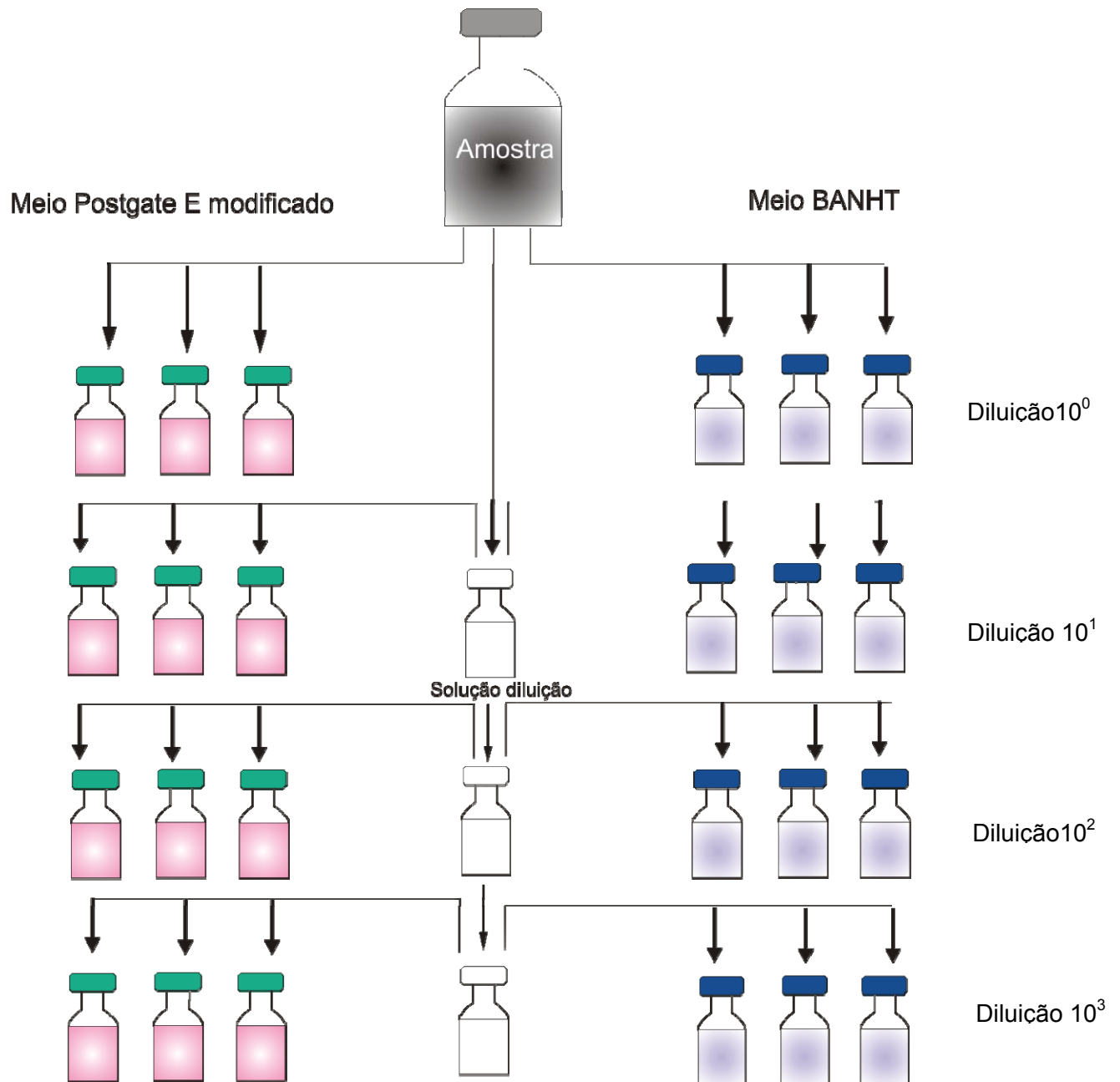


Figura 10 - Representação do Método do NMP em triplicata adotado para BRS e BANHT.

### 2.3 Seleção dos surfactantes

Foram usados quatro tipos de surfactantes de diferentes classes, sendo dois deles representativos dos não – iônicos, um catiônico e, por último, um aniônico. Os surfactantes empregados e suas propriedades estão apresentados na Tabela 4.

O surfactante Tween 60 (Polisorbato 60) foi obtido da Oxiteno, o Tween 80 (Polisorbato 80) da Merck, o CTAB (Cetrimide) e o SDS (Lauril Sulfato de Sódio) da Vetec Química Fina, Rio de Janeiro.

Tabela 4 – Surfactantes empregados e as suas principais características.

<i>Surfactantes</i>	<i>Classificação</i>	<i>Massa molecular (g/L)</i>	<i>*CMC (%)</i>	<i>**HLB</i>
Tween 60	Não-iônico	1311	0,003	14,9
Tween 80	Não-iônico	1309	0,001	15
CTAB	Catiônico	364.5	0,036	-
SDS	Aniônico	288.4	0,036	40

\* CMC: Concentração Micelar Crítica \*\* HLB: “Balanço Hidrofílico - lipofílico”

Após uma avaliação da literatura (GIBSON *et al.*, 1987; RODRIGUES *et al.*, 2001; MARGESIN & Schinner, 1998; CUNY *et al.*, 1999; SUCHANECK *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2001; RAJAGOPAL *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005) foram estipuladas quatro concentrações para cada surfactante selecionado.

No caso dos surfactantes não-iônicos (Tween 60 e Tween 80), foram considerados valores abaixo e acima de suas respectivas CMCs (Concentração Micelar Crítica) apresentadas na tabela anterior (Tabela 4). Nas concentrações acima da CMC



é possível avaliar se a presença de micelas em solução propiciará um melhor efeito na solubilização do óleo presente nas amostras e, conseqüentemente, um possível aumento na quantificação dos microrganismos de interesse (BRS e BANHT).

Os surfactantes iônicos apresentam uma maior toxicidade em relação aos não-iônicos, portanto as concentrações estipuladas para os testes com o CTAB e o SDS foram inferiores às suas CMCs, 0,0364% e 0,036%, respectivamente.

As concentrações empregadas para cada surfactante estão sumarizadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações dos surfactantes empregadas na quantificação microbiana de BRS e BANHT.

Tween 60	Tween 80	CTAB	SDS
Concentração (% m/v)	Concentração (% m/v)	Concentração (% m/v)	Concentração (%m/v)
0,03	0,03	0,00001	0,05
0,01	0,01	0,00005	0,01
0,003	0,001	0,00010	0,001
0,0002	0,0002	0,00015	0,005

As soluções correspondentes à cada concentração foram preparadas e esterilizadas por meio de filtração à vácuo em membrana Millipore de 0,45 µm, em câmara de fluxo laminar.

## 2.4 Meios de cultura

### 2.4.1 Meio Postgate E – modificado

O meio nutritivo Postgate E é empregado para a detecção, contagem e seleção de culturas de BRS, conforme descrito por Postgate (1984). Os componentes que constituem o meio Postgate E – modificado, bem como as quantidades necessárias para o volume total de 1 L estão listados na Tabela 6.

O agar-agar foi solubilizado separadamente sob agitação e leve aquecimento em recipiente adequado. O ágar em temperaturas menores que 45°C gelifica não sendo considerado como fonte de nutrição para bactérias, sendo utilizado como agente solidificante. Para as BRS, o ágar na concentração usada garante um meio semi-sólido que permite uma diminuição de oxigênio no meio.

O pH do meio foi ajustado para 7,6 com a solução de NaOH 1N. Após o preparo, o meio foi, então, distribuído (9 mL de meio) em frascos tipo penicilina com 10 mL de capacidade, vedados com tampa de borracha e lacre metálico. Após o procedimento descrito, o meio foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos, à 121°C (pressão de 1,1 atm).

Devido às características das BRS, requer-se um potencial redox de -100 mV para o meio de cultura (POSTGATE, 1984). Para tal, fez-se uso da adição de uma solução de tioglicolato de sódio (12,4 g/L), o qual irá atuar como agente redutor do meio. O tioglicolato foi preparado e esterilizado em separado, sendo que alíquotas de 0,1 mL foram adicionadas ao meio E antes da inoculação.

Tabela 6 – Composição do Meio de Cultura Postgate E - Modificado para o volume total de 1 L.

<i>Composição</i>	<i>Quantidade</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,0 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,83 g
Lactato de Sódio	7,0 mL
Extrato de levedura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Agar-agar	1,9 g
Resazurina	4,0mL de solução 0,025% m/v
NaCl	35 g

#### 2.4.2 Meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT)

O meio de cultura para BANHT foi preparado sob condições anaeróbias, seu pH ajustado para 7,6 e esterilizado em autoclave à 121°C (pressão de 1,1 atm) por 20 minutos. A esterilização foi realizada após a distribuição de 9 mL de meio, em frascos do tipo penicilina com volume de 10 mL, que foram tampados e lacrados.

Os componentes do meio de cultura para quantificação das BANHT estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição do meio de cultivo para quantificação de BANHT para o volume total de 1 L.

<i>Composição</i>	<i>Quantidade</i>
Glicose	5,0 g
Peptona universal	4,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Resazurina	4,0 mL de solução 0,025% m/v
NaCl	35 g

A adição da solução de tioglicolato também foi realizada, seguindo o mesmo procedimento descrito no item III.4.1.

#### 2.4.3 Solução diluição

A composição da solução redutora para o volume total de 1 L está representada na Tabela 8.

A solução redutora empregada para a série de diluições foi preparada sob purga de nitrogênio. Ao final do preparo, o pH foi ajustado para 7,6 com a solução de NaOH 1 mol/L e foi realizada a transferência para os frascos de penicilina (9 mL para cada frasco). Após a etapa de vedação com tampa de borracha e tampa metálica, os frascos foram autoclavados durante 20 minutos, à 121°C.

Tabela 8 – Composição da solução redutora para o volume total de 1 L.

<i>Composição</i>	<i>Quantidade</i>
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido Ascórbico	0,1 g
Resazurina	4,0 mL de solução 0,025% p/v
NaCl	35 g

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão apresentados e discutidos, a seguir, os resultados obtidos para cada grupo de microrganismo estudado, Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT), na presença de cada surfactante selecionado.

A análise dos resultados obtidos nos ensaios realizados com as amostras A, B e C, com o emprego dos surfactantes Tween 60, Tween 80, CTAB e SDS, será realizada mediante a comparação com os resultados obtidos sem a adição dessas substâncias (Controle).

Todos os resultados encontram-se no Anexo II, os quais foram calculados utilizando uma Tabela de NMP e uma Planilha eletrônica. Os gráficos apresentados no presente trabalho foram compilados com os resultados obtidos da Tabela de NMP.

#### 3.1 Determinação dos sulfetos totais nas amostras de petróleo

A concentração de sulfetos totais presentes nas amostras A – óleo contaminado com água (óleo praticamente isento de água); B: água e óleo; e C: água contaminada com óleo, estão apresentadas na Tabela 9 .

Tabela 9 – Concentração de sulfetos totais nas amostras A, B e C.

<i>Amostras</i>	<b>Concentração sulfetos totais</b> <i>(ppm)</i>
A	0,11
B	0,13
C	3,75

Dentre as amostras avaliadas, a amostra C apresentou maior concentração de sulfetos totais (3,75 ppm) em relação às demais. A amostra C é a que apresenta uma proporção de água superior a quantidade de óleo quando comparada as amostras A e B.

As amostras A e B apresentaram concentrações de sulfetos similares, 0,11 ppm e 0,13 ppm, respectivamente. Apesar da amostra B apresentar óleo em sua constituição, não foi possível visualizar as duas frações em um funil de decantação, uma vez que a água encontrava-se bastante escurecida.

### 3.2 Quantificação da população de bactérias redutoras de sulfato e bactérias anaeróbias heterotróficas totais na ausência de surfactante.

A Figura 11 apresenta os resultados dos ensaios realizados para quantificar a concentração de BRS e BANHT nas amostras A, B e C sem a adição de surfactante.

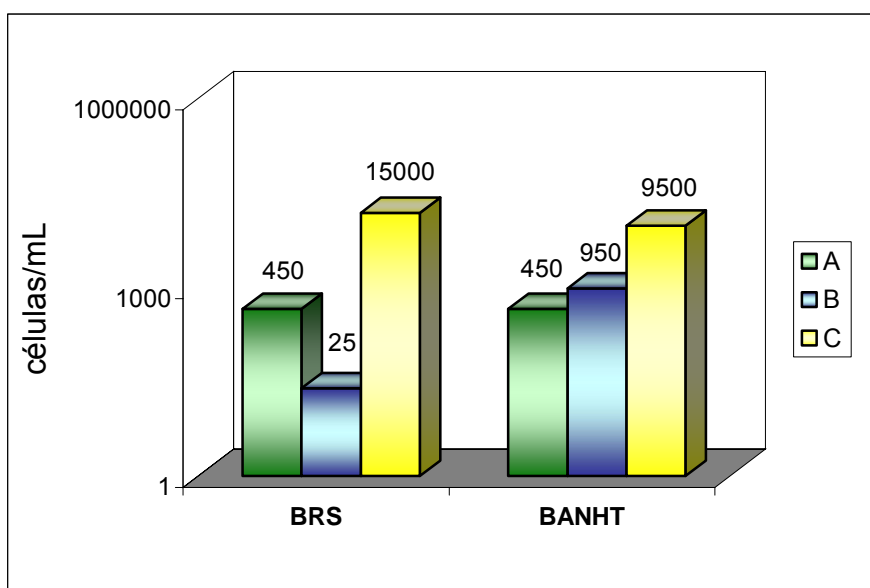


Figura 11 - Concentração de BRS e BANHT, em termos de NMP de células por mL, na ausência de surfactantes, para as amostras A, B e C.

De acordo com a Figura 11 é possível notar que a amostra C, tanto para BRS como para BANHT, apresentou resultados superiores àqueles obtidos nas amostras A e B. Uma vez que a amostra C é constituída de água contaminada com óleo, o que propicia uma condição mais favorável ao crescimento. De acordo com a determinação de sulfetos totais presentes na amostra C, verifica-se que a concentração de sulfeto mostrou-se superior às demais com valor de 3,75 ppm, o que pode evidenciar um maior número de BRS nessa amostra.

A amostra A apresenta uma maior quantidade de óleo em relação às demais, assim esperava-se que devido à pequena solubilidade do óleo em água, a quantificação dos microrganismos de interesse (BRS e BANHT) fosse inferior, em comparação com as amostras B, C. No entanto, a quantificação de BANHT nas amostras A e B foram similares, 450 células/mL e 950 células/mL, respectivamente, não sendo possível assumir diferenças em termos de células bacterianas.

Apesar da amostra B apresentar água em sua constituição, verifica-se que o crescimento para BRS não mostrou resultados acima dos valores obtidos na amostra A, onde a presença do óleo é muito maior. A baixa quantificação de BRS na amostra B pode estar relacionada à provável presença de substâncias tóxicas na amostra. As indústrias de petróleo, na tentativa de se alcançar o controle microbiológico em sistemas de injeção de água do mar, têm empregado uma variedade de tratamentos como a introdução de agentes biocidas (cloração) (PENNA, 2004; NASCIMENTO, 2006).

A visualização da amostra B na foto apresentada na Figura 12 permite verificar que não há a presença de duas fases distintas (óleo e água), já que o óleo e a água apresentam polaridades distintas, não sendo miscíveis em solução. No entanto, observou-se que esta amostra é bem menos viscosa que a amostra A.





Figura 12 - Fotografia das amostras A (óleo contaminado com água), B (óleo e água) e C (água contaminada com óleo).

### 3.3 Efeito do surfactante Tween 60 na quantificação microbiana.

#### Bactérias redutoras de sulfato

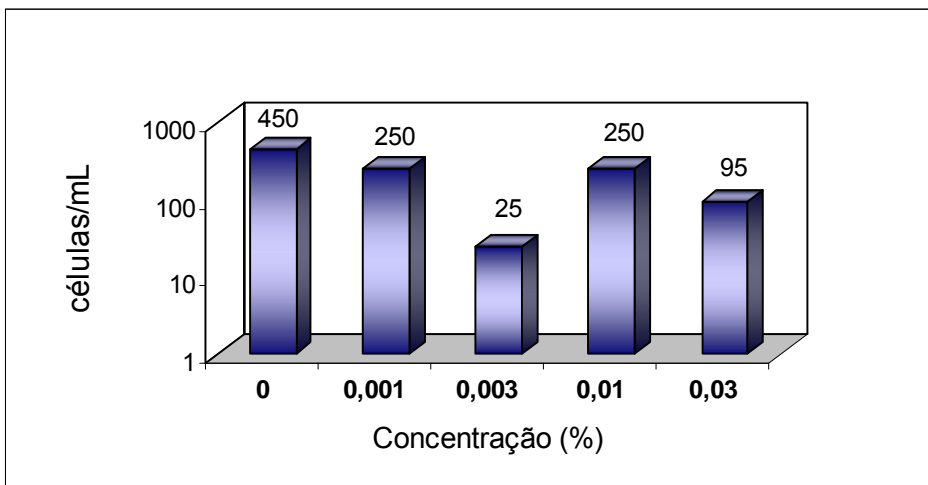
Os resultados obtidos com o emprego do Tween 60 nas diferentes concentrações testadas para as BRS nas três amostras analisadas (A, B e C) estão demonstrados na Figura 13.

A avaliação do efeito do surfactante Tween 60 na amostra A (Figura 13a) revela que a adição do respectivo surfactante não contribuiu para um aumento na quantificação de BRS na amostra com maior teor de óleo, onde os resultados obtidos apresentam-se inferiores em relação ao controle (ausência de surfactante).

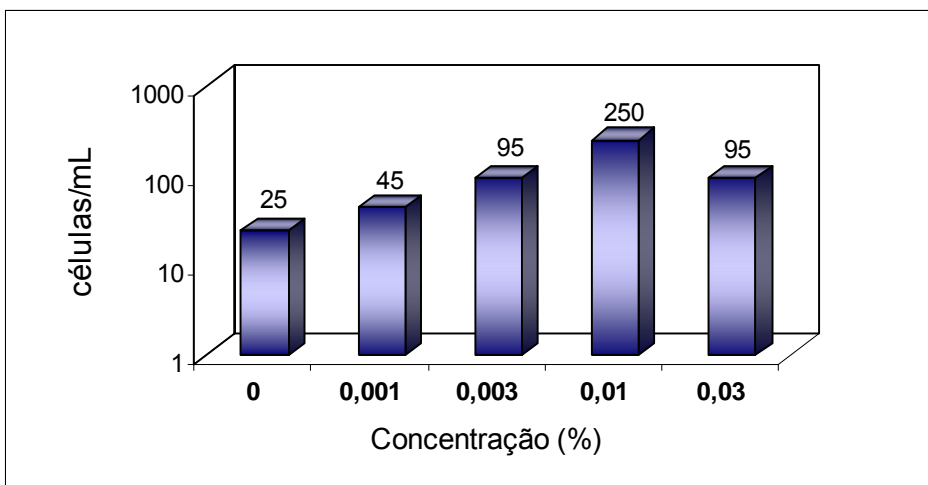
Os efeitos de surfactantes na fisiologia dos microrganismos variam desde efeitos inibitórios, de acordo com sua toxicidade, à estimulação no crescimento causada pelo uso do surfactante como substrato (VOLKERING *et al.*, 1998). A complexidade desses efeitos está documentada em literatura, com grandes variações nos resultados obtidos (TIEHM, 1994, VOLKERING *et al.*, 1995, GUHA & JAFFE, 1996).

Para a amostra B (Figura 13b) nota-se que em todas as concentrações testadas os valores obtidos foram superiores aos resultados do controle. Porém, por se tratar de número de células bacterianas, não seria possível admitir diferenças significativas quando comparamos resultados de mesma ordem de grandeza. Nesses termos, a concentração de 0,01% m/v (acima da CMC) foi a que apresentou o maior resultado de quantificação para as BRS (250 células/mL).

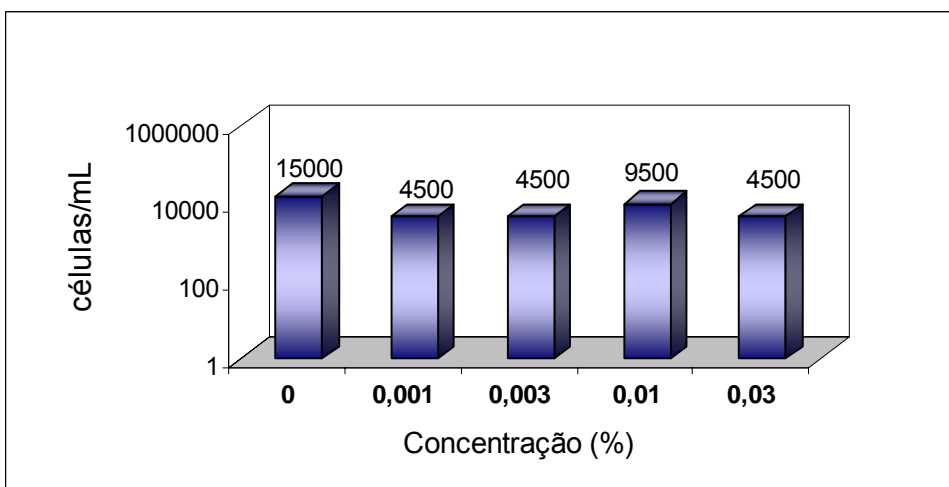
De acordo com a Figura 13c é possível verificar que na amostra C não ocorreu o efeito esperado com a aplicação do surfactante Tween 60, onde todas as concentrações testadas apresentaram resultados inferiores em comparação ao controle, não sendo favorável a quantificação desse grupo de microrganismo.



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

Figura 13 - Concentração de Bactérias Redutoras de Sulfato, em termos de NMP de células por mL, na presença de diferentes concentrações do surfactante Tween 60.

### Bactérias anaeróbias heterotróficas totais

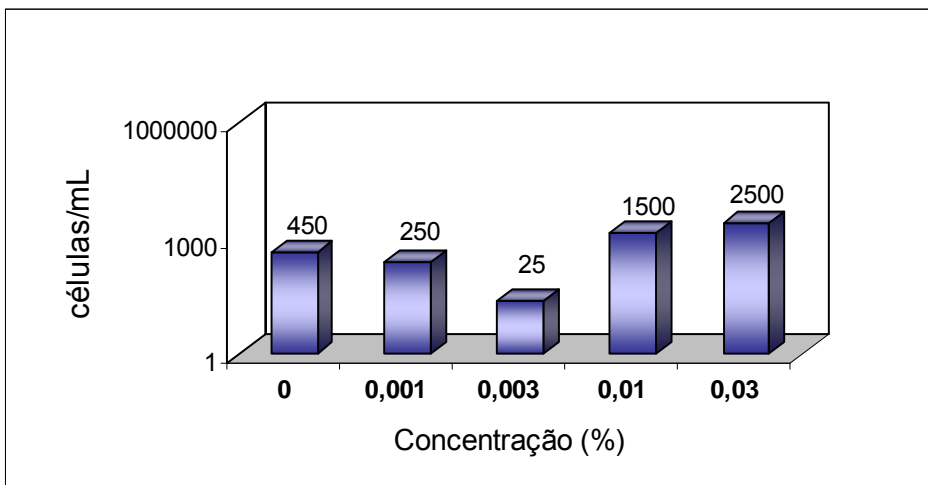
A Figura 14 apresenta os resultados para as amostras A, B e C obtidas da quantificação de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais na presença do surfactante Tween 60.

Na Figura 14 é possível verificar que para todas as amostras avaliadas, o surfactante Tween 60 apresentou efeito favorável ao crescimento das BANHT quando aplicado nas concentrações de 0,01% e 0,03%, acima da CMC do respectivo surfactante. A amostra C apresentou os resultados mais elevados em relação ao controle, fornecendo valores de  $2,5 \times 10^6$  células/mL.

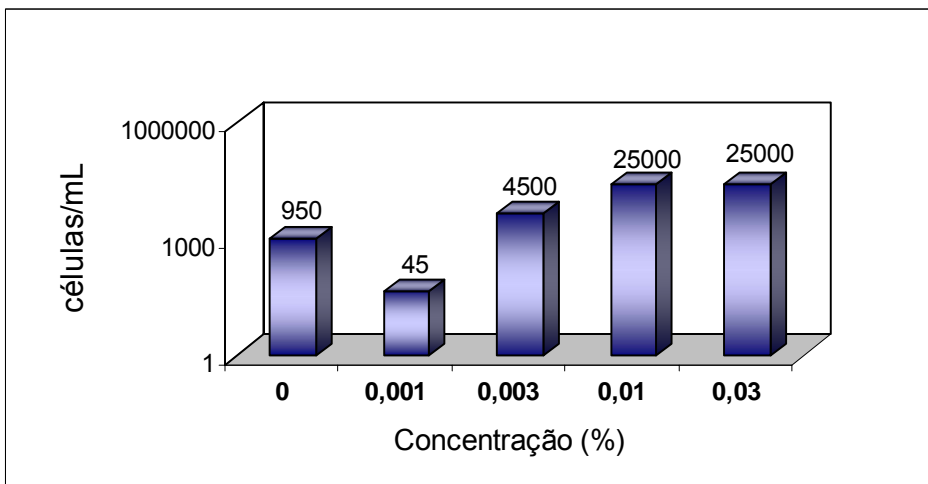
Na amostra B, a concentração do Tween 60 referente à sua CMC também apresentou resultado superior ao encontrado na ausência do surfactante, fornecendo valores de 4500 células/mL.

Os surfactantes quando em concentrações acima da sua Concentração Micelar Crítica (CMC) podem solubilizar substâncias hidrofóbicas devido à presença das micelas em solução. Segundo alguns autores (GUHA & JAFFE, 1996; TIEHM, 1994; VOLKERING *et al.* 1998) o processo de micelização propicia um aumento na solubilização e, conseqüentemente, uma maior possibilidade de degradação dessas substâncias pelos microrganismos.

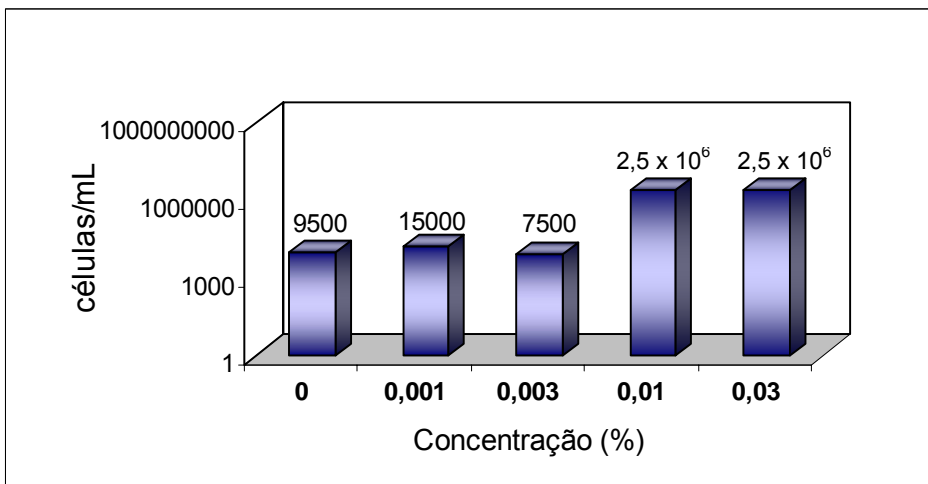
Estudos empregando surfactantes para solubilização/biodegradação de substâncias hidrofóbicas verificaram que a utilização dessas substâncias acima da CMC propiciaram um aumento na solubilização. Porém, quando valores muito acima da CMC foram empregados, observou-se uma redução na taxa de degradação devido ao efeito inibitório do surfactante (WILLUMSEN *et al.* 1998).



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

Figura 14 - Concentração de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais, em termos de NMP de células por mL, na presença de diferentes concentrações do surfactante Tween 60.

### 3.4 Efeito do surfactante Tween 80 na quantificação microbiana.

#### Bactérias redutoras de sulfato

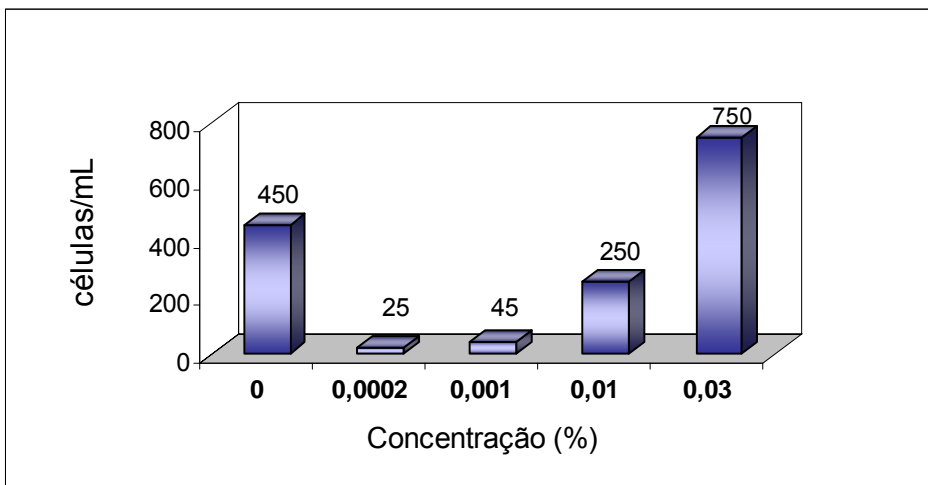
A Figura 15 demonstra o efeito das concentrações testadas do surfactante Tween 80 na quantificação de BRS nas amostras A, B e C.

O gráfico da Figura 15a revela que a adição do surfactante não foi favorável à quantificação de BRS para a amostra A. A análise dos resultados envolve comparação em termos de número de células de microrganismos, não sendo possível estabelecer diferenças significativas nos resultados apresentados, já que os mesmos apresentam-se na mesma ordem de grandeza. Portanto, não foi considerado que na concentração de 0,03% o resultado de quantificação de 750 células/mL de BRS foi superior ao controle, o qual forneceu o valor de 450 células/mL.

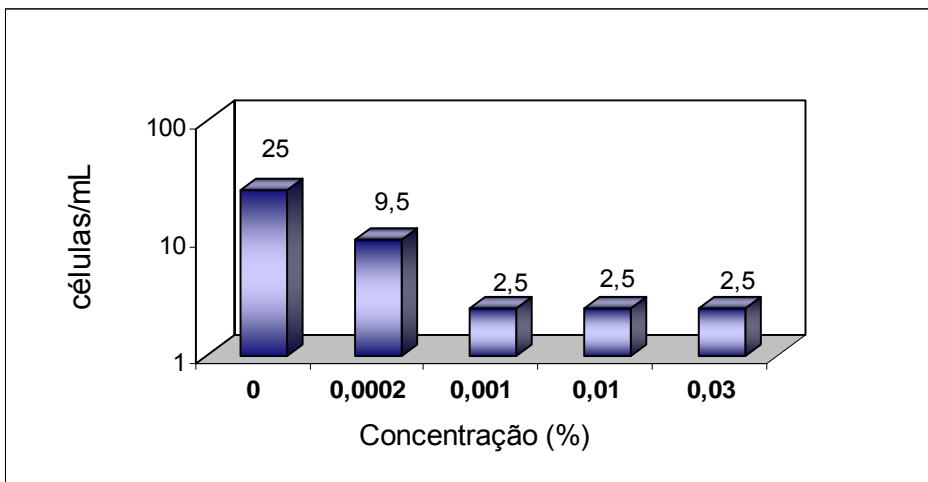
A análise do gráfico para a amostra B (Figura 15 b) demonstra que em todas as concentrações os resultados obtidos foram inferiores ao controle. Segundo VOLKERING *et al* (1998), a adição de surfactantes em sistemas líquidos poderá ter dois efeitos: solubilização da substância hidrofóbica e, assim, estimular a biodegradação pelos microrganismos ou inibir a adesão das células bacterianas na interface, conseqüentemente, reduzindo a taxa de biodegradação. Este último efeito pode ter ocorrido na amostra B composta por água e óleo.

Os resultados constantes na Figura 15c mostram que o efeito do surfactante Tween 80 pode ser considerado favorável ao crescimento das BRS, na amostra C, quando aplicado nas concentrações de 0,001% m/v e 0,01% m/v, fornecendo valores de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e  $4,0 \times 10^5$  células/mL, respectivamente.

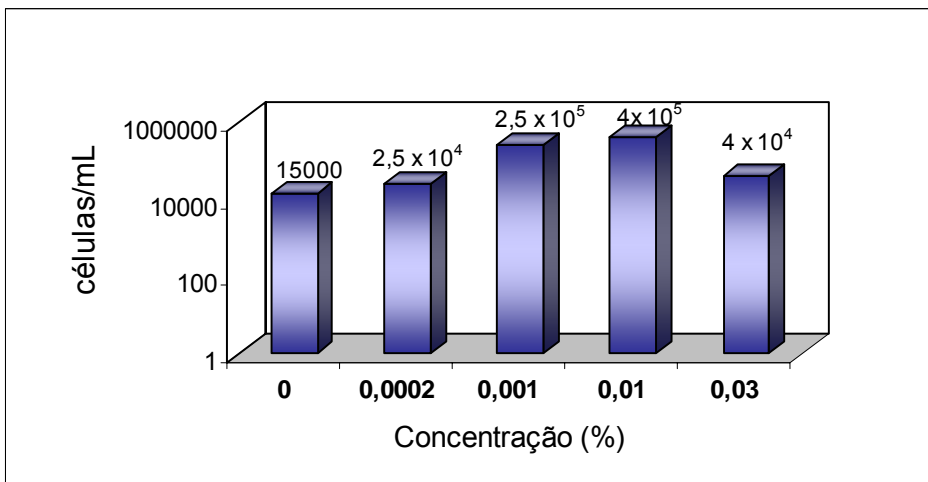
No estudo realizado por Kim *et al.* (2001), no aumento da biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos com uso de surfactantes sintéticos Triton - X, Brij 30 e Tween 80, os autores verificaram que os surfactantes aplicados em concentrações abaixo ou próximas à sua CMC, não forneciam uma melhoria na solubilização. No entanto, quando empregados em concentrações acima da CMC a solubilidade aumentou.



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

Figura 15 - Concentração de Bactérias Redutoras de Sulfato, em termos de NMP de células por mL, na presença de diferentes concentrações surfactante Tween 80.

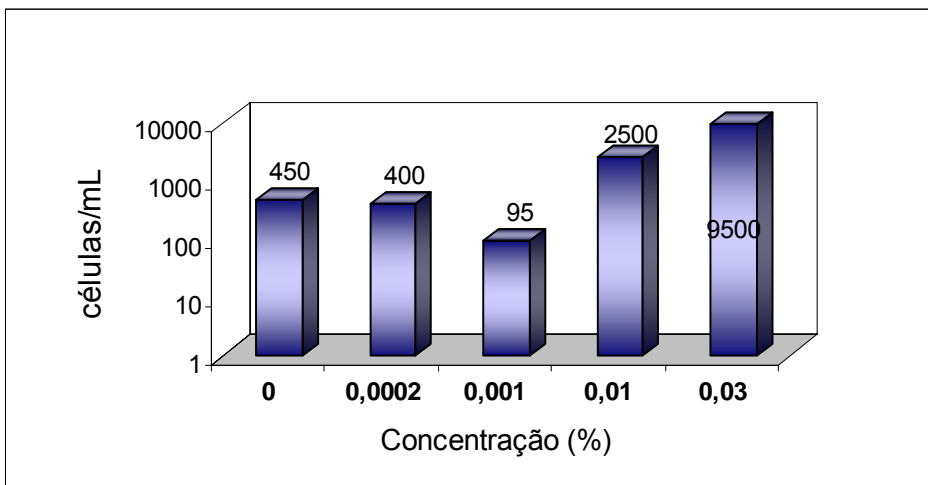
### Bactérias anaeróbias heterotróficas totais

A Figura 16 possibilita verificar o efeito do surfactante Tween 80 na quantificação de BANHT nas amostras A, B e C.

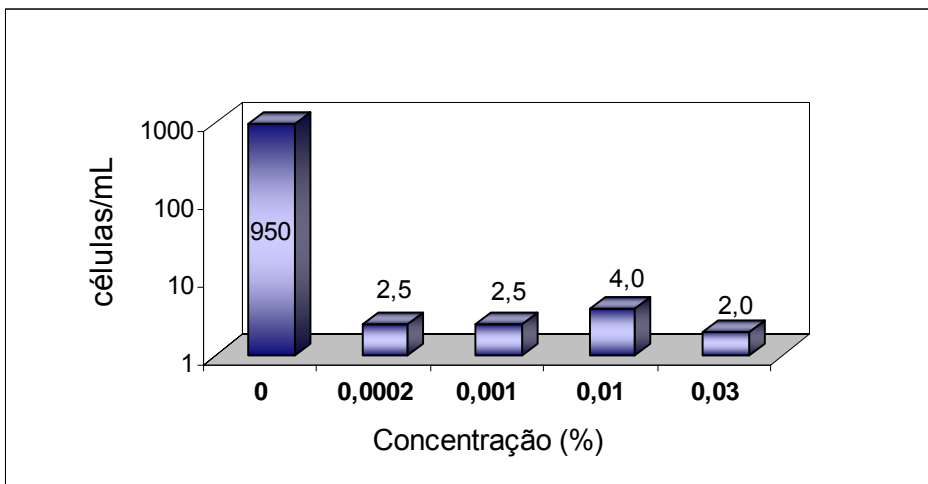
Na análise da Figura 16a foi possível observar que a adição do surfactante Tween 80 apresentou aumento no crescimento quando aplicado nas concentrações de 0,01% m/v e 0,03% m/v, ambas acima da CMC (0,001% m/v) do surfactante.

A adição do Tween 80 na amostra B não forneceu efeitos favoráveis ao crescimento de BANHT em nenhuma das concentrações testadas, apresentando resultados inferiores ao controle (950 células/mL).

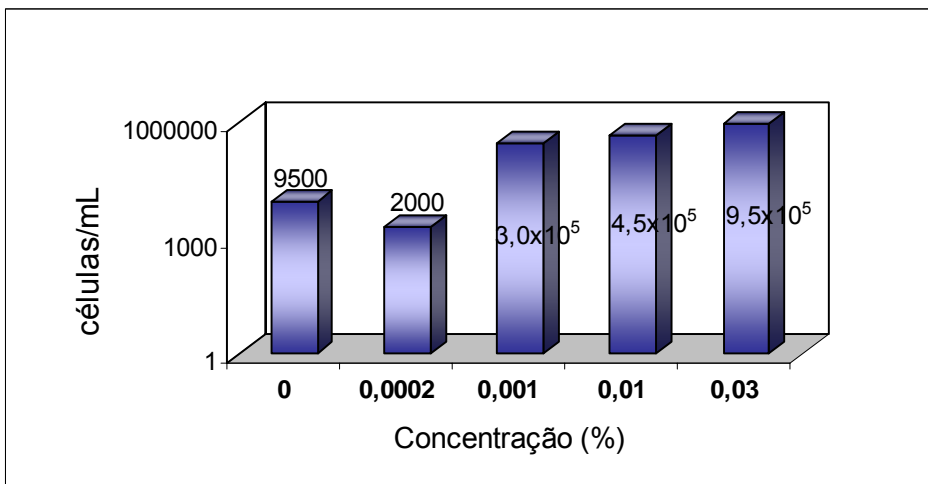
Para a amostra C (Figura 16c), verifica-se que a adição do Tween 80 na CMC (0,01% m/v) e nas concentrações acima da CMC (0,01 % m/v e 0,03% m/v) apresentou resultados superiores aos obtidos na ausência do surfactante, fornecendo valores de  $3 \times 10^5$  células/mL,  $4,5 \times 10^5$  células/mL e  $9,5 \times 10^5$  células/mL, respectivamente, sendo favorável a quantificação e BANHT em amostras com teor de óleo reduzido.



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

Figura 16 – Concentração de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais, em termos de NMP de células por mL, na presença de diferentes concentrações surfactante Tween 80.



### 3.5 Efeito do surfactante CTAB na quantificação microbiana.

#### Bactérias redutoras de sulfato

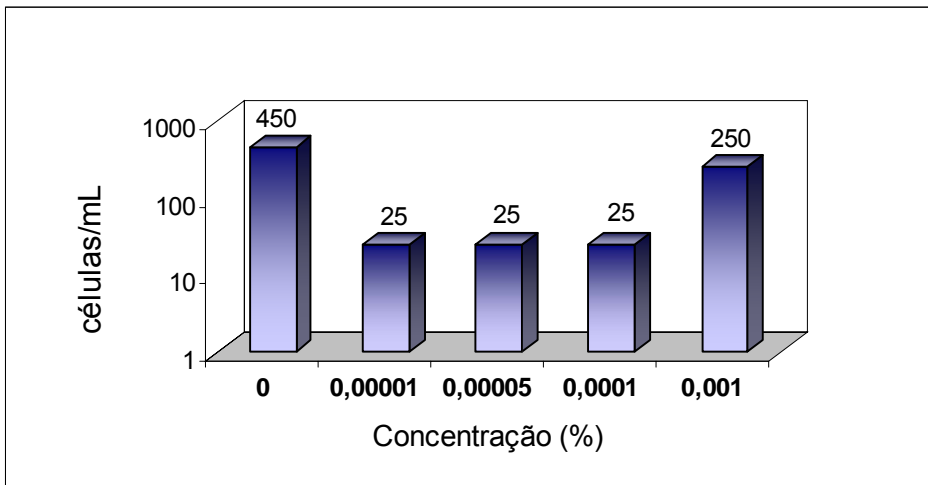
De acordo com levantamento anterior (RAJAGOPAL *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2005; FENGJIAO *et al.*, 2005,) o CTAB, surfactante catiônico, apresentou uma maior toxicidade em relação aos surfactantes das demais classes, portanto, optou-se por empregar concentrações bem inferiores à CMC (0,036% m/v).

A análise da Figura 17a evidencia que a aplicação do surfactante CTAB não favoreceu o crescimento de BRS na amostra A (óleo contaminado com água).

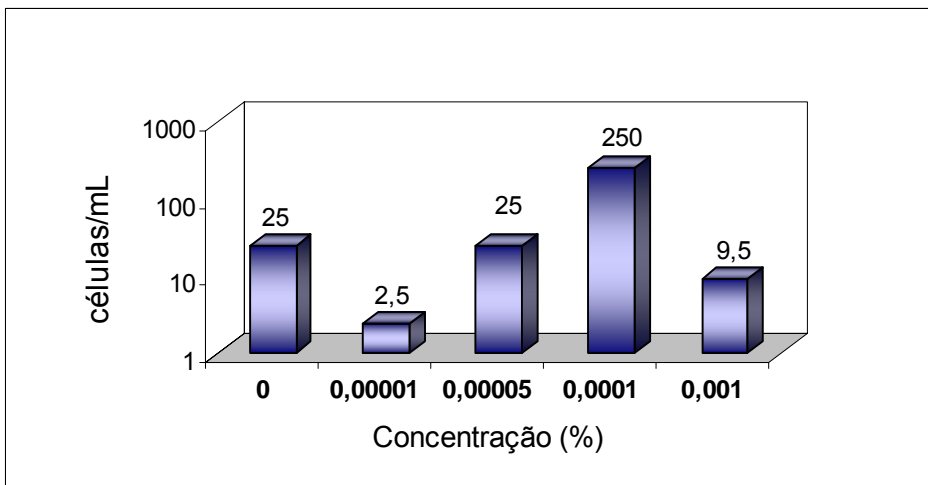
Para a amostra B (Figura 17b), observou-se que o emprego do CTAB na concentração 0,0001% m/v (250 células/mL) resultou em um aumento de 10 vezes na quantificação obtida no controle (25 células/mL). Enquanto que na amostra C (Figura 17c), a adição do CTAB favoreceu o crescimento quando aplicado nas concentrações de 0,00005% m/v e 0,0001% m/v, fornecendo valores de  $3,5 \times 10^4$  células/mL e  $4,5 \times 10^5$  células/mL, respectivamente.

No estudo de Gibson *et al.* (1987) o aumento na quantificação de BRS em culturas líquidas de sedimentos marinhos ocorreu quando o CTAB foi usado na concentração de 0,00001%. Neste estudo, além da concentração de 0,00001% m/v, as concentrações de 0,00005 e 0,0001% m/v também forneceram um aumento no número de células de BRS.

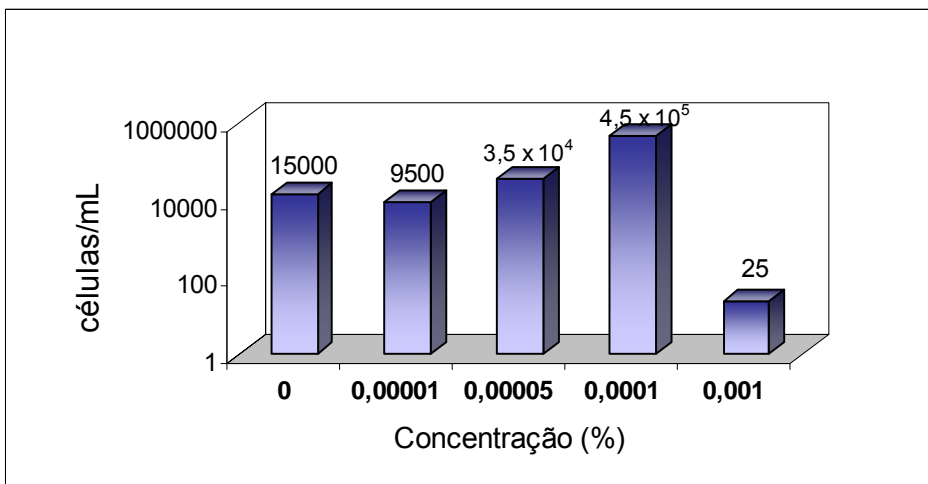
Os efeitos inibitórios do CTAB são reportados em literatura com uma grande variação nos resultados dependendo da concentração empregada. Em trabalhos como o de Rodrigues *et al.* (2001) e Simões *et al.* (2005), o CTAB apresentou efeitos inibitórios em concentrações acima de 0,01% m/v no estudo com *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente. Enquanto que no estudo de Fengjiao *et al.* (2005) o efeito inibitório no crescimento de *Pseudomonas putida* foi pronunciado em concentrações acima de 0,001% m/v. Neste trabalho a concentração de 0,001% demonstrou um efeito inibitório nas amostras B e C, enquanto que na amostra A (óleo) o efeito foi favorável ao aumento na quantificação de BRS.



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

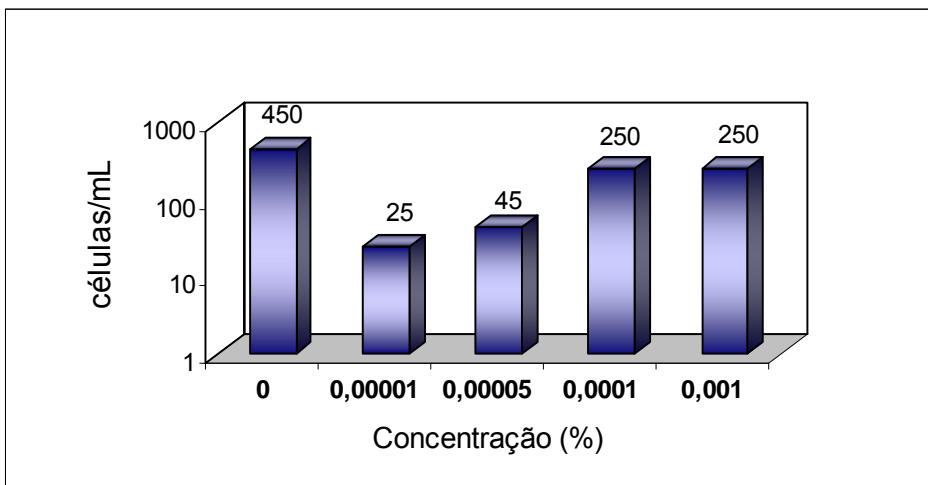
Figura 17 - Concentração de Bactérias Redutoras de Sulfato, em termos de NMP de células por mL, na presença do surfactante CTAB.

### Bactérias anaeróbias heterotróficas totais

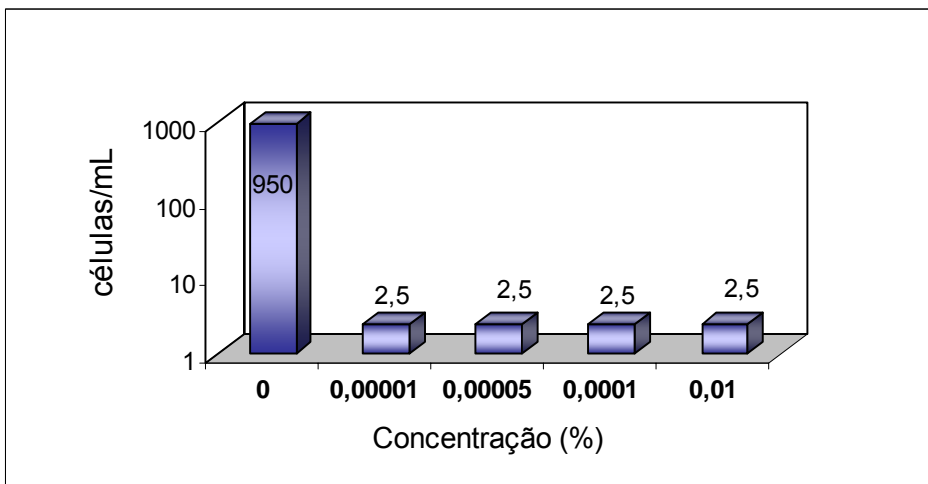
Na Figura 18 estão apresentados os resultados para as amostras A, B e C obtidas da quantificação de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais na presença do surfactante CTAB.

A Figura 18 demonstra que em todas as concentrações testadas não ocorreu aumento significativo na quantificação de BANHT nas amostras A e B, não sendo observado nenhum efeito favorável ao crescimento com a adição do CTAB.

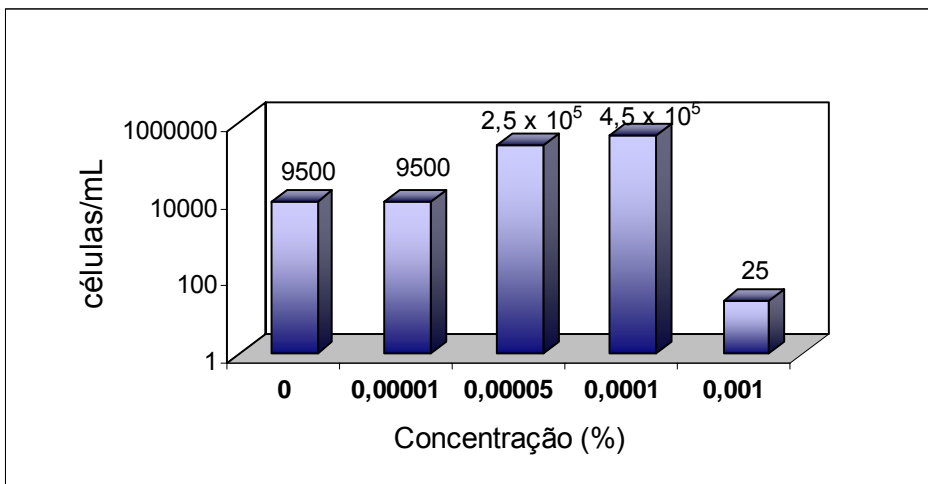
Na amostra C (Figura 18c), composta de água contaminada com óleo, a concentração de 0,0001% m/v do CTAB foi a que indicou valor superior ( $4,5 \times 10^5$  células/mL) ao controle ( $9,5 \times 10^3$  células/mL).



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

Figura 18 - Concentração de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais, em termos de NMP de células por mL, na presença do surfactante CTAB.

### 3.6 Efeito do surfactante SDS na quantificação microbiana.

#### Bactérias redutoras de sulfato

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos com o emprego do SDS nas diferentes concentrações testadas para as BRS.

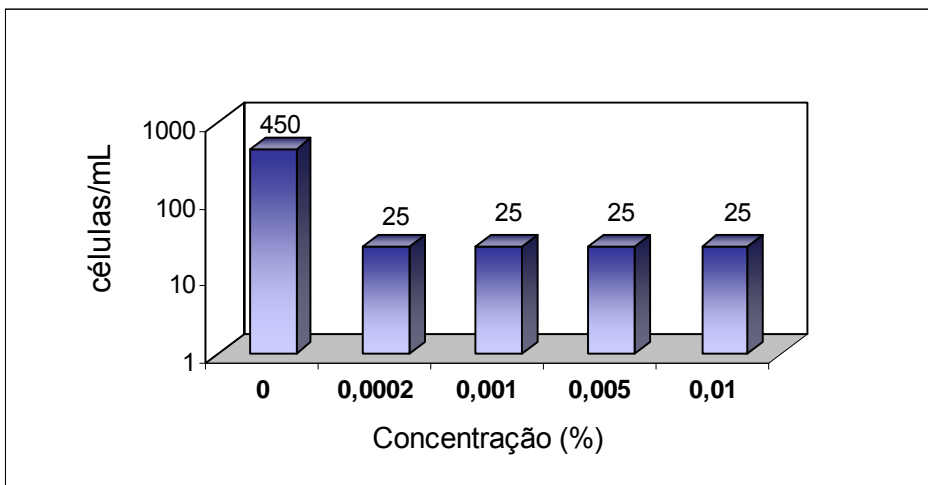
De acordo com a Figura 19a, todas as concentrações testadas apresentaram valores inferiores ao controle (450 células/mL), evidenciando que a adição do SDS não promoveu um aumento na quantificação de BRS, embora visualmente tenha sido observado a solubilização da amostra (óleo).

Na amostra B (Figura 19b) é possível observar que a adição do surfactante não favoreceu a quantificação de BRS em nenhuma das concentrações testadas, apresentado valores iguais aos obtidos no controle. No caso da concentração de 0,001% m/v (45 células/mL), como já relatado anteriormente, não foi considerado superior por ser um valor muito próximo ao obtido no controle (25 células/mL) o que, em relação a número de células de microrganismos, não indica diferença significativa.

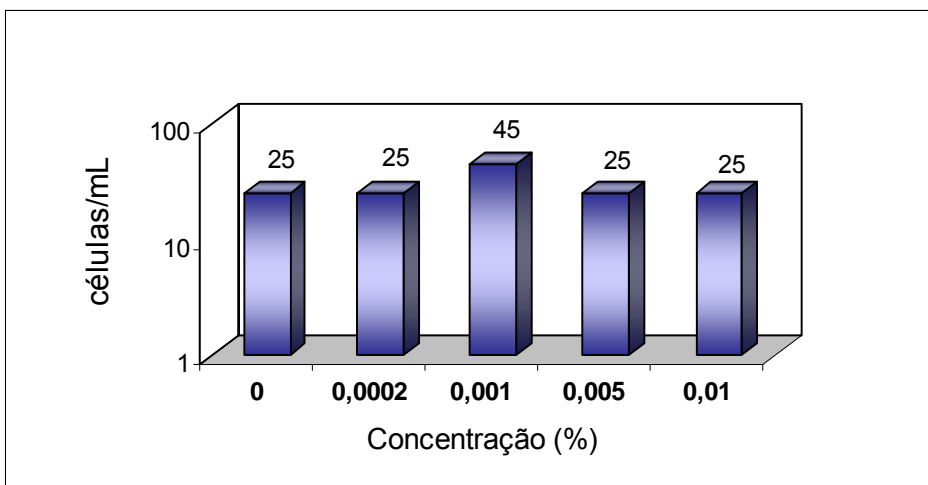
As concentrações de SDS de 0,0002% m/v e 0,001% m/v empregadas na amostra C representam os maiores aumentos na quantificação de BRS,  $4,5 \times 10^4$  células/mL e  $2,5 \times 10^5$  células/mL, respectivamente, em comparação ao controle ( $1,5 \times 10^4$  células/mL).

Segundo LEE *et al.* (1995), os surfactantes aniônicos, como o SDS, possuem características detergentes e baixa atividade antimicrobiana, exceto quando empregado em concentrações elevadas, as quais podem induzir a lise de bactérias Gram-negativas. Tal fato também foi observado por Simões (2005) no estudo realizado com *Pseudomonas fluorescens*.

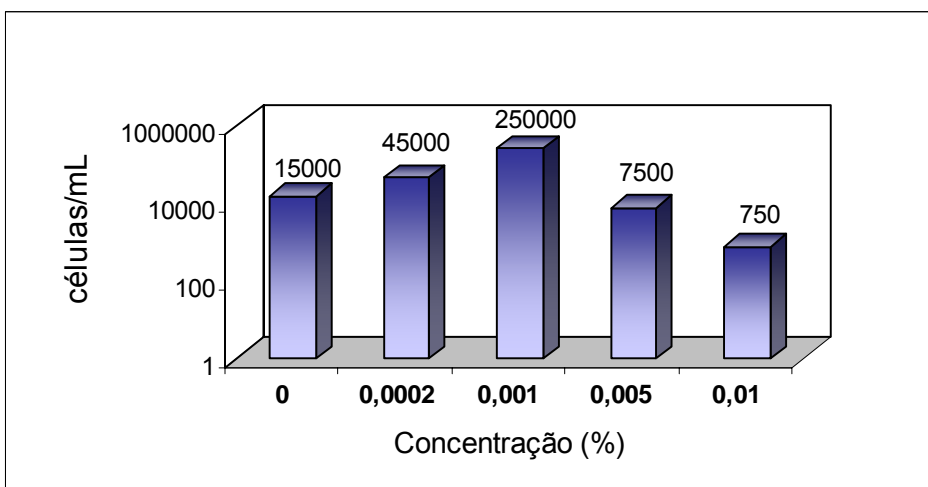
Existe também a possibilidade do estímulo do crescimento bacteriano estar associado ao consumo do surfactante. Suchanek *et al.* (2000) verificaram que a biodegradação do n-decano por uma linhagem de *Pseudomonas* foi estimulada na presença do SDS. A geração de um intermediário durante o consumo do surfactante parece ter possibilitado a adesão da bactéria ao hidrocarboneto, facilitando a sua biodegradação.



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

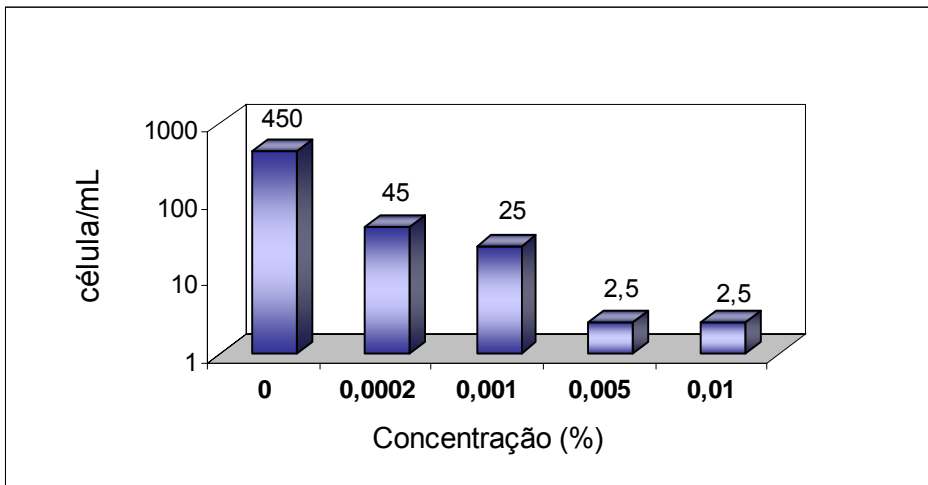
Figura 19 - Concentração de Bactérias Redutoras de Sulfato, em termos de NMP de células por mL, na presença do surfactante SDS.

### Bactérias anaeróbias heterotróficas totais

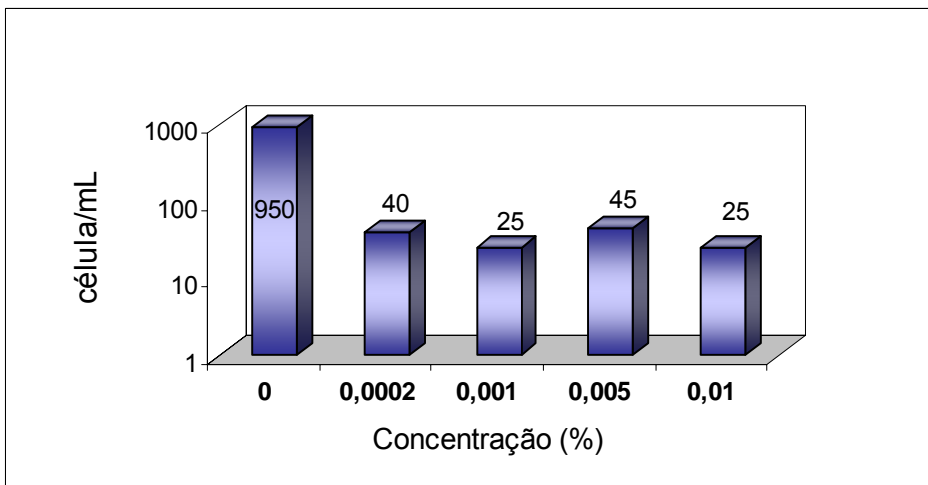
É possível observar na Figura 20 a adição do surfactante SDS não promoveu um aumento significativo na quantificação de BANHT em nenhuma das amostras analisadas.

A extensão com que o processo de solubilização é alterado depende de muitos fatores, incluindo a estrutura do surfactante, número de agregados que constituem a micela, a geometria da micela, força iônica, temperatura e o tamanho e propriedade química da substância solubilizada (ATTWOOD & FLORENCE 1983 *apud* PARIA & YUET, 2006).

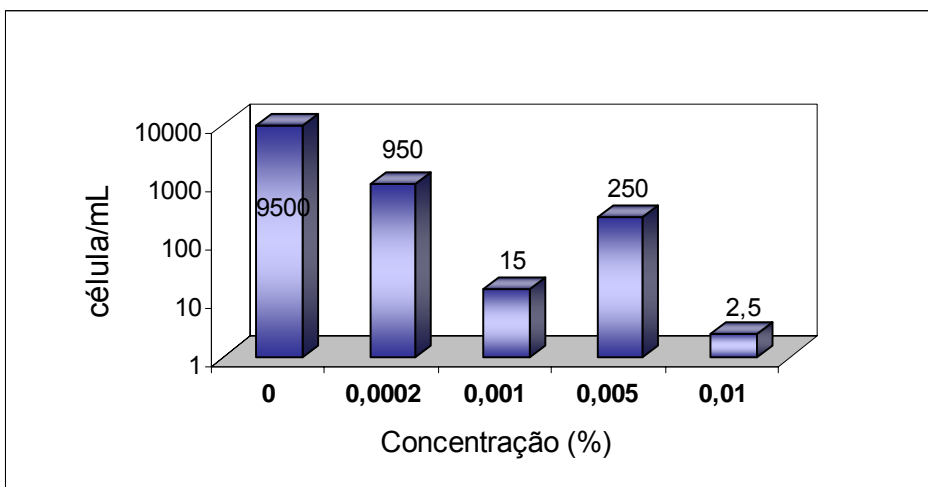
Margesin & Schinner (1998) avaliaram diferentes concentrações do SDS na biodegradação do óleo diesel e observaram que em concentrações menores que 0,01% ocorreu um aumento significativo na biodegradação do óleo, enquanto que em concentrações mais elevadas 0,05% e 0,1% ocorreu inibição.



(a) Amostra A



(b) Amostra B



(c) Amostra C

Figura 20 - Concentração de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais, em termos de NMP de células por mL, na presença do surfactante SDS.



### 3.7 Considerações finais.

Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentados os melhores resultados de quantificação de BRS e BANHT, respectivamente, obtidos em cada amostra analisada com os surfactantes avaliados.

Tabela 9 – Avaliação do efeito dos surfactantes Tween 60, Tween 80, CTAB e SDS na quantificação de BRS nas amostras testadas.

Amostra Surfactante	A (óleo c/ água) (Células/mL)	B (óleo+água) (Células/mL)	C (água c/ óleo) (Células/mL)
Controle	$4,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^4$
Tween 60 (%m/v)	-*	$2,5 \times 10^2$ (0,01)	-*
Tween 80 (%m/v)	-*	-*	$4,0 \times 10^5$ (0,01)
CTAB (%m/v)	-*	$2,5 \times 10^2$ (0,0001)	$4,5 \times 10^5$ (0,0001)
SDS (%m/v)	-*	-*	$2,5 \times 10^5$ (0,001)

\* não apresentaram efeitos positivos.

Na amostra A, de acordo com a Tabela 9, nenhum dos surfactantes empregados auxiliou no aumento da quantificação de BRS na amostra com maior teor de óleo. Entretanto, para o grupo de BANHT (Tabela 10), os surfactantes Tween 60 e Tween 80 forneceram efeitos favoráveis na quantificação desses microrganismos na amostra A.

A análise para a amostra B, apresentado na Tabela 9, revela que tanto a adição do Tween 60 como o CTAB, propiciaram um aumento no crescimento de BRS, fornecendo um aumento de 10 vezes superior ao controle ( $250$  células/mL) quando

empregados na concentração de 0,01% m/v do Tween 60 e 0,0001% do CTAB. Já para o grupo representado pelas BANHT (Tabela 10), apenas o Tween 60 apresentou resultado superior ( $2,5 \times 10^4$  células/mL) quando aplicado na concentração de 0,03% m/v (acima da CMC) em comparação ao controle ( $9,5 \times 10^2$  células/mL).

Tabela 10 – Avaliação do efeito dos surfactantes Tween 60, Tween 80, CTAB e SDS na quantificação de BANHT nas amostras testadas.

Amostra Surfactante	AMOSTRA A (óleo c/ água) (Células/mL)	AMOSTRA B (óleo+água) (Células/mL)	AMOSTRA C (água c/ óleo) (Células/mL)
Controle	$4,5 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$	$9,5 \times 10^3$
Tween 60 (%m/v)	$2,5 \times 10^3$ (0,03)	$2,5 \times 10^4$ (0,03)	$2,5 \times 10^6$ (0,03)
Tween 80 (%m/v)	$9,5 \times 10^3$ (0,03)	-*	$4,5 \times 10^5$ (0,03)
CTAB (%m/v)	-*	-*	$4,5 \times 10^5$ (0,0001)
SDS (%m/v)	-*	-*	-*

\* não apresentaram efeitos positivos.

Observa-se na análise da Tabela 9 que apenas o Tween 60 não favoreceu o aumento da quantificação de BRS na amostra C, composta de água contaminada com óleo. Enquanto que a quantificação de BANHT não foi favorecida apenas pelo SDS (Tabela 10), sendo o Tween 60 o que forneceu o melhor resultado ( $2,5 \times 10^6$  células/mL).

## 4 CONCLUSÕES

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos na quantificação microbiana em amostras coletadas nos tanques de óleo, as principais conclusões são apresentadas primeiramente para o grupo de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e em seguida para as Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT).

### 4.1 Bactérias redutoras de sulfato

A amostra constituída por água contaminada com óleo (amostra C) apresentou a maior concentração de BRS na ausência e na presença de surfactante em relação às amostras contendo óleo (A e B). Com exceção do Tween 60, a adição dos demais surfactantes foram favoráveis a quantificação de BRS na amostra C.

Os quatro surfactantes empregados no presente trabalho não apresentaram efeitos positivos no crescimento das BRS para a amostra constituída de óleo contaminado com água (amostra A).

A partir dos resultados da avaliação dos efeitos dos surfactantes, concluí-se que não foi possível estabelecer um único surfactante que fornecesse efeitos positivos na quantificação de BRS nas três amostras analisadas. O efeito positivo de cada surfactante foi específico a uma determinada condição. O Tween 60 foi favorável ao crescimento de BRS na amostra B, porém não foi efetivo para as amostras A e C, o CTAB foi representativo para as amostras B e C, já o Tween 80 e o SDS forneceram um aumento na quantificação apenas na amostra C.

Os surfactantes não-iônicos, quando apresentaram aumento no crescimento, foram empregados em concentrações acima das suas CMCs.

#### 4.2 Bactérias anaeróbias heterotróficas totais

O resultado de quantificação de BANHT no controle (sem adição de surfactante) para a amostra C foi superior àqueles obtidos nas amostras A e B, da mesma forma que observado para as BRS.

O surfactante Tween 60 forneceu um efeito positivo no crescimento de BANHT em todas as amostras analisadas, sendo pronunciado o maior efeito de quantificação na amostra C.

O Tween 80 favoreceu a quantificação de BANHT nas amostras A e C.

A adição do surfactante SDS não apresentou efeitos satisfatórios na quantificação de BANHT em nenhuma das amostras analisadas. Não sendo, portanto, adequado à quantificação de BANHT nessas condições.

## REFERÊNCIAS

- AKAGI, J. R. **Respiratory Sulfate Reduction**. In: BARTON, L.L. Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria. New York: Plenum Press, 1995.
- ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactant systems: Their chemistry, Pharmacy and Biology**. New York: Chapman and Hall, 1983.
- BAUMGARTNER, L.K.; REID, R.P.; DUPRAZ, C.; DECHO, A.W.; BUCKLEY, D.H.; SPEAR, J.R.; PRZKOP, K.M.; VISSCHER, P.T. Sulfate reducing bacteria in microbial mats changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* 185, 2006 - p 131-145.
- BARTON, L.L.; TOMEI, F.A. **Characteristics and activities of sulfate reducing bacteria**. In: BARTON, L.L. Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria. New York: Plenum Press, 1995.
- BEECH, I.B.; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbial-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology* 8, 2005 p 157-168.
- BEHRING, J.L; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELOS, I.O. Adaptação do peso de gota para a determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. *Química Nova* v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004.
- BLODGETT, R. J.; GARTHRIGHT, W. E. Several MPN models for serial dilutions with suppressed growth at low dilutions. *Food Microbiol.* 15, p. 91-99, 1998.
- BLODGETT, R. J. Finding bounds applied to serial dilution experiments. *Commun. Statist. –Simula.* 29 , n.3, p. 793-799, 2000.
- BLODGETT, R. J. Serial dilution with a confirmatory step. *Food Microbiol.* 22, p. 547-552, 2005a.

BLODGETT, R. J. Upper and lower bounds for a serial dilution test. *J. AOAC International* 88 (4), 2005b - p 1227-1230.

BLODGETT, R. J. Testing deviation for a set of serial dilution most probable numbers from a Poisson-Binomial model. *J. AOAC International* 89 (1), 2006 - p 166-171.

CASTRO, H.F.; WILLIAMS, N.H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. MiniReview. *Ecology* 31: *FEMS*, 2000 - p 1-9.

CHAKRALIS, W.G.; MARSHALL, K.C. **Biofilms**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 796p.

COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics* 6, 1950 - p 105-116.

COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P.; Anaerobic treatment of sulphate - containing waste streams. *J. Antonie van Leeuwenhoek* 67, 1995, p 29-46.

CORRÊA, O.L.S. **Petróleo: Noções sobre Exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

COSTERTON. J. W.; CHENG K.-J.; GEESEY G. G.; LADD T. I.; NICKEL J. C.; DAUGUPTA M.; MARRIE T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G. Biofilms as a Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, p.187-209, 2002.

CRAPEZ, M. **Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. Efeito de poluentes em organismos marinhos**, In: MORAES, R. Arte e Ciência, São Paulo: Villipress, 2001.

CUNY, P.; FAUCET, J.; ACQUAVIVA, M.; BERTRAND, J.C.; GILEWICS, M. Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in presence of a synthetic surfactant. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, p.242-245, 1999.

DAVIDOVA, I.; HICKS, M.; FEDORAK, P.M. et al. The influence of Nitrate in Microbial Process in Oil Industry Production Waters. *J.Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 27, p 80-86, 2001.

DE MAN, J. C. MPN tables for more than one test. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4, p 307-316, 1977.

DOONG, R.; LEI, W. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *J. Harzadous Materials B* 96, p 15-27, 2003.

EISENHART, C.; WILSON, P. W. Statistical methods and control in bacteriology. *Bacteriol. Rev.* 7, p 57-137, 1943.

FAUQUE, G. D. **Ecology of sulfate-reducing bacteria.** In: BARTON, L.L. Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria. New York: Plenum Press, 1995.

FARQUHAR, G.B. Review and Update of Technology Related to Formation Souring. *Corrosion 1997, Paper 210*, NACE International, 1997.

FENGJIAO H., XIAOQING Z., ZHENHUA L. A new sensor method for studying the effect of surfactants on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sensors and Actuators B.* 113, p 428–434, 2006.

FLEMMING, V.; INGVORSEN, K. Improved Most-Probable-Number Method To Detect Sulfate-Reducing Bacteria with Natural Media and a Radiotracer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 N 5, p 1700–1707, 1998.

GARTHRIGHT, W. E.; BLODGETT, R. J. Confidence intervals for microbial density using serial dilutions with MPN estimates. *Biom. J.* v.38, n. 4, p 489-505, 1996.

GARTHRIGHT, W. E. A Bayesian analysis of serial dilutions offers a worse positive bias than the MPN and proposes an inappropriate. *Food Microbiol.* 14, 1997 - p 515-517.

GARTHRIGHT, W. E.; BLODGETT, R. J. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. *Food Microbiol.* 20, 2003 - p 439-445.

GENTIL, V. **Corrosão**. Livros Técnicos e Científicos. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996, 345p.

GIBSON, G.R.; PARKES, R.J.; HERBERT, R.A. Evaluation of viable counting procedures for the enumeration of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments. *J. Microbiol. Methods*, 7, 1987 - p 201-210.

GONÇALVES, M.M.M. **Remoção de metais pesados de efluentes em biorreator anaeróbio empregando fontes de carbono alternativas**. 2001. 163p. Tese (Doutorado) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

GRIMBERG, S.; NAGEL, J.; AITKEN, M. Kinetics of phenanthrene dissolution into water in the presence of non-ionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1995 - p 1480-1487.

GUHA, S.; JAFFE, P.R. Biodegradation Kinetics of Phenanthrene Partitioned into the Micellar Phase of Nonionic Surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30, p.605-611, 1996.

GYURE, R.A.; KONOPKA, A.; BROOKS, A.; DOEMEL, W. **Microbial sulfate reduction in acidic (pH 3) strip-mine lakes**. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, p.193-202, 1990.

HAAS, C. N. Estimation of microbial densities from dilution count experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, p.1934-1942, 1989.

HALVORSON, H. O., ZIEGLER, N. R. Application of statistics to problem in bacteriology. *J. Bacteriol.* 25: 101-121; 26: 331-339; 26: 559-567, 1993.

HAMILTON, W.A.; LEE, W.; **Biocorrosion**. In: BARTON, L.L. Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria. New York: Plenum Press, 1995 - p 132

IRWIN, P., TU, S., DAMERT, W., PHILLIPS, J. A modified Gauss-Newton algorithm and ninety-six well micro-technique for calculating MPN using Excel spreadsheet. *J. Rapid Methods Automat. Microbiol.* 8, p.171-191, 2000.



JOHNSON, M.S.; ZHULIN, I.B.; GAPUZAN, M.E.R.; TAYLOR, B.L. Oxygen-dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrios vulgaris* Hildenborough. *J.Bacteriol.* 179, p 5598-5601,1997.

KLEE, A. J. A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits. *J. Microbiol. Methods* 18, p. 91-98, 1993.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; MAKAROV, S.O.; LITVINENKO, L.V.; CUNNINGHAM, C.J.; PHILIP, J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ. Internat..* 31, p. 155–161, 2005.

LEE, C.; RUSSEL, N.J.; WHITE, G.F. Modelling the kinetics of biodegradation of anionic surfactants by biofilm bacteria from polluted riverine sites: a comparison of five classes of surfactant at three sites. *Wat. Res.* 29, n.11, p. 2491-2497, 1995.

LEE, D.H.; KIM, E.S.; CHANG, H.W. Effect of Tween 80 surfactant components for remediation of toluene-contaminated groundwater. *Geosc. J.* 9, n. 3, p. 261-267, 2005.

LIMA, A.C.F. **Produção de sulfeto em reator tipo UASB e sua potencial aplicação na remoção de metais pesados e efluentes.** 1996. 108p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos de Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

MACHADO, S.M.O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis.** 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PRKER, J. Brock Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice Hall, 2000.

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. *Química Nova* v.4, n.1, p. 87-93, 2001.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate. *Chemosphere* v. 38, n.15, p. 3463-3472, 1998.

MAXWELL, S.; MUTCH, K.; HELLINGS, G.; BADALEK, P.; CHARLON, P. In Field biocide optimization for magnus water injection system. *Corrosion*. Paper n. 02031, 2002.

McCRADY, M. H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. Infect. Dis.* 17, p.183-212, 1915.

NASCIMENTO, J.R. **Avaliação da Tecnologia de Exclusão Biocompetitiva para o Controle de Processos de Acidificação Biogênica (Souring) e Corrosão Microbiológica na Indústria do Petróleo**. 2006. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

ODOM, J.M. **Industrial and Environmental Activities of Sulfate-Reducing Bacteria** In: ODOM, J.M. & JR, R.S. *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. New York: Springer – Verlag , 1993.

PARIA S.; YUET K. Solubilization of Naphthalene by Pure and Mixed Surfactants. *Chem. Res.* v. 45, n.10, p. 3552-3558, 2006.

PENNA, M. O.; OLIVEIRA, H.B.; SILVA, E.D. Avaliação da Atividade Metabólica (Produção de H<sub>2</sub>S) de culturas mistas de bactérias Redutoras de sulfato (BRS). *Bol. Téc. Petrob.* 46, p. 208-219, 2003.

PENNA, M. O. **Avaliação de bases ativas biocidas para controle de microrganismos em sistemas de recuperação secundária de petróleo**. Dissertação de mestrado. Setembro de 2004. PUC, Rio de Janeiro, RJ.

PIRES, P.A.R. **Síntese e Propriedades de Soluções de Tensoativos catiônicos derivados de (3-Dimetilaminopropil) amidas de ácidos carboxílicos**. 2002. 667p.

Tese de Doutorado. Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP.

POSTGATE, J.R. **The Sulphate reducing Bactéria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.

RAJAGOPAL, S.; EIS, N.; NICKERSON, K.W. Eight Gram-negative bactéria are 10.000 times more sensitive to cationic detergents than to anionic detergents. *Can. J. Microbiol.* 49, 2003 - p 775-779.

ROCHA M.S.J. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia* 64, p 5-11, 1999.

RODRIGUES, A.C.; BRITO, A.G.; MELO, L.F. Effect of surfactants Tween 20 and CTAB on Fluoranthene and Anthracene degradation by *P. Putida*. *CEB -Paper 190*, 2001 - 4p.

ROUSSANOV, B., HAWKINS, D. M., TATINI, S. R. Estimating bacterial density data by a Bayesian method. *Food Microbiol.* 13, p 341-363,1996.

RUBIO C. A.; OTT C. A.; AMIEL. A.; DUPONT-MORAL I.B.; TRAVERT J. A.; MARIEY L. A. Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. *J. Microbiol. Methods* v.64, n.3, p.287-296, 2005.

SHI, T.; FREDRICKSON, J.K.; BALKWILL, D.L. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas strains isolated from the terrestrial subsurface. *J. Ind. Microbiol. & Biotech.* 26, p.283-289, 2001.

SIMÕES, M.J.V. **Use of biocides and surfactants to control Pseudomonas fluorescens biofilms**. PhD. Chemical and Biological Engineering. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal. 2005.

SINGLETON, R.J. **The Sulfate Reducing Bactéria: An overview**. In: Odom, J.M. & SINGLETON, R.J The sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives. Brock/Springer in Contemporary Bioscience. 1993.

STELMACK, P.L.; GRAY, M.R.; PICKARD, M. A. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p.163 -168, 1999.

SUCHANEK M.; KOSTAL J.; DEMNEROVA K.; KRALOVA B. Use of sodium dodecyl sulphate for stimulation of biodegradation of n-alkanes without residual contamination by the surfactant. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45, p 27-33, 2000.

TAYLOR, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series. *J. Appl. Bacteriol.* 25, p 54-61, 1962.

TIEHM, A. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants. *Ap. Env. Microbiology*, v.60, n.1, p. 258-263, 1994.

VAZOLLER, R.F. Características e interações microbianas nos processos de tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. *II Curso de Processos Biológicos de Tratamento de Resíduos*, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. 1993, 18p.

VIDELA, H.A.; SALVAREZZA, R. C. **Introducción a la Corrosion Microbiológica**. Primeira edição. Buenos Aires: Livraria Agropecuária, Argentina. 1994.

VIDELA, H.A. **Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais**. Primeira Edição. Editora Edgard Blücher. São Paulo. Brasil. 2003.

VIDELA H. A.; LIZ K. HERRERA. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Research Review. International Microbiology* 8, p.169-180, 2005.

VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; ANDEL, J.G., RULKENS, W.H. Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Ap. Env. Microbiol* v. 61, n.5, p.1699-1705, 1995.

VOLKERING F.; BREURE A.M.; & RULKENS W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, p.401–417, 1998.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U.; PRITCHARD, P.H. Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. *Appl. Microbiol. Biotech.* 50, p. 475-483, 1998.

WONG, J.W.C.; FANG, M.; ZHAO, Z.; XING, B. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Environ. Qual.* 33, p. 2015 – 2025, 2004.

WOODWARD, R. L. How probable is the most probable number? *J. Am.*, 1957.

## ANEXO I

### Fundamentos Teóricos das Distribuições Binomial e de Poisson

#### 1. Introdução à Distribuição Binomial

Um dos processos mais simples de coleta de dados consiste na contagem do número de vezes que determinado acontecimento ocorre ao longo de uma série de experiências idênticas. Admite-se que tais experiências possuem as seguintes características:

- (i) A cada experiência corresponde apenas um de dois resultados possíveis: sucesso ou insucesso;
- (ii) A probabilidade de ocorrência de cada resultado mantém-se inalterada de experiência para experiência:  $P(\text{sucesso}) = p = \text{constante}$  e  $P(\text{insucesso}) = 1 - p = q$ ;
- (iii) Os resultados associados a cada experiência são independentes.

As experiências que possuem estas propriedades são denominadas de *experiências de Bernoulli*. Se  $Y$  representar o número de vezes que, no decurso de  $N$  experiências de Bernoulli, ocorrem sucessos, então  $Y$  segue uma distribuição binomial ou, se preferir,  $Y$  é uma variável aleatória binomial.

Tendo em conta que, entre dois resultados possíveis associados a cada experiência, é arbitrária a escolha daquele que constitui um sucesso, a variável que representa o número de insucessos é também binomial: trata-se da variável  $B(N, q)$ .

Em geral, a função de probabilidade da variável  $Y$  só toma valores não-nulos para  $Y = 0, 1, \dots, N$  e é definida pela expressão

$$p(y) = \binom{N}{y} p^y q^{N-y} \quad (1)$$

O primeiro termo do segundo membro (combinações de N y a y) representa o número de seqüências diferentes com y sucessos, vindo naturalmente multiplicado pela probabilidade de ocorrência de cada uma delas. Os valores das funções de probabilidades e de distribuição para variáveis Binomiais quaisquer podem ser facilmente obtidos recorrendo a programas computacionais de estatística de uso generalizado ou mesmo algum tipo de calculadora.

## 2. Valor Esperado e Variância de uma Variável Aleatória Binomial

A função geradora de momentos da variável aleatória Y é

$$G(t) = E[e^{tY}] = \sum_{y=0}^N e^{tY} \binom{N}{y} p^y q^{N-y} \quad (2)$$

$$G(t) = \sum_{y=0}^N \binom{N}{y} (pe^t)^y q^{N-y} = (pe^t + q)^N \quad (3)$$

Derivando G(t) em relação a t temos,

$$G'(t) = N p e^t (pe^t + q)^{N-1} \quad (4)$$

$$G''(t) = N p e^t (pe^t + q)^{N-1} + N(N-1)(pe^t)^2 (pe^t + q)^{N-2} \quad (5)$$

Assim,

$$E(Y) = G'(0) = N p \quad (6)$$

ou seja,

$$\mu = N p \quad (7)$$

A variância de Y pode ser escrita na seguinte forma:

$$\sigma^2 = E(Y^2) - [E(Y)]^2 \quad (8)$$

Assim, como

$$E(Y^2) = G''(0) = N p + N(N-1)p^2 \quad (9)$$

a expressão (8) é reescrita como

$$\sigma^2 = N p + N(N - 1)p^2 - (N p)^2 = N p - N p^2 = N p(1 - p) \quad (10)$$

e portanto,

$$\sigma^2 = N p q \quad (11)$$

Dado que  $q$  é inferior à unidade, destas expressões resulta que a variância da distribuição Binomial é menor do que o seu valor esperado.

### 3. Distribuição de Poisson

A distribuição de Poisson permite descrever um vasto conjunto de fenômenos aleatórios em que os acontecimentos se repetem no tempo ou no espaço. Para simplificar a exposição, definir-se-á a distribuição de Poisson apenas para o caso em que se admitem as ocorrências do fenômeno aleatório ao longo do tempo.

Imagine-se que, tal como se representa na figura 1, o tempo se encontra dividido numa partição de intervalos de pequena dimensão,  $\Delta t$ .

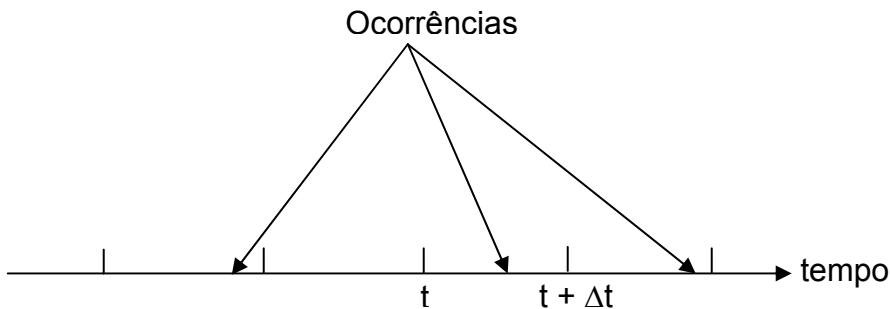


Figura 1 – Partição do tempo em intervalos de dimensão,  $\Delta t$ .

A variável discreta *número de ocorrências por unidade de tempo* seguirá uma distribuição de Poisson quando se verificarem os quatro postulados seguintes:

(1) Os números de ocorrências registradas nos intervalos da partição são independentes entre si;

(2) A distribuição do número de ocorrências em cada intervalo é a mesma para todos os intervalos;



(3) A probabilidade de se registrar uma ocorrência num intervalo qualquer de dimensão  $\Delta t$ ,  $\Delta P_1$ , é praticamente proporcional à dimensão do intervalo, ou seja,

$$\Delta P_1 = \lambda \Delta t$$

onde  $\lambda$  representa uma constante positiva. No limite, quando a dimensão do intervalo tende para zero, admite-se que

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta P_1}{\Delta t} = \frac{dP_1}{dt} = \lambda \quad (12)$$

(4) A probabilidade de se registrarem duas, três ou mais ocorrências num intervalo qualquer de dimensão  $\Delta t$ ,  $\Delta P_n$  ( $n \geq 2$ ) é desprezível quando comparada com a probabilidade  $\Delta P_1$ . No limite, quando a dimensão do intervalo tende para zero, admite-se que

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta P_n}{\Delta t} = \frac{dP_n}{dt} = 0 \quad (n \geq 2) \quad (13)$$

A partir destas condições, pode estabelecer-se a forma funcional da distribuição de Poisson. Como se mostra no próximo item, a probabilidade de se registrarem  $y$  ocorrências no intervalo  $[0, t]$  é dada por:

$$p_y(t) = e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^y}{y!} \quad (14)$$

Esta expressão define a função de probabilidade de uma variável aleatória  $Y$  ( $Y = 0, 1, 2, \dots$ ) seguindo uma distribuição de Poisson com parâmetro  $\lambda t$ . Como se verá no próximo item, o parâmetro  $\lambda t$  representa o valor esperado ( $\mu_y(t)$ ) do número de ocorrências num intervalo qualquer de dimensão  $t$ . Assim,  $\lambda = \mu_y(t) / t$  corresponde ao número médio de ocorrências por unidade de tempo, ou seja, corresponde à taxa média de ocorrências.

Interpretando o significado de  $\lambda$ , pode reescrever-se a função de probabilidade de  $Y$  expressando-a para um intervalo de tempo de dimensão unitária ( $t = 1$ ) e adotando uma notação idêntica à que foi utilizada anteriormente:

$$p_y(y) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^y}{y!} \quad (15)$$

#### 4. Caracterização da Função de Probabilidade da Distribuição de Poisson

(1) Denote-se por  $p_y(t)$  a probabilidade de se verificarem  $y$  ocorrências (com  $y = 0, 1, 2, \dots$ ) no intervalo de  $[0, t]$ .

(2) Calcule-se  $p_y(t+\Delta t)$  (ou seja, a probabilidade de se registrarem  $y$  ocorrências no intervalo  $[0, t+\Delta t]$ , considerando separadamente as duas situações seguintes:

$$y = 0$$

e

$$y > 0$$

(3) Desenvolvimento de  $p_0(t+\Delta t)$

A não ocorrência do fenômeno no intervalo  $[0, t+\Delta t]$  é equivalente à não ocorrência do fenômeno tanto no intervalo  $[0, t]$  como no intervalo  $[t, t+\Delta t]$ . Levando-se em conta o primeiro postulado, temos

$$p_0(t+\Delta t) = p_0(t) \Delta P_0 \quad (16)$$

onde  $\Delta P_0$ , a probabilidade de não se rejeitar qualquer ocorrência no intervalo  $[t, t+\Delta t]$ , é dada por

$$\Delta P_0 = 1 - \Delta P_1 - \Delta P_2 - \Delta P_3 - \dots = 1 - \Delta P_1 - \sum_{n=2}^{\infty} \Delta P_n \quad (17)$$

Substituindo a equação (17) na equação (16), obtém-se

$$p_0(t+\Delta t) = p_0(t) \left( 1 - \Delta P_1 - \sum_{n=2}^{\infty} \Delta P_n \right) \quad (18)$$

ou, reordenando os termos,

$$p_0(t + \Delta t) - p_0(t) = -p_0(t) \left( \Delta P_1 + \sum_{n=2}^{\infty} \Delta P_n \right) \quad (19)$$

Dividindo-se ambos os membros desta equação por  $\Delta t$ , obtém-se

$$\frac{p_0(t + \Delta t) - p_0(t)}{\Delta t} = -p_0(t) \left( \frac{\Delta P_1}{\Delta t} + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{\Delta P_n}{\Delta t} \right) \quad (20)$$

Tomando o limite desta expressão quando  $\Delta t$  tende para zero e tendo em conta os postulados (3) e (4), temos

$$\frac{dp_0(t)}{dt} = -p_0(t) \left( \frac{dP_1}{dt} + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{dP_n}{dt} \right) \quad (21)$$

ou

$$\frac{dp_0(t)}{dt} = -\lambda p_0(t) \quad (22)$$

(4) Desenvolvimento de  $p_y(t + \Delta t)$  com  $y > 0$

Neste caso, a(s) ocorrência(s) registrada(s) no intervalo de  $[0, t + \Delta t]$  distribuir-se-á(ão) pelos intervalos de  $[0, t]$  e  $[t, t + \Delta t]$ . Por exemplo, para  $y = 3$ , as combinações de ocorrências a considerar são (3, 0), (2, 1), (1, 2) e (0, 3), vindo

$$p_3(t + \Delta t) = p_3(t) \Delta P_0 + p_2(t) \Delta P_1 + p_1(t) \Delta P_2 + p_0(t) \Delta P_3 \quad (23)$$

ou, substituindo  $\Delta P_0$  pela sua expressão (17)

$$p_3(t + \Delta t) = p_3(t) \left( 1 - \Delta P_1 - \sum_{n=2}^{\infty} \Delta P_n \right) + p_2(t) \Delta P_1 + p_1(t) \Delta P_2 + p_0(t) \Delta P_3 \quad (24)$$

Reordenando os termos, obtém-se

$$p_3(t + \Delta t) - p_3(t) = -p_3(t)\Delta P_1 - p_3(t)\sum_{n=2}^{\infty}\Delta P_n + p_2(t)\Delta P_1 + p_1(t)\Delta P_2 + p_0(t)\Delta P_3 \quad (25)$$

Dividindo ambos os membros desta equação por  $\Delta t$  e tomando o limite quando  $\Delta t$  tende para zero, obtém-se

$$\frac{dp_3(t)}{dt} = -p_3(t)\frac{dP_1}{dt} - p_3(t)\sum_{n=2}^{\infty}\frac{dP_n}{dt} + p_2(t)\frac{dP_1}{dt} + p_1(t)\frac{dP_2}{dt} + p_0(t)\frac{dP_3}{dt} \quad (26)$$

$$\frac{dp_3(t)}{dt} = \lambda [p_2(t) - p_3(t)] \quad (27)$$

Seria fácil generalizar este resultado ao caso geral em que  $y > 0$ , obtendo-se

$$\frac{dp_y(t)}{dt} = \lambda [p_{y-1}(t) - p_y(t)] \quad (y > 0) \quad (28)$$

É imediato verificar que o sistema constituído pelas equações diferenciais (22) e (28) admite como solução geral

$$p_y(t) = e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^y}{y!} \quad (y \geq 0) \quad (29)$$

De fato, para  $y = 0$ , obtém-se

$$p_0(t) = e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^0}{0!} = e^{-\lambda t} \quad \text{e} \quad \frac{dp_0(t)}{dt} = -\lambda e^{-\lambda t} = -\lambda p_0(t) \quad (30)$$

resultado que está de acordo com a expressão (22).

Para  $y > 0$ , temos

$$\frac{dp_y(t)}{dt} = \frac{d}{dt} \left[ e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^y}{y!} \right] = -\lambda e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^y}{y!} + e^{-\lambda t} y \frac{(\lambda t)^{y-1}}{y!} \lambda \quad (31)$$

$$\frac{dp_y(t)}{dt} = -\lambda \left[ e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^y}{y!} \right] + \lambda \left[ e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^{y-1}}{(y-1)!} \right] \quad (32)$$

$$\frac{dp_y(t)}{dt} = -\lambda p_y(t) + \lambda p_{y-1}(t) = -\lambda [p_{y-1}(t) - p_y(t)] \quad (33)$$

resultado que está de acordo com a expressão (28).

### 5. Valor Esperado e Variância de uma Variável Aleatória com Distribuição de Poisson

A função geradora de momentos da variável aleatória  $Y$  é

$$G(t) = E[e^{ty}] = \sum_{y=0}^{\infty} e^{ty} e^{-\lambda} \frac{\lambda^y}{y!} = e^{-\lambda} \sum_{y=0}^{\infty} \frac{(\lambda e^t)^y}{y!} \quad (34)$$

donde 
$$G(t) = e^{-\lambda} e^{\lambda e^t} \quad (35)$$

Derivando a expressão (35) em relação a  $t$ , temos

$$G'(t) = e^{-\lambda} e^{\lambda e^t} \lambda e^t = \lambda e^{-\lambda} e^{(t+\lambda e^t)} \quad (36)$$

$$G'(t) = \lambda e^{-\lambda} e^{(t+\lambda e^t)} (1 + \lambda e^t) \quad (37)$$

Assim,

$$E(Y) = G'(0) = \lambda \quad (38)$$

ou seja,

$$\mu = \lambda \quad (39)$$

Por outro lado,

$$E(Y^2) = G''(0) = \lambda(\lambda + 1) \quad (40)$$

Como

$$\sigma^2 = E(Y^2) - [E(Y)]^2 \quad (41)$$

temos

$$\sigma^2 = E(Y^2) - [E(Y)]^2 = \lambda(\lambda + 1) - \lambda^2 \quad (42)$$

ou, finalmente,

$$\sigma^2 = \lambda \quad (43)$$

Uma das particularidades interessantes da distribuição de Poisson é a que o valor esperado e a variância são iguais, conforme pode ser visto nas equações (39) e (43).

## 6. Relação entre a Distribuição de Poisson e a Distribuição Binomial

Considere uma distribuição Binomial  $B(N, p)$  e tome-se a situação limite na qual  $N \rightarrow \infty$  e  $Np = \lambda$ . Nesta situação o número de experiências de Bernoulli cresce para infinito, e a probabilidade de sucesso decresce para zero, por forma a que o número médio de sucessos se mantenha constante em torno do valor  $\lambda$ .

## 7. Aproximação de uma Distribuição Binomial $(N, p)$ por uma Distribuição de Poisson $(\lambda)$

A função de probabilidade da variável  $Y$  com distribuição binomial pode ser reescrita na seguinte forma:

$$p(y) = \binom{N}{y} p^y q^{N-y} \quad (44)$$

$$p(y) = \frac{1}{y!} [N(N-1) \dots (N-y+1)] p^y q^{N-y} \quad (45)$$

$$p(y) = \frac{1}{y!} \left[ \frac{N(N-1) \dots (N-y+1)}{N^y} \right] (Np)^y q^{N-y} \quad (46)$$

$$p(y) = \frac{1}{y!} \left[ 1 \left( 1 - \frac{1}{N} \right) \left( 1 - \frac{2}{N} \right) \dots \left( 1 - \frac{y-1}{N} \right) \right] (Np)^y q^{N-y} \quad (47)$$

Admitindo que  $Np = \lambda$  e tomando o limite de  $p(y)$  quando  $N \rightarrow \infty$ , obtém-se

$$\lim_{N \rightarrow \infty} p(y) = \lim_{N \rightarrow \infty} \left\{ \frac{1}{y!} \left[ 1 \left( 1 - \frac{1}{N} \right) \dots \left( 1 - \frac{y-1}{N} \right) \right] (Np)^y q^{N-y} \right\} \quad (48)$$

$$\lim_{N \rightarrow \infty} p(y) = \lim_{N \rightarrow \infty} \left\{ \frac{1}{y!} \left[ 1 \left( 1 - \frac{1}{N} \right) \dots \left( 1 - \frac{y-1}{N} \right) \right] \lambda^y \left( 1 - \frac{\lambda}{N} \right)^{N-y} \right\} \quad (49)$$

$$\lim_{N \rightarrow \infty} p(y) = \frac{1}{y!} \lambda^y \lim_{N \rightarrow \infty} \left\{ \left[ 1 \left( 1 - \frac{1}{N} \right) \dots \left( 1 - \frac{y-1}{N} \right) \right] \left( 1 - \frac{\lambda}{N} \right)^N / \left( 1 - \frac{\lambda}{N} \right)^y \right\} \quad (50)$$

$$\lim_{N \rightarrow \infty} p(y) = \frac{1}{y!} \lambda^y \left\{ \frac{e^{-\lambda}}{1} \right\} = \frac{1}{y!} \lambda^y e^{-\lambda} \quad (51)$$

ou seja,

$$\lim B(N, p)_{N \rightarrow \infty} \equiv Poisson(\lambda) \quad (52)$$

O interesse prático de aproximar uma distribuição Binomial por uma de Poisson resulta do cálculo da função de probabilidade ser mais simples no segundo caso. Tal aproximação só é razoável quando N for grande ( $N \geq 20$ ) e só tem interesse quando a distribuição Binomial for assimétrica ( $Np < 7$ ).

## **ANEXO II**



Tween 60 – Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,001	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
	0,003	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,01	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
	0,03	$9,5 \times 10^1$	22	92	382
Amostra B	0,001	$4,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,003	$9,5 \times 10^1$	22	92	382
	0,01	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
	0,03	$9,5 \times 10^1$	22	92	382
Amostra C	0,001	$4,5 \times 10^3$	969	4239	18403
	0,003	$4,5 \times 10^3$	969	4239	18403
	0,01	$9,5 \times 10^3$	2204	9146	38074
	0,03	$4,5 \times 10^3$	969	4239	18403

Tween 60 – Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,001	$2,5 \times 10^2$	56	230	933
	0,003	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,01	$15 \times 10^2$	443	1466	4865
	0,03	$2,5 \times 10^3$	569	2302	9338
Amostra B	0,001	$4,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,003	$4,5 \times 10^3$	969	4239	18403
	0,01	$2,5 \times 10^4$	5680	22880	92498
	0,03	$2,5 \times 10^4$	5680	22880	92498
Amostra C	0,001 *	$15 \times 10^3$	238	522	1147
	0,003	$7,5 \times 10^3$	18742	73227	287258
	0,01	$2,5 \times 10^6$	54884	212878614	829354
	0,03	$2,5 \times 10^6$	54884	212878614	829354

\* Indicação de transgressão de pelo menos um dos pressupostos do método do NMP com “razão de improbabilidade” de  $3,46 \times 10^{-7}$

Tween 80 – Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,0002	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,001	$4,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,01	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
	0,03	$7,5 \times 10^2$	189	740	2906
Amostra B	0,0002	$9,5 \times 10^0$	2	9	3
	0,001	$2,5 \times 10^0$	1	2,30	9
	0,01	$2,5 \times 10^0$	1	2,30	9
	0,03	$2,5 \times 10^0$	1	2,30	9
Amostra C	0,0002	$2,5 \times 10^4$	5679	22872	92447
	0,001	$2,5 \times 10^5$	54783	212132	825064
	0,01	$4 \times 10^5$	92803	347991	1310900
	0,03	$4 \times 10^4$	9554	37834	150398

Tween 80 – Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,0002	$4,0 \times 10^2$	96	382	1531
	0,001	$9,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,01	$2,5 \times 10^3$	569	2302	9338
	0,03	$9,5 \times 10^3$	2204	9146	38074
Amostra B	0,0002	$2,5 \times 10^0$	1	2,30	9
	0,001	$2,5 \times 10^0$	1	2,30	9
	0,01	$4,0 \times 10^0$	1	4	15
	0,03	$2,0 \times 10^0$	0,7	2	6
Amostra C	0,0002	$20 \times 10^2$	1417	3467	8511
	0,001	$3,0 \times 10^5$	783354	1977482	5018064
	0,01	$4,5 \times 10^5$	95766	386101	1563869
	0,03	$9,5 \times 10^5$	180979	711885	2813840

CTAB – Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,00001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,00005	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,0001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,001	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
Amostra B	0,00001	$2,5 \times 10^0$	1	2	9
	0,00005	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,0001	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
	0,001	$9,5 \times 10^0$	2	9	38
Amostra C	0,00001	$9,5 \times 10^3$	54783	212132	825064
	0,00005	$3,5 \times 10^4$	9775	41959	180803
	0,0001	$4,5 \times 10^5$	14586	35887	88620
	0,001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93

CTAB – Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,00001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,00005	$4,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,0001	$2,5 \times 10^2$	57	230	933
	0,001	$2,5 \times 10^2$	6	23	93
Amostra B	0,00001	$2,5 \times 10^0$	1	2,	9
	0,00005	$2,5 \times 10^0$	1	2	9
	0,0001	$2,5 \times 10^0$	1	2	9
	0,001	$2,5 \times 10^0$	1	2	9
Amostra C	0,00001	$9,5 \times 10^3$	2204	9146	38074
	0,00005	$20 \times 10^2$	1417	3467	8511
	0,0001	$9,5 \times 10^5$	182873	722004	2864451
	0,001	$2,5 \times 10^0$	1	2	9

SDS – Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,0002	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,005	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,01	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
Amostra B	0,0002	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,001	$4,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,005	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,01	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
Amostra C	0,0002	$4,5 \times 10^4$	9775	41959	180803
	0,001	$2,5 \times 10^5$	54783	212132	825064
	0,005	$7,5 \times 10^3$	1888	7397	29069
	0,01	$7,5 \times 10^2$	189	740	2906

SDS – Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)					
	Concentração (%m/v)	Tabela: NMP (células/mL)	Planilha: NMP (células/mL)		
		Estimativa	Limite inferior	Estimativa	Limite superior
Amostra A	0,0002	$4,5 \times 10^1$	10	42	184
	0,001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,005	$2,5 \times 10^0$	1	2	9
	0,01	$2,5 \times 10^0$	1	2	9
Amostra B	0,0002	$4 \times 10^1$	1	4	15
	0,001	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
	0,005	$4,5 \times 10^1$	1	4	18
	0,01	$2,5 \times 10^1$	6	23	93
Amostra C	0,0002	$9,5 \times 10^2$	221	918	3821
	0,001	$15 \times 10^0$	4	15	49
	0,005	$2,5 \times 10^2$	11	28	76
	0,01	$2,5 \times 10^0$	1	2	9