

**HENRIQUE MOREIRA SIMON**

**Desenvolvimento e implantação de metodologia para  
avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias  
frente a microrganismos envolvidos em processos de  
biocorrosão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Programa de pós-graduação interunidades em biotecnologia**

Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Instituto Butantan

**HENRIQUE MOREIRA SIMON**

**Desenvolvimento e implantação de metodologia para  
avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias  
frente a microrganismos envolvidos em processos de  
biocorrosão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria Filomena de Andrade Rodrigues.

Versão corrigida.

A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Moreira Simon, Henrique

Desenvolvimento e implantação de metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias frente a microrganismos envolvidos em processos de biocorrosão / Henrique Moreira Simon; orientadora Maria Filomena de Andrade Rodrigues. -- São Paulo, 2022.

114 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. biocorrosão. 2. BRS. 3. NMP. 4. microescala. 5. biocidas. I. Filomena de Andrade Rodrigues, Maria, orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Programa de pós-graduação interunidades em biotecnologia**

Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Instituto Butantan

**FOLHA DE APROVAÇÃO DE BANCA**

Candidato(a): Henrique Moreira Simon

Título da dissertação: Desenvolvimento e implantação de metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias frente a microrganismos envolvidos em processos de biocorrosão.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a) Maria Filomena de Andrade Rodrigues

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_, considerou:

**( ) Aprovado(a)    ( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura: .....

Nome:.....

Instituição:.....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO 859/2017 - Errata

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **859/2017** referente ao projeto intitulado: ***"Desenvolvimento e implantação de metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias frente a microrganismos envolvidos em processos de Biocorrosão"*** sob a responsabilidade de ***Henrique Moreira Simon*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Profa. Dra. Maria Filomena de Andrade Rodrigues***, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia USP, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 09 de maio de 2022.

*Luciane Valéria Sita*

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**  
Coordenadora CEPSH

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Maria Conceição e Daniel, pela dedicada e valorosa criação, superando os desafios encontrados e sendo exemplo de conduta para minha formação pessoal;

Às forças que regem o universo, invisíveis aos nossos olhos, mas presentes e perceptíveis nos mínimos detalhes e ações de nossas vidas;

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, pela compreensão, auxílio e palavras de conforto quando necessário;

À estimada amiga Roberta, antes amiga e que se tornou minha “veterana” no programa de pós-graduação, pela camaradagem durante o curso das disciplinas, e também a todos os alunos que tive oportunidade de conhecer e ter amizade durante o decorrer do Mestrado;

Aos todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), auxiliares, administrativos, técnicos e pesquisadores, que contribuem todos os dias na minha evolução profissional, e que me ajudaram nas atividades de meu projeto;

Aos colegas do Laboratório de Corrosão e Proteção do IPT, pela interação a respeito de detalhes técnicos sobre o tema estudado no projeto e contribuições para esclarecimento de eventuais dúvidas;

À colega Olga S. Yoshida do Laboratório de Vazão do IPT, pela contribuição e explicação a respeito do tratamento estatístico aplicado neste trabalho.

Agradeço com carinho aos estagiários os quais tive a honra de supervisionar durante este período e me ajudaram imensamente nas atividades, e que se tornaram grandes amigos: Caroline, Wellington e Alessandra;

À Fundação de Apoio ao IPT (FIPT) e às lideranças do Núcleo de Bionomanufatura (BIONANO) pelo provimento dos recursos necessários para as atividades do projeto, em especial a Adriano, Natália e Patricia;

E por fim, meu maior agradecimento ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e também à minha orientadora Maria Filomena, pela oportunidade concedida para meu aprimoramento profissional;

“O segredo da existência humana reside não só em viver, mas também em saber para que se vive.”

*Fiódor Dostoiévski*



## RESUMO

SIMON, H. M. **Desenvolvimento e implantação de metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias frente a microrganismos envolvidos em processos de biocorrosão.** 2022. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O fenômeno de corrosão é um processo natural que resulta na deterioração de metais e ligas. Os microrganismos são capazes de produzir substâncias que favorecem as reações químicas envolvidas nos mecanismos de corrosão destes materiais, fenômeno que é identificado como Biocorrosão ou Corrosão Induzida por Microrganismos (CIM). O monitoramento e controle dos eventos de biocorrosão na indústria petrolífera ainda utiliza com frequência a contagem do Número Mais Provável (NMP) de microrganismos, dentro das opções de métodos dependentes de cultivo. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) se destacam como principais responsáveis pela biocorrosão em sistemas petrolíferos, pois promovem o aumento da corrosão metálica pela ação do sulfeto produzido a partir da redução metabólica do sulfato. O controle da população destas bactérias é feito principalmente com a aplicação de substâncias biocidas, a fim de mitigar os efeitos produzidos pela atividade destes microrganismos. O uso excessivo destas substâncias gera um impacto ambiental significativo, considerado a toxicidade dos biocidas utilizados, a possibilidade de aquisição de resistência por parte dos microrganismos, e também a eventual inativação destes produtos por meio de mudanças nas condições físicas e químicas dos sistemas petrolíferos. Considerando os aspectos mencionados, possui significativa relevância a implantação de métodos que permitam selecionar de maneira assertiva biocidas mais adequados e que possam ser facilmente aplicados pelos operadores da indústria petrolífera e que entreguem resultados em menor tempo. Este trabalho teve como objetivo propor um ensaio microbiológico de avaliação da atividade antimicrobiana de três produtos biocidas (THPS, Glutaraldeído e Isotiazolona) frente às linhagens *Desulfotomaculum nigrificans* e *Desulfovibrio desulfuricans*, considerando o uso de métodos distintos para quantificação de NMP, em relação ao meio de cultura utilizado e à escala de cultivo adotada para obter os resultados. Os ensaios foram realizados com o método de NMP convencional em triplicata de frascos e com o método de NMP em microplacas incubadas em jarras

com ambiente anaeróbio produzido por 7 dias de incubação. Os resultados observados indicaram ser possível aplicar ambos os métodos para o produto THPS na determinação da concentração inibitória mínima frente aos microrganismos *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 e *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577. A concentração de 100 mg/L do THPS foi observada como a mínima inibitória quando realizada a exposição por 15 minutos ao biocida, com posterior quantificação do NMP da população viável recuperada com incubação de 7 dias nos meios selecionados e identificados como “DA” e “DA modificado”, em ambas as escalas selecionadas para a avaliação. O produto glutaraldeído apresentou resultados de inibição dos microrganismos na ordem de 99,99% nas concentrações de 100 mg/L e 250 mg/L nas mesmas condições de exposição e incubação, com a diferença de que este resultado foi verificado principalmente nos meios de cultura “Postgate E Modificado”, “DA Modificado” e “ATCC 42 Medium”. Não foram observados resultados de inibição para o produto Isotiazolona nos ensaios realizados. Os resultados obtidos permitem considerar como opção viável a adoção de contagens de NMP em microplaca como alternativa para validação de produtos biocidas para uso em campo.

**Palavras-chave:** biocorrosão. BRS. NMP. microescala. biocidas.

## ABSTRACT

SIMON, H. M. **Development and implementation of a methodology for the antimicrobial activity of substances in the face of tests developed in biocorrosion processes.** 2022. 114 f. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The phenomenon of corrosion is a natural process that results in the deterioration of metals and alloys. Microorganisms are capable of producing substances that facilitate the chemical reactions involved in corrosion mechanisms of these materials, a phenomenon identified as Biocorrosion or Microorganism-Induced Corrosion (MIC). The monitoring and control of biocorrosion events in the oil industry still uses quite frequently the Most Probable Number (MPN) count of microorganisms, within the options of cultivation-dependent methods. Sulfate-reducing bacteria (SRB) stand out as the main responsible for biocorrosion in oil systems, as they promote an increase in the sulfur content in the oil extracted and transported in several segments of the systems. The control of these bacteria is done with the application of biocidal substances, in order to mitigate the effects originated by the activity of these microorganisms. The excessive use of these substances generates a significant environmental impact, considering the toxicity of the applied biocides, the possibility of microorganisms acquiring resistance, and the eventual inactivation of these products through changes in the physical and chemical conditions on the oil systems. Considering the aforementioned aspects, the implementation of methods that allow the assertive selection of the most appropriate biocides, with simple execution by the operators of the oil industry and that deliver results in less time, is of significant importance. This work aimed to propose a microbiological assay to evaluate the antimicrobial activity of three biocidal products (THPS, Glutaraldehyde and Isothiazolone) against the strains *Desulfotomaculum nigricans* and *Desulfovibrio desulfuricans*, considering the use of different methods for quantification of NMP, in relation to the medium of culture used and the scale of cultivation adopted to obtain the results. The assays were carried out with the conventional NMP method in triplicate of flasks and with the NMP method in microplates incubated in jars with an anaerobic environment produced, for up to 7 days of incubation. The observed results indicated that it is possible to apply both methods to the THPS product when used in an evaluation to determine its minimum inhibitory concentration against the

microorganisms *Desulfotomaculum nigricans* ATCC 19998 and *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 19998, with a concentration of 100 mg/L of THPS observed as the minimum inhibitory when exposed to the biocide for 15 minutes, with subsequent quantification of the MPN of the viable population recovered with an incubation of 7 days in the selected media and identified as "DA" and "modified DA", in both scales selected for the evaluation. The product glutaraldehyde showed results of inhibition of microorganisms in the order of 99.99% at concentrations of 100 mg/L and 250 mg/L under the same exposure and incubation conditions, with the difference that this verified result mainly in the culture media "Postgate E Modified", "DA Modified" and "ATCC 42 Medium". No inhibition results were observed for the Isothiazolone product in the tests performed. The results obtained allow us to consider the adoption of MPN counts in microplate as a viable alternative to the validation of biocidal products for in-field use.

**Keywords:** biocorrosion. biocides. MPN. SRB. Microscale.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Justificativa</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>3.1 Corrosão e Biocorrosão</b> .....	19
<b>3.2 Bactérias Redutoras de Sulfato</b> .....	20
3.2.1 Metabolismo dissimilatório das BRS .....	22
<b>3.3 BRS e biocorrosão</b> .....	24
<b>3.4 Controle e monitoramento da biocorrosão na indústria petrolífera</b> .....	26
3.4.1 Detecção de microrganismos em sistemas petrolíferos .....	27
3.4.2 Detecção e quantificação por NMP .....	27
3.4.3 Fundamentos estatísticos da técnica do NMP .....	28
3.4.4 Considerações gerais sobre a técnica do NMP .....	31
3.4.5 NMP aplicado à quantificação de BRS .....	32
<b>3.5 Cultivo e detecção de BRS em microescala</b> .....	33
<b>3.6 Biocidas</b> .....	34
<b>3.7 Aplicação de biocidas na Indústria Petrolífera.</b> .....	36
3.7.1 Glutaraldeído .....	37
3.7.2 THPS .....	39
3.7.3 Isotiazolonas .....	42
<b>3.8 Ensaio para avaliação de biocidas.</b> .....	44
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
<b>4.1 Materiais e reagentes utilizados</b> .....	47
4.1.1 Linhagens .....	47
4.1.2 Meios de cultura .....	47
4.1.3 Biocidas .....	52
4.1.4 Materiais utilizados .....	53
<b>4.2 Métodos realizados.</b> .....	53
4.2.1 Definição das condições de cultivo .....	53
4.2.2 Ensaio de NMP em escala convencional (frascos) .....	53
4.2.3 Ensaio de NMP em microplacas .....	55
4.2.4 Avaliação de atividade antibacteriana com as linhagens de referência .....	59
4.2.5 Avaliação de atividade antibacteriana do THPS em amostras ambientais .....	60
<b>4.3 Tratamento e expressão dos resultados</b> .....	62

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>5.1 Seleção dos meios de cultura</b> .....	65
<b>5.2 Resultados de quantificação de NMP</b> .....	67
<b>5.3 Resultados das avaliações com biocidas.</b> .....	72
5.3.1 THPS .....	72
5.3.2 Glutaraldeído.....	81
5.3.3 Isotiazolona .....	84
<b>5.4 Avaliação do THPS em amostras ambientais.</b> .....	87
<b>5.5 Considerações gerais sobre os resultados obtidos.</b> .....	89
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	92
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94
<b>8 APÊNDICE</b> .....	110
<b>Trabalhos Apresentados em Congressos</b> .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos podem interferir em diversos sistemas e processos industriais. Dentre os fenômenos observados devido à sua ação, destaca-se a biocorrosão ou Corrosão Induzida por Microrganismos (CIM), fenômeno no qual a corrosão de determinado metal estará favorecida pela ação de substâncias originadas do metabolismo de espécies presentes em tais ambientes, com o aumento das reações eletroquímicas de óxido-redução na superfície metálica e, por consequência, maior processo de corrosão (VIDELA, 2003; ZARASVAND; RAI, 2014; DALL'AGNOL; CORDAS; MOURA, 2014)

Em sistemas dedicados para a indústria de óleo e gás, a contaminação microbiológica merece significativa atenção por conta da ocorrência de eventos de biocorrosão nos sistemas dedicados à extração, transporte e armazenamento (RODRIGUES et al., 2013). O uso de processos de recuperação secundária de petróleo em poços por meio da injeção de água de produção, por exemplo, é um dos principais fatores para contribuir com o aumento de eventos de biocorrosão, não somente pela probabilidade de injeção de microrganismos, mas também dos nutrientes apropriados para a sua proliferação nas tubulações (CORTÁS; CARREIRA; COSTA, 2012; XU et al., 2017; GU et al., 2019).

Dentre os microrganismos frequentemente encontrados em sistemas dedicados ao processamento de petróleo, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) merecem atenção devido à sua contribuição nos eventos corrosivos caracterizados pela formação de pites sob os biofilmes estabelecidos nas superfícies metálicas de dutos e tanques, e também com a produção de sulfeto ( $S^{-2}$ ) sob condições de anaerobiose. O sulfeto em ambientes ácidos se converte no sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), um gás tóxico e corrosivo, responsável também pela diminuição da qualidade do petróleo devido ao aumento do teor de enxofre (*souring*) no conteúdo extraído de poços (AZZAM; SAMI; KANDILE, 2012; ALBUQUERQUE; ANDRADE; NEVES, 2014; BASAFA; HAWBOLDT, 2019).

Estratégias de monitoramento e controle da biocorrosão são adotadas na indústria petrolífera com o objetivo de mitigar o impacto causado pela atividade metabólica das espécies microbianas no conteúdo de petróleo extraído e processado, de modo a garantir a qualidade do conteúdo transportado e a integridade estrutural dos sistemas dedicados a estas atividades. Dentre as estratégias adotadas pelos operadores, utiliza-se a aplicação de biocidas para alcançar a inativação dos microrganismos (VIDELA; HERRERA, 2009; ARAÚJO et al., 2013).

Devido à sua praticidade de aplicação nas atividades de monitoramento microbiológico em campo, os métodos dependentes de cultivo para quantificação de espécies em amostras coletadas do ambiente petrolífero ainda estão entre os mais utilizados. Estes métodos, quando utilizados para bactérias que apresentam metabolismo lento como as BRS, possuem como desvantagem o tempo necessário para obtenção dos resultados, uma vez que estas espécies necessitam de período significativo de incubação para obter um resultado confiável com a técnica mais utilizada para sua quantificação, que é a detecção do Número Mais Provável (NMP) (KUMARASWAMY et al., 2011; BHAGOBATY, 2014; KOTU; MANNAN; JAYARAMAN, 2019).

Portanto, é de interesse dispor de ensaios microbiológicos que permitam avaliar de maneira mais célere a atividade antimicrobiana de biocidas para a indústria petrolífera, com enfoque em obter uma melhor resposta inibitória frente a microrganismos promotores de biocorrosão tais como as BRS. Tais ensaios permitirão direcionar de maneira mais adequada o investimento a ser realizado na implantação de novos protocolos de controle e monitoramento de sistemas petrolíferos.

## **1.1 Justificativa**

Estima-se que, atualmente, 20% do custo total mundial relacionado a controle de eventos de corrosão se deve à ação de microrganismos. Em números, isso corresponde a aproximadamente de 30 a 50 bilhões de dólares anuais (US\$), relacionados ao custo direto para execução de atividades específicas para eliminação



dos eventos, tais como: paradas de instalações para substituições de estruturas; paradas para limpeza; manutenção e substituição de elementos filtrantes ou de medição; remoção de depósitos biológicos em sistemas de armazenamento e tubulações, dentre outros (BOWMAN et al., 2016; HOU et al., 2017; JAVAHERDASHTI; AKVAN, 2020).

Os métodos mais utilizados atualmente para prevenir e controlar a biocorrosão na indústria petrolífera consistem na limpeza com agentes mecânicos associada à adição de agentes biocidas. Estes produtos atuam basicamente suprimindo o crescimento ou a atividade metabólica dos microrganismos, eliminando-os dos sistemas industriais (VIDELA; HERRERA, 2005; ARAÚJO et al., 2013).

A escolha do biocida a ser utilizado dependerá da natureza dos microrganismos a serem eliminados e das condições de operação atribuídas ao sistema afetado. Assim, segundo VIDELA (2003), algumas características são desejáveis, como:

- (a) ser seletivo aos microrganismos alvo para eliminação do sistema;
- (b) manter efeito inibidor mesmo na presença de outras substâncias presentes no meio em condições semelhantes às de operação.;
- (c) não atuar como agente corrosivo quando em contato com ligas e metais presentes nos sistemas;
- (d) apresentar baixo custo;
- (e) ser seguro para o manuseio do operador, nas condições de dosagem especificadas para utilização;
- (f) apresentar impacto ambiental mínimo, com adequada biodegradabilidade.

Um dos maiores desafios atuais no monitoramento e controle específico para as BRS com uso de biocidas consiste em possibilitar a avaliação da atividade destes produtos de modo mais ágil. Desta maneira, são desejadas metodologias que propiciem resultados válidos em um menor intervalo de tempo, de modo a contornar a questão do crescimento lento observado para estas bactérias devido à necessidade

de ambientes anaeróbios e de um substrato de baixo potencial de óxido-redução (íon sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) para efetuar seu metabolismo respiratório (KOTU; MANNAN; JAYARAMAN, 2019).

Um aspecto a ser observado é o de que, uma vez que o método mais utilizado para quantificação de BRS é a técnica do NMP, a qual utiliza volume significativo de materiais e reagentes para execução dos ensaios, a alternativa em usar tal técnica nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana como maneira de quantificar o grau de redução observado para as espécies BRS deve considerar a otimização dos recursos disponíveis, a fim de estabelecer um meio termo entre a redução no tempo de incubação e o acondicionamento físico dos cultivos no ambiente laboratorial disponível, sem prejudicar a qualidade dos resultados obtidos.

Estes fatores também devem estar aliados a questões operacionais, uma vez que qualquer mudança nos procedimentos de ensaio deve manter um fácil entendimento para sua aplicação na rotina de atividades, de modo a minimizar o impacto no planejamento das operações em campo.

O entendimento destas questões serviu como ponto de partida para a elaboração e execução do projeto apresentado nesta dissertação. Espera-se que as atividades conduzidas possam contribuir para a elaboração de novos protocolos para aplicação, bem como servir de subsídio para futuras discussões referentes à aplicação conjunta com outras metodologias.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho possuiu como objetivo geral implementar e validar um ensaio microbiológico que demonstre a ação antimicrobiana de 3 produtos biocidas (THPS, Glutaraldeído e Isotiazolona) frente às linhagens de referência *Desulfotomaculum nigrificans* e *Desulfovibrio desulfuricans*, de modo a reduzir o tempo de incubação necessário destas espécies e observar se os resultados de Número Mais Provável (NMP) obtidos para estas espécies são significativos.

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

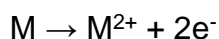
- (a) avaliar comparativamente 2 métodos de quantificação pela técnica de Número Mais Provável (NMP), com base em modificações no meio de cultura e na escala de cultivo utilizada para esta quantificação;
- (b) avaliar a eficácia da ação dos produtos biocidas com uso de método de recuperação de espécies viáveis com a quantificação por NMP em escala reduzida, com uso de microplacas posicionadas em jarras contidas com ambiente de anaerobiose promovido por sistema químico gerador comercial.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Corrosão e Biocorrosão

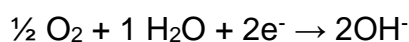
A corrosão é definida como a deterioração de um material, geralmente metálico, ocasionada pela ação química e/ou eletroquímica do meio ambiente, aliada ou não a esforços mecânicos. Esse processo ocorre de forma espontânea, com a transferência de elétrons por reações de óxido-redução, onde a superfície do metal está sujeita ao ataque pelo meio agressor, levando à formação de compostos indesejados e causando a deterioração deste metal (GENTIL, 2007)

A explicação dos mecanismos envolvidos na corrosão encontra-se bem documentada em literatura. Basicamente ocorre que, em processos espontâneos de corrosão, os elétrons são liberados da superfície do metal quando em contato com o meio líquido condutor, obtendo-se a reação de oxidação e, por consequência, o estabelecimento do sítio anódico da corrosão com a respectiva dissolução da superfície metálica (GU, 2012; ZARASVAND; RAI, 2014):

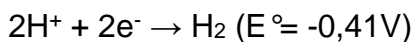


(reação anódica em superfície metálica)

Para que a reação ocorra a formar uma célula eletroquímica, com as reações de oxidação e redução em velocidades iguais, é necessário que os elétrons liberados pelo metal sejam capturados nos sítios catódicos, permitindo assim a reação de redução. As reações catódicas são distintas conforme as características do ambiente e podem ocorrer na mesma superfície do metal sob processo de dissolução, consistindo principalmente na redução do oxigênio (em pHs neutro ou alcalino, em aerobiose) ou na redução do íon hidroxônio (em pHs ácido e em anaerobiose) para consumir os elétrons liberados no sítio anódico (ZARASVAND; RAI, 2014):



(reação catódica em ambiente neutro ou alcalino)



(reação catódica em ambiente ácido)

A participação dos microrganismos com seus respectivos processos metabólicos no favorecimento das reações eletroquímicas envolvidas na corrosão de superfícies metálicas, é denominada Corrosão induzida por Microrganismos (CIM), também conhecida por corrosão microbiológica ou pelo termo biocorrosão (VIDELA, 2003; DALL'AGNOL; CORDAS; MOURA, 2014).

A biocorrosão está diretamente associada a uma série de reações eletroquímicas influenciadas pela atividade de microrganismos que estão em contato direto com a superfície metálica. Tais reações resultam na transferência de elétrons para aceptores externos e na liberação de íons metálicos no ambiente, o que confere a corrosão das superfícies metálicas (LIMA, 2010).

### **3.2 Bactérias Redutoras de Sulfato**

A importância dos microrganismos em eventos de corrosão tem sido reconhecida e a cada ano que passa, a preocupação com os impactos causados por sua ação são mais evidentes. Na indústria do petróleo, especialmente nos sistemas de transporte de óleo cru, observam-se falhas frequentes. Estão registradas na literatura evidências da participação de microrganismos anaeróbios, facultativos e aeróbios no processo corrosivo destes sistemas de maneira intensa (ENNING; GARRELF, 2014; GU et al., 2019; ALAMRI, 2020).

Uma grande diversidade de bactérias tem sido isolada ou detectada em ambientes de corrosão por variadas técnicas e relatadas como participantes nos processos corrosivos, mas devido ao seu efeito deletério promovido em operações industriais de vários setores, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) têm sido o grupo mais amplamente estudado. Este grupo de microrganismos possui a capacidade de utilizar em condições de anaerobiose o íon sulfato de maneira assimilatória (incorporação do íon em seu aparato molecular) ou dissimilatória (conversão do

sulfato a sulfeto e posterior eliminação pelo microrganismo<sup>0</sup> (POSTGATE, 1984; VIDELA; HERRERA, 2005).

Seu crescimento é favorecido nos meios de cultura que apresentem potencial de oxirredução abaixo de -100 mV, com a fonte de carbono e de elétrons distintas de acordo com o gênero de BRS, tais como ácidos graxos, ácidos de cadeia curta (lactato, piruvato), álcoois (metanol, etanol), gás Hidrogênio (H<sub>2</sub>) e ocasionalmente, açúcares e ácidos graxos de cadeia longa (p.ex: hidrocarbonetos de petróleo). Algumas espécies podem atuar também como doadores de elétrons em condições de pH ácido (POSTGATE, 1984; GIBSON, 1990; BARTON, 1995; LIMA, 2010).

As BRS se dividem em 2 grupos metabólicos baseados na oxidação do acetato. O Grupo I inclui as espécies que não catabolizam completamente o acetato e convertem o sulfato a sulfeto de hidrogênio, enquanto que as espécies constantes no grupo II convertem ácidos graxos completamente a CO<sub>2</sub> (PAULA, 2010).

A temperatura de crescimento ótima para a maioria das BRS encontra-se na faixa entre 25 e 40°C, apesar de algumas espécies tolerarem valores de até -5°C, enquanto outras apresentam crescimento ótimo em temperaturas superiores a 75°C. No que se refere ao pH para crescimento, seu valor ótimo é 7,2, porém há espécies que toleram ambientes ácidos (pH em torno de 4,0) e também alcalinos (pH em torno de 9,5). Estes microrganismos também são capazes de suportar altos valores de pressão atmosférica (em torno de 105 kPa), o que reflete junto com as demais características citadas a habilidade deste grupo em crescer em condições extremas e se adaptar a vários ambientes naturais (POSTGATE, 1984; BARTON, 1995; DE LIMA, 2010).

Ainda que sejam considerados historicamente como microrganismos anaeróbios, atualmente há entendimento que alguns gêneros toleram a presença de oxigênio e até mesmo crescem na sua presença, o que reforça sua ubiquidade no meio ambiente terrestre (MUYZER; STAMS, 2008).

A espécie *Desulfovibrio desulfuricans* é a mais conhecida e relevante para processos de biocorrosão. É uma bactéria gram-negativa com crescimento em temperatura mesófila, que possui formato de vibrio ou bacilo, e se caracteriza por

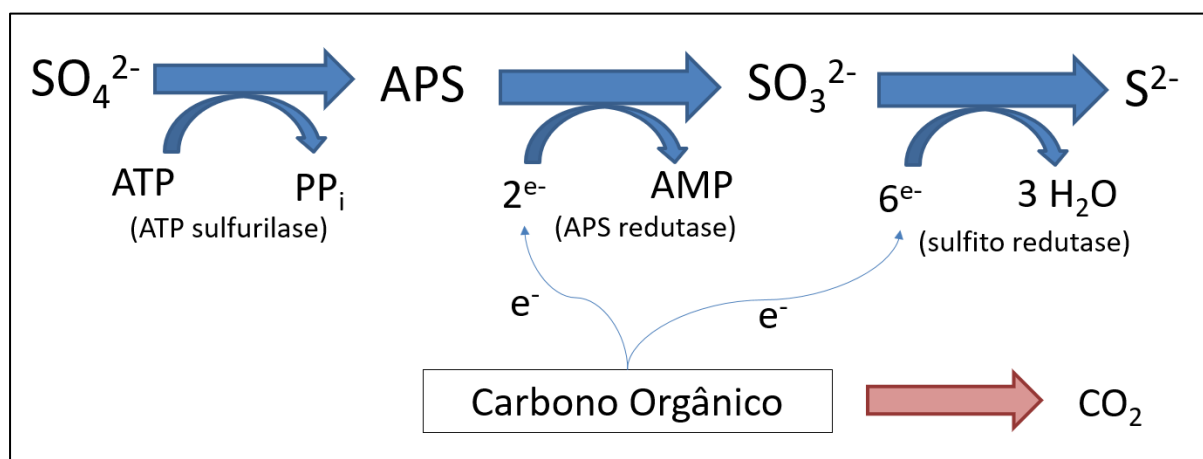
realizar a oxidação incompleta de compostos orgânicos até a forma de acetato (PAULA, 2010).

Dentre as espécies de BRS termófilas, destacam-se as espécies do gênero *Dessulfotomaculum* sp., que são espécies gram-positivas com formato de bastões, quando submetidas a crescimento como culturas puras (AÜLLO et al., 2013).

### 3.2.1 Metabolismo dissimilatório das BRS

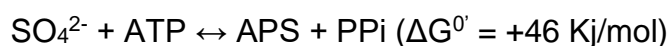
A via metabólica realizada pelas BRS mais relevante para processos de biocorrosão consiste na redução dissimilatória do sulfato (ou respiração do sulfato), com a produção de sulfeto ao final deste processo, principalmente na porção inferior dos biofilmes aderidos nas superfícies metálicas (ENNING; GARRELFIS, 2014; JIA et al., 2018). A figura 01 apresenta de forma resumida a rota metabólica envolvida no processo de respiração do sulfato e enzimas atuantes neste processo.

**Figura 01** - Rota metabólica mais comum para a respiração de sulfato, com as respectivas enzimas atuantes neste processo. (Siglas: AMP = adenosina monofosfato; ATP = adenosina trifosfato; PPi = pirofosfato).

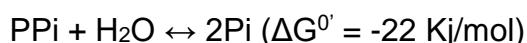


Fonte: Adaptado de ROCHA (2006) e BARBOSA (2009).

Em linhas gerais, o transporte do sulfato para o interior da célula se inicia com a ação de um complexo enzimático de transferência de elétrons para processos de respiração localizado no citoplasma celular e também na porção interna da membrana celular. Devido ao fato de o sulfato ser um composto termodinamicamente desfavorável ( $E^0 = -516$  mV) como aceptor terminal de elétrons para o metabolismo das BRS, o mesmo precisa ser ativado por meio da reação de fosforilação, etapa que fica a cargo da enzima ATP sulfurilase. O produto final da reação conduzida por esta enzima é adenosina-5-fosfossulfato (APS) e pirofosfato inorgânico (PPi) (CYPIONKA, 1989; MUYZER; STAMS, 2008; BARBOSA, 2009).



O pirofosfato formado acaba hidrolisado por uma enzima pirofosfatase, que interfere na atividade da ATP sulfurilase ao favorecer a formação de APS, conforme o balanço total das equações (BARBOSA, 2009):

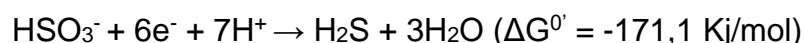


A APS é um composto mais favorável para a reação de redução que o próprio sulfato, apresentando valor de  $E^0$  (APS/sulfito) de  $-60$  mV, desta maneira se convertendo a sulfito e adenosina monofosfato (AMP). Esta reação acontecerá pela ação da enzima APS redutase, que ocorre em condições estritas de anaerobiose, o que provavelmente justifica o caráter anaeróbico das BRS (BRAMLETT; PECK, 1975; BAUMGARTNER et al., 2006; MUYZER; STAMS, 2008; BARBOSA, 2009):





O sulfito obtido acaba por ser convertido a sulfeto por meio da ação da enzima sulfito redutase (*dsr*). Esta etapa envolve a transferência direta de 6 elétrons sem gasto energético ou formação de qualquer intermediário, e é considerada crucial no processo metabólico de redução dissimilatória do sulfato (BARBOSA, 2009; OGATA et al., 2010).



A redução do sulfato promovida pelas BRS gera ao final uma grande quantidade de sulfeto livre como produto final; desta maneira, estes microrganismos se apresentam como os maiores protagonistas desta reação quando comparados a outros processos naturais de redução do enxofre (BARBOSA, 2009).

### 3.3 BRS e biocorrosão

As BRS exercem papel ativo na corrosão de ligas de ferro em ambientes industriais, por meio do sulfeto produzido com seu metabolismo dissimilatório e também por interação direta com a superfície dos metais. O sulfeto é um potencial agente da corrosão do ferro em ambientes anaeróbios. O gás sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) obtido é um composto que, além de suas propriedades corrosivas, é tóxico e representa um problema de saúde ocupacional para os operadores dos sistemas petrolíferos, bem como um problema ambiental (JURELEVICIUS et al., 2008; AZZAM; SAMI; KANDILE, 2012; WIKIEŁ et al., 2014; BASAFA; HAWBOLDT, 2019).

Particularmente nos processos de extração de petróleo em plataformas *off-shore*, o uso de injeção de água do mar como procedimento para a recuperação secundária de petróleo acaba por aumentar a formação de biofilmes, pois a mesma se apresenta como um meio rico em elementos nutritivos, tais como carbono, enxofre,

cálcio e magnésio, necessários como fonte de energia e de cofatores para as atividades enzimáticas da comunidade bacteriana estabelecida como biofilmes.

O aumento da concentração de íons sulfato no sistema acaba por favorecer a atividade das BRS e, por consequência, o conteúdo de enxofre no petróleo extraído (*souring*), o que acarreta na diminuição da sua qualidade e no aumento no custo de produção, sendo necessárias operações específicas para a remoção do enxofre no conteúdo de petróleo até o nível aceitável (BELKAID; LADJOUZI; HAMDANI, 2011; NEUMANN, 2012; CORTÁS; CARREIRA; COSTA, 2012; BASAFA; HAWBOLDT, 2019).

A corrosão anaeróbia do ferro promovida pelas BRS é do tipo localizada, constituída predominantemente por pites, com produtos de corrosão pouco aderentes, de cor escura e com odor característico de H<sub>2</sub>S. A sua ocorrência se encontra favorecida na porção inferior dos biofilmes, onde a difusão do oxigênio não se faz presente e as BRS possuem condições propícias para exercer seu metabolismo. A presença física do biofilme estabelece a ocupação na superfície do metal em sítios com características físico-químicas distintas das superfícies adjacentes (VIDELA, 2003; ENNING; GARRELF, 2014)

Os mecanismos pelos quais as BRS promovem a corrosão de superfícies metálicas são complexos e envolvem interações com outras espécies presentes no ambiente de exposição, assim como a interação com demais compostos químicos e a ação de fatores ambientais. De forma mais sucinta e de acordo com o histórico dos estudos realizados, foram propostos 2 tipos de mecanismos gerais para a biocorrosão promovida por estes microrganismos: a biocorrosão química (derivada de CMIC - “chemical microbially influenced corrosion”) e a biocorrosão elétrica (derivada de EMIC - “electrical microbially influenced corrosion”). Tais classificações servem para distinguir os efeitos diretos e indiretos, respectivamente, da ação das BRS no processo de biocorrosão (ENNING; GARRELF, 2014; ENNING et al., 2016; GU et al., 2019).

A biocorrosão química compreende os efeitos corrosivos promovidos pelos compostos produzidos a partir do metabolismo das espécies presentes nas superfícies metálicas, tais como o H<sub>2</sub>S produzido pelas BRS ou ácidos orgânicos

produzidos pela comunidade bacteriana aderida como biofilmes na superfície de ligas de alumínio. Este tipo de corrosão ocorre principalmente em ambientes onde a quantidade de substratos orgânicos doadores de elétrons seja disponível o suficiente, para que o processo de oxidação ocorra em equilíbrio com a produção dos metabólitos corrosivos (GU et al., 2019).

A biocorrosão elétrica, por outro lado, descreve o processo de corrosão pela retirada direta de elétrons a partir da superfície do metal, promovida por microrganismos litotróficos especializados. Este processo é independente da presença de substratos orgânicos e já foi demonstrado em certas espécies de BRS como *Desulfovibrio*, nas arqueias metanogênicas e também em bactérias acetogênicas (GU et al., 2019).

### **3.4 Controle e monitoramento da biocorrosão na indústria petrolífera**

Um dos conceitos adotados para a manutenção dos sistemas industriais livres dos efeitos da biocorrosão consiste em “manter o sistema limpo”. Entretanto, a aplicação deste conceito só pode ser considerada com uma adequada compreensão dos processos envolvidos na biocorrosão. Muitas vezes, os eventos só são detectados quando uma forte contaminação está presente, acarretando em perda de energia, perda de eficiência do sistema; falhas estruturais decorrentes da corrosão dos materiais presentes nas instalações e diminuição do valor comercial do conteúdo transportado pela formação do *souring*) (VIDELA, 2002; VIDELA, 2003).

Na prevenção e controle da biocorrosão em instalações industriais, é primordial um adequado acompanhamento das condições de operações dos sistemas que podem ser acometidos por estes eventos, considerando principalmente as variáveis de origem biológica e inorgânica que participam dos processos corrosivos. A aplicação de métodos que permitam detectar a contaminação microbiana nos sistemas industriais em tempo hábil para aplicar as medidas corretivas necessárias pode favorecer a prevenção de eventos indesejados na rotina de operações (VIDELA, 2003).

### 3.4.1 Detecção de microrganismos em sistemas petrolíferos

Devido à sua íntima associação com eventos de biocorrosão em sistemas industriais, a presença das BRS e de seus respectivos metabólitos são alvos de monitoramento amplamente utilizados na rotina de controle destes sistemas.

As análises microbiológicas utilizadas no monitoramento de sistemas petrolíferos geralmente são aplicadas em duas etapas sequenciais: 1º) uma avaliação preliminar para detecção de microrganismos gerais; e 2º) detecção de microrganismos específicos, para confirmação junto ao tipo de corrosão observada.

As análises de contagem seguem alguns padrões já confirmados pelo histórico de atividades descrito na literatura para este gênero. Uma contagem preliminar em meio geral nas amostras coletadas de resíduos de dutos e tanques pode ser executada, utilizando-se, por exemplo, meios para promoção de crescimento de microrganismos ou meios que simulem condições ambientais. (CORTÁS; CARREIRA; COSTA, 2012; RODRIGUES et al., 2013; JAVED et al., 2014)

Dada a necessidade de ambiente anaeróbico para a quantificação de espécies BRS, a aplicação da técnica do Número Mais Provável (NMP) em frascos com meios preparados para obtenção de anaerobiose se tornou o principal método de monitoramento de contaminação microbiana na indústria petrolífera (ARAÚJO et al., 2013; COUTINHO et al., 2014)

### 3.4.2 Detecção e quantificação por NMP

A técnica de diluição denominada “Número Mais Provável” foi reportada pela primeira vez em 1915 por McCrady, e consiste em estimar a densidade da população de microrganismos viáveis em uma amostra, com base na aplicação de tabelas de fatores numéricos, aplicados conforme a probabilidade de os microrganismos estarem distribuídos de maneira homogênea quando inoculados no meio de cultura.(COCHRAN, 1950)

A técnica do NMP é descrita resumidamente nas seguintes etapas (CORTÁS, 2011) :

- (1) são preparadas diluições seriadas da amostra a ser avaliada em solução de trabalho;
- (2) é feita a retirada de alíquotas de cada diluição preparada, para incubação em frascos com meio de cultura, para obter uma possível estimativa em uma ampla faixa de concentrações;
- (3) o crescimento obtido é avaliado, a partir do resultado positivo para produtos de reação nos frascos incubados, e;
- (4) os valores de estimativa por NMP são obtidos pelo tratamento e interpretação dos resultados obtidos.

Por se tratar de uma técnica de contagem indireta, é necessário diluir sucessivamente a amostra no meio de cultura antes de seguir com a incubação pelo período necessário. A diluição da amostra realizada para a quantificação pelo NMP tem como objetivo atingir a maior ordem de diluição na qual não se observe qualquer detecção de qualquer microrganismo nos frascos utilizados. Os frascos que não exibirem crescimento presumivelmente não receberam nenhum microrganismo que poderia se desenvolver no meio de cultura.

O cálculo do NMP é realizado a partir do número de frascos utilizados em cada diluição (réplicas) que tenham resultado positivo para crescimento do microrganismo alvo da detecção pretendida, e o tratamento dos resultados é realizado a partir da combinação de resultados positivos e negativos com uso de tabelas de Número Mais Provável de microrganismos viáveis presentes na amostra (HARRIGAN, 1998; CORTÁS, 2011).

### 3.4.3 Fundamentos estatísticos da técnica do NMP

O cálculo do NMP assume que as bactérias estarão distribuídas em uma diluição seguindo uma distribuição normal de Poisson. Na teoria da probabilidade e

na estatística, este tipo de distribuição expressa a probabilidade de um número de eventos ocorrerem num dado período de tempo, caso estes ocorram com uma taxa média conhecida e cada evento aconteça de maneira independente do tempo decorrido desde o último evento (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

Esta distribuição apresenta um intervalo de 95% dos dados estabelecidos de uma amostra a partir da aplicação do desvio padrão, e é considerado como o intervalo de confiança para a quantificação pelo NMP (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

O cálculo do NMP de uma amostra é realizado a partir de tabelas de tratamento obtidas por meio de fórmulas que consideram a probabilidade do crescimento dos microrganismos nas séries de diluições decimais consecutivas em réplicas. Uma das tabelas mais utilizadas para metodologias de NMP é a proposta por HARRIGAN (1998), com o uso de três frascos como réplicas dentro da diluição, como apresentado na Figura 02.

**Figura 02** - apresentação da tabela de determinação do NMP para 3 frascos.

<b>Tabela para Determinação de NMP</b>				
Números de Frascos Positivos Observados em Cada Diluição			NMP de BRS por mL da Primeira Diluição	Categoria de incerteza
1°	2°	3°		
0	0	0	0	-
0	0	1	0,3	3
0	1	0	0,3	2
0	1	1	0,6	4
0	2	0	0,6	4
1	0	0	0,4	1
1	0	1	0,7	3
1	0	2	1,1	4
1	1	0	0,7	2
1	1	1	1,1	4
1	2	0	1,1	3
1	2	1	1,5	4
1	3	0	1,6	4
2	0	0	0,9	1
2	0	1	1,4	3
2	0	2	2	4
2	1	0	1,5	2
2	1	1	2	4
2	1	2	3	4
2	2	0	2	3
2	2	1	3	4
2	2	2	3,5	4
2	2	3	4	4
2	3	0	3	4
2	3	1	3,5	4
2	3	2	4	4
3	0	0	2,5	1
3	0	1	4	2
3	0	2	6,5	4
3	1	0	4,5	1
3	1	1	7,5	2
3	1	2	11,5	3
3	1	3	16	4
3	2	0	9,5	1
3	2	1	15	2
3	2	2	20	3
3	2	3	30	4
3	3	0	25	1
3	3	1	45	1
3	3	2	110	1
3	3	3	140	-

Fonte: HARRIGAN (1998).

O resultado obtido de NMP é expresso a partir da combinação de frascos com crescimento positivo observado nas diluições, que permitem selecionar o fator de NMP/mL para multiplicação pela primeira diluição da série selecionada na leitura da combinação de frascos (HARRIGAN, 1998).

#### 3.4.4 Considerações gerais sobre a técnica do NMP

Segundo QUEIROZ (2015), a técnica do NMP considera alguns aspectos importantes a respeito da condição das amostras para sua quantificação:

- (a) a distribuição da população microbiana deve ocorrer de maneira aleatória no conteúdo das amostras utilizadas para a análise;
- (b) os microrganismos presentes na amostra se encontram isolados, e sua distribuição no conteúdo da amostra não favorece eventos de repulsão entre eles;
- (c) o crescimento de apenas um microrganismo viável pode ser detectado no meio de cultura utilizado, sob as condições utilizadas para incubação. Tal detecção pode ocorrer como reação com os produtos metabólicos do microrganismo, e podem ser, por exemplo: a geração de bolhas; mudança de cor ou formação de precipitados no meio de cultura;
- (d) cada frasco da amostra se comporta de maneira independente quanto ao resultado de detecção; logo, os frascos são considerados isoladamente para o resultado do NMP.

A técnica do NMP é apontada como vantajosa quando aplicada em ensaios onde a cinética de crescimento do microrganismo é altamente variável, ou quando a amostra analisada apresenta microrganismos que não são desejáveis para detecção, assim a incubação em frascos é utilizada como um método seletivo para aproveitar um produto detectável do microrganismo de interesse (QUEIROZ, 2015).

Nos casos em que as contagens em meio sólido tenham a confiabilidade de seus resultados prejudicada devido à interação com algum componente do meio de



cultura, a técnica do NMP em frascos pode ser uma alternativa para contornar tal questão (QUEIROZ, 2015).

A principal limitação da técnica do NMP se deve ao fato de não determinar precisamente o número de organismos em um ambiente natural, de maneira que a incerteza nos resultados obtidos pode chegar a 68%. A representatividade de bactérias viáveis do resultado obtido pelo NMP para as amostras analisadas pode ocorrer em proporção menor do que 1 % do total das linhagens efetivamente presentes na amostra ambiental (OLIVEIRA et al., 2008; KOTU; MANNAN; JAYARAMAN, 2019)

Outra limitação consiste na possibilidade de obtenção de resultados controversos detectados, obtendo-se combinações não esperadas de tubos com resultado positivo. Este evento geralmente é atribuído a erro laboratorial durante processamento das amostras, ou mesmo à qualidade da amostra entregue para processamento (com presença de interferentes, por exemplo) (QUEIROZ, 2015).

#### 3.4.5 NMP aplicado à quantificação de BRS

Uma vez que consegue garantir um ambiente anaeróbio em ambiente de frascos para o cultivo laboratorial, a aplicação da técnica do NMP se tornou a principal ferramenta para monitoramento da contaminação microbiana na indústria petrolífera, com aplicação para amostras de água de injeção, água produzida, resíduos de corrosão, entre outras amostras. Tradicionalmente, a quantificação por NMP das BRS é conduzida pelo período de até 28 dias, devido à necessidade de adaptação das bactérias ao meio padrão utilizado para a resposta de detecção das BRS (ARAÚJO et al., 2013; COUTINHO et al., 2014).

O principal meio de cultura utilizado para detecção de espécies BRS é o proposto por POSTGATE (1984), que utiliza a reação de precipitação do sulfeto ferroso (FeS), composto que serve como evidência da redução do sulfato presente no meio de cultura após utilização pelas BRS.

### 3.5 Cultivo e detecção de BRS em microescala

A lenta resposta da quantificação de microrganismos anaeróbios pelo NMP é um fator a ser considerado na rotina de controle e monitoramento de eventos de corrosão, uma vez que muitas vezes é necessária tomada de decisão ágil quanto ao protocolo de intervenção a ser adotado nos sistemas. A partir desta perspectiva, detecções que possam ser efetuadas de forma mais eficiente para as BRS são consideradas para desenvolvimento de novas metodologias.

Uma vez que a incubação das amostras analisadas requer consumo significativo de materiais e reagentes utilizados no preparo dos frascos necessários à série de diluições para quantificação por NMP por amostra, mais o espaço físico necessário para a incubação das séries de frascos preparados para as análises, metodologias alternativas para quantificação de BRS são de grande interesse para a indústria petrolífera.

Diversas técnicas já foram consideradas para quantificar espécies BRS em amostras coletadas da indústria petrolífera, tais como ensaios baseados em reações imunoenzimáticas; pelo consumo de ATP; por marcação com radioisótopos, e com uso de sequenciamento para identificação de espécies (LIMA, 2016; KOTU; MANNAN; JAYARAMAN, 2019).

Analisando as opções disponíveis, a adoção dos métodos dependentes de cultivo para avaliações de atividade biocida de produtos ainda é a primeira opção de trabalho na rotina operacional de controle e monitoramento de corrosão, já que servem para determinar como diferentes produtos se comportam em relação ao seu potencial como biocida, sendo possível avaliar diversas concentrações e tempos de contato com microrganismos, a fim de estabelecer o melhor regime de aplicação dos produtos nos sistemas (BENNET; HOFFMANN, 2018).

No caso dos métodos dependentes de cultivo para quantificação por NMP, já foi proposta metodologia com enfoque nas espécies BRS que aplica a miniaturização de escala na incubação, sendo utilizada em atividades de amostragem ambiental, e

também para verificar a eficácia na recuperação de microrganismos em amostras da indústria de Óleo e Gás (LIMA, 2006; NEUMANN, 2012).

Em outra linha de ação, avaliações já foram conduzidas em microescala para determinar a cinética de crescimento de BRS de amostras clínicas e ambientais, com o objetivo de comparar os perfis de crescimento entre as condições aeróbia e anaeróbia aplicadas a estes microrganismos (HEGGENDORN et al., 2018).

No que se refere à avaliação de tratamentos para controle de biocorrosão, há pelo menos um relato de uso desta metodologia para monitorar populações microbianas em amostras de água produzida sujeitas ao tratamento com nitrato (SEGUI, 2009).

Os trabalhos apresentados anteriormente são exemplos de que a proposta de ensaio em microescala pode ser utilizada no setor de óleo e gás, portanto corroboram o direcionamento do planejamento experimental do projeto para uso como método para recuperação de espécies viáveis após tratamento com biocidas.

### **3.6 Biocidas**

O método químico mais utilizado para o controle da biocorrosão em sistemas industriais consiste na aplicação de biocidas, que são produtos utilizados para eliminar ou inibir a atividade de microrganismos considerados nocivos a estes sistemas. Nas últimas décadas, compostos de diferentes classes químicas foram utilizados como inibidores químicos ou mesmo biocidas para alcançar a redução da contaminação nos sistemas petrolíferos (DAVIDOVA et al., 2001; WILLIAMS, 2006; JONES et al., 2012; WESSELS; INGMER, 2013; KRAMER, 2015; KAHRILAS et al., 2015; OKORO, 2015; CARLSON et al., 2015; JESUS et al., 2015).

Os biocidas agem por diversos mecanismos para promover sua ação antimicrobiana. De maneira geral, podem modificar a permeabilidade celular; alterar processos vitais relacionados à sua reprodução ou reagir diretamente com enzimas microbianas, interferindo no metabolismo de maneira a ocasionar a sua morte (ARAÚJO et al., 2013; KAHRILAS et al., 2015).

Os biocidas são tradicionalmente classificados em dois grandes grupos: os biocidas oxidantes e os biocidas não-oxidantes. Os biocidas oxidantes são compostos químicos altamente reativos, e atuam principalmente por meio da oxidação de biomoléculas, com a liberação de espécies radicais livres que atacam componentes celulares, o que leva à morte dos microrganismos sujeitos ao contato com estas espécies químicas, e por consequência resulta em uma atuação significativa e inespecífica contra um diverso grupo de bactérias (BARTLETT; KRAMER, 2011; KAHRILAS et al., 2015; OKORO, 2015; BENNET; HOFFMANN, 2018).

Os biocidas não-oxidantes constituem-se em compostos orgânicos que funcionam por meio de mecanismos mais específicos do que os biocidas oxidantes, tais como a formação de ligações covalentes com grupos químicos nucleofílicos presentes nas moléculas, ou mesmo por desestabilização da membrana plasmática. São menos agressivos, e por essa razão eles conseguem persistir por mais tempo no ambiente e penetrar nas camadas mais profundas de biofilmes. Podem ser classificados em categorias de acordo com seu mecanismo de ação: biocidas de lise; biocidas eletrofílicos; e preservantes (KAHRILAS et al., 2015).

Os biocidas de lise são moléculas surfactantes que atuam na desestabilização da dupla camada fosfolipídica da parede celular, por meio da ligação com grupos funcionais aniônicos localizados na superfície da membrana e subsequente perturbação da dupla camada, o que resulta na perda da regulação osmótica e integridade celular, com a eventual lise celular e respectiva morte (KAHRILAS et al., 2015).

Os biocidas eletrofílicos são compostos que possuem grupos funcionais com alta afinidade para interação com elétrons de grupos químicos expostos nas proteínas de membrana da parede celular bacteriana (p. ex., aldeídos frente aos grupos tióis e aminas secundárias). Estes biocidas atuam principalmente por meio da formação de ligações covalentes com grupos funcionais nucleofílicos encontrados em várias biomoléculas, tais como aminas primárias (-NH<sub>2</sub>), sulfidrilas (-SH), pontes dissulfeto (-S-S-) e ligações duplas em lipídios insaturados (-CH=CH-) (KAHRILAS et al., 2015).

### 3.7 Aplicação de biocidas na Indústria Petrolífera.

A aplicação de biocidas solúveis em fluidos aquosos para o controle da proliferação e da atividade de microrganismos nocivos é um tratamento químico amplamente empregado no tratamento de água para fins sanitários e industriais. Na indústria petrolífera, o uso de biocidas consiste em um tratamento convencional para mitigar o desenvolvimento de espécies microbianas no interior das instalações dos sistemas (*biofouling*), de maneira a diminuir a probabilidade de ocorrência de eventos de biocorrosão.

Uma vez que os microrganismos se encontram presentes de maneira planctônica e também sésil nos fluidos e superfícies dos sistemas utilizados na indústria petrolífera, os biocidas são aplicados frequentemente em conjunto com métodos físicos de limpeza, sendo o mais comum deles a passagem de dispositivos planejados para passagem e remoção de resíduos no interior de dutos (comumente denominados como “pigs”), com a possibilidade de coleta de material do interior dos dutos para posterior análise e assim otimizar a operação de monitoramento e controle de corrosão (COTE et al., 2014; CRISTIANI; PERBONI, 2014).

A escolha do biocida apropriado a ser utilizado depende da natureza dos microrganismos a serem eliminados, bem como das condições de operação atribuídas ao sistema afetado. Não é incomum que se aplique mais de um biocida num mesmo sistema, e a necessidade disso se deve principalmente a três fatores: (1) as grandes diferenças na composição química entre os fluidos que precisam ser protegidos; (2) as grandes diferenças nas condições ambientais entre os locais em que circulam os fluidos que precisam ser protegidos; e (3) a grande extensão espacial dos sistemas que precisam ser protegidos (KRAMER, 2015).

Outro fator também a ser considerado é a pouca efetividade de determinados tipos de biocidas frente a espécies anaeróbias que se encontram estabelecidas sob os biofilmes, devido à necessidade de penetração das espécies reativas pelas camadas de EPS, o que aumenta a chance de inativação destas espécies pelos componentes do biofilme (VIDELA, 2003; CRISTIANI; PERBONI, 2014)

Desta maneira, o consenso estabelecido sobre o uso dos biocidas consiste nas seguintes considerações:

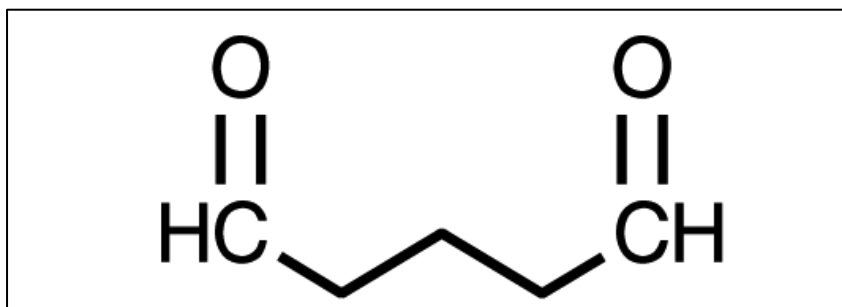
- (a) Os biocidas oxidantes são mais apropriados para a proteção dos fluidos aeróbios e com baixo teor de matéria orgânica, que circulam em locais com condições ambientais mais amenas;
- (b) Os biocidas não-oxidantes são mais apropriados para a proteção dos fluidos anaeróbios e com teor mais elevado de matéria orgânica, e que circulam em locais com condições ambientais mais severas;

Dadas as características anteriormente mencionadas, os biocidas não-oxidantes se apresentam como as opções de uso mais adequadas para tratamento da biocorrosão, com o objetivo de penetrar as camadas de biofilmes e agir sobre as espécies presentes na interface dos biofilmes com a superfície metálica.

Dentre os biocidas não oxidantes mais utilizados na indústria petrolífera, destacam-se o glutaraldeído, o sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) e as isotiazolonas, os quais estão compreendidos no escopo deste trabalho e serão abordados nos próximos tópicos.

### 3.7.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído é um produto líquido da classe dos aldeídos de aspecto incolor. Sua estrutura consiste em uma molécula de 5 átomos de carbono com 2 grupos aldeídos funcionais, conforme apresentado na figura 03.

**Figura 03** - Formula estrutural do glutaraldeído.

Fonte: KAHRILAS et al (2015).

O glutaraldeído é um biocida do tipo eletrofilico, capaz de reagir com grupos nucleofílicos presentes nas moléculas dos componentes estruturais e funcionais de microrganismos, tais como tióis (-SH), aminas primárias e secundárias e hidroxilas (-OH). Esta reação ocorre com a formação de ligações cruzadas dos grupos aldeído do biocida com as moléculas dos microrganismos alterando sua estrutura terciária funcional, o que acarreta em alterações no metabolismo e na permeabilidade celular, com inibição de funções da membrana bacteriana exterior, tais como transporte de nutrientes e liberação de resíduos metabólicos, e por consequência a morte do microrganismo (WEN et al., 2009; WEN et al., 2010; KAHRILAS et al., 2015; ROGERS et al., 2017; AKYON; LIPUS; BIBBY, 2019).

O efeito biocida do glutaraldeído consiste na sua reatividade com os grupos nucleofílicos, a qual é favorecida em ambientes onde o valor de pH esteja no intervalo de 7,5 a 8,4, que consiste no valor natural encontrado para a água do mar. Nesta faixa de pH, os grupos aminas primários e secundários das moléculas não estão protonados, o que favorece a sua reação com os grupos aldeídos do glutaraldeído de maneira irreversível (WEN et al., 2009; WEN et al., 2010; KAHRILAS et al., 2015; ROGERS et al., 2017).

O glutaraldeído está presente como ingrediente ativo de uma grande variedade de biocidas comerciais utilizados frente a diversos microrganismos, com ação estabelecida em amplos intervalos de pH e temperatura. É utilizado como biocida no

tratamento de água produzida, água industrial, fluidos de perfuração, fluidos de completção e fluidos de injeção (KAHRILAS et al., 2016; ROGERS et al., 2017).

O glutaraldeído reage com sulfeto ( $H_2S$ ,  $HS^-$ ), amônia e sequestrantes de oxigênio, tais como o íon bissulfito ( $HSO_3^-$ ). É comum combinar a aplicação do glutaraldeído com biocidas líticos, a depender da finalidade do uso. O glutaraldeído apresenta a propriedade de se auto-polimerizar em determinadas condições de pH e salinidade, comportamento este que não altera a sua atividade biocida. A sua faixa de concentração reportada com início da atividade inibitória se encontra entre 5 e 200 mg/L (VIKRAM; LIPUS; BIBBY, 2014; ROGERS et al., 2017; AKYON; LIPUS; BIBBY, 2019).

A dosagem de glutaraldeído aplicado principalmente na água de injeção é de 50 a 2500 mg/L do composto ativo em regime de batelada, por 4 a 6 horas. Quando em ambientes com alto valor de pH ( $> 8,0$ ), a dose pode ser diminuída para 25 a 500 mg/L (ROGERS et al., 2017).

Estudos reportaram que algumas espécies microbianas presentes em biofilmes passaram a apresentar resistência ao tratamento realizado com glutaraldeído, e atribuem este comportamento a possíveis fatores genéticos que permitiriam ativar mecanismos de resistência que reduziriam a penetração deste composto no interior da célula, e também diminuiriam o poder de ligação do glutaraldeído com as proteínas celulares (VIKRAM; LIPUS; BIBBY, 2014).

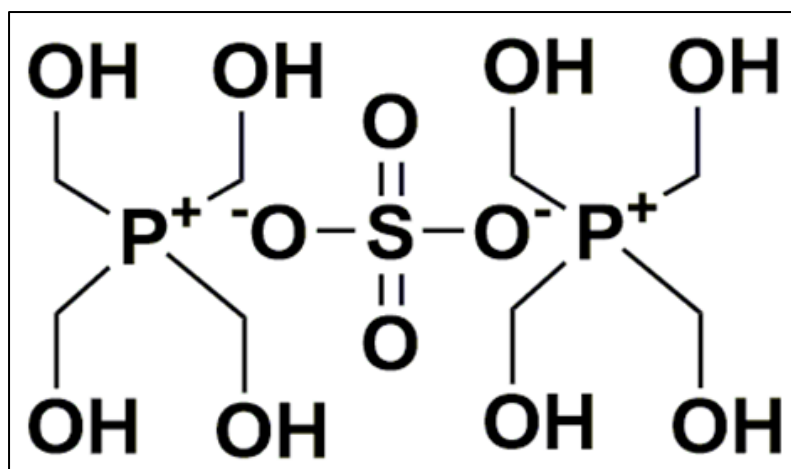
Foi reportado também que o uso do glutaraldeído como agente para inibição de microrganismos em líquido de fraturamento não diminuiu a abundância de espécies presentes neste tipo de líquido, como também não alterou a estrutura da comunidade microbiana, o que sugere principalmente a modificação na atividade microbiana como efeito decorrente da aplicação deste biocida (AKYON; LIPUS; BIBBY, 2019).

### 3.7.2 THPS



O produto sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) é um composto fosfônio quaternário, cuja molécula é descrita como:  $[P(CH_2OH)_4]_2SO_4$  e se encontra apresentada na Figura 04. Em seu estado físico original, é um sólido levemente pastoso solúvel em água, o que permite o pronto uso em sistemas de injeção como produto biocida (EL-SHERIK, 2017).

**Figura 04** - Fórmula estrutural do THPS.



Fonte: XU et al. (2022).

O THPS atualmente é o biocida mais utilizado na indústria petrolífera, e atua principalmente através da clivagem das ligações dissulfeto presentes nos aminoácidos da parede celular bacteriana e das demais proteínas celulares. Adicionalmente, a perda de grupos tióis devido à ação de clivagem do THPS leva à desestabilização do conteúdo celular do microrganismo (JONES et al., 2012).

Sua velocidade de ação é rápida e bem significativa contra uma gama de microrganismos, inclusive fungos. Em meio alcalino, a sua atuação é incrementada pela formação de seu derivado trishidroxifosfina (THP), obtido após reação de deformilação (WEN et al., 2010; KAHRILAS et al., 2015).

O THPS é considerado um biocida bastante versátil, com aplicação desde a tanques de armazenamento de água de injeção, bem como sistemas multifásicos e

duto de transporte. Pode ser usado também como tratamento da água usada para testes hidrostáticos e de hibernação de dutos (VIDELA, 2003).

O uso do THPS como biocida oferece uma série de vantagens aos sistemas. Ao mesmo tempo que apresenta amplo espectro biocida, merece destaque a sua especificidade frente às BRS, conforme estudos realizados (LAVANIA et al., 2011; STRUCHTEMEYER; MORRISON; ELSHAHED, 2012).

O THPS apresenta a capacidade de dissolver e sequestrar o sulfeto de ferro formado em sítios de corrosão, diminuindo assim o “*souring*” do conteúdo transportado pelos sistemas (JONES et al., 2011).

Em estudos de estabilidade química e compatibilidade com demais tratamentos, o THPS apresentou boa estabilidade por longo tempo de hibernação em sistemas, com a possibilidade de sua inativação sob condições controladas (WILLMON, 2010; WENTWORTH; SRIVASTAVA; KRAMER, 2016; SHARMA et al., 2018).

O THPS também apresentou baixo perfil de toxicidade e rápida biodegradabilidade em avaliações para esta finalidade (DOWNWARD; HAACK, 1997).

As concentrações de aplicação do THPS na indústria petrolífera variam conforme a etapa de monitoramento do sistema. O THPS mostrou ação em tratamentos nas concentrações fixas de 25, 50 e 100 mg/L, com redução da população de BRS na ordem de oito dígitos em escala logarítmica em até 4h (STRUCHTEMEYER; MORRISON; ELSHAHED, 2012; XU et al., 2022)

O THPS apresenta algumas questões relacionadas à sensibilidade frente a variações de pH e reatividade com agentes oxidantes e ao íon sulfito. A temperatura também influencia a degradação da molécula, da mesma maneira que os biocidas que apresentam compostos de aldeído em sua formulação, porém já foi verificado que o THPS se mantém estável mesmo a temperaturas superiores a 120°C (ZHAO et al., 2008; MOORE; KEASLER; BENNETT, 2010).

O THPS pode ser combinado com outros biocidas não-oxidantes para obtenção de efeitos sinérgicos ou mesmo interações complementares consideradas vantajosas para o controle microbiano em sistemas. Foi demonstrado que doses semanais de glutaraldeído e THPS apresentaram sucesso no controle de eventos severos de corrosão induzida por microrganismos (ARAÚJO et al., 2013; ENNING et al., 2016; OKORO; SAMUEL; LIN, 2016).

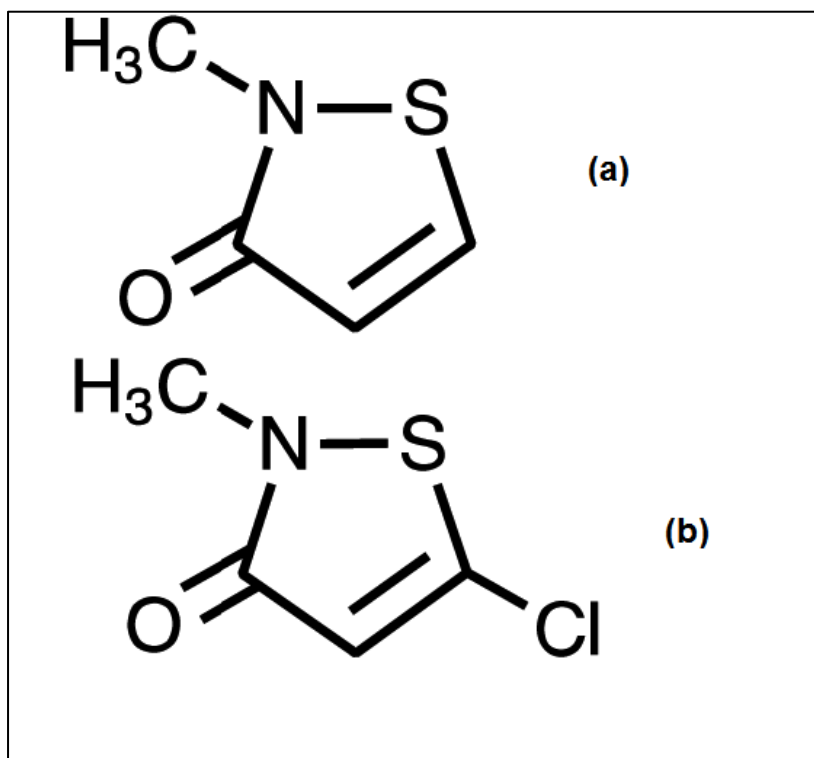
Os estudos para a potencialização do efeito biocida do THPS na atualidade consideram sua aplicação como biocida em conjunto com D-aminoácidos e também agentes dispersantes como o polímero de xantana e peptídeos para obtenção de tratamentos com menores doses aplicadas deste biocida. Existe vasta literatura produzida sobre esta perspectiva de aplicação, justificada pela necessidade de obtenção de tratamentos mais sustentáveis junto ao setor de Óleo e Gás (XU et al., 2012; XU; LI; GU, 2012; XU; LI; GU, 2014; LI et al., 2016; JIA et al., 2017; JIA et al., 2017; XU et al., 2019; SILVA et al., 2021; WANG et al., 2022).

Agentes quelantes também foram considerados como adjuvantes satisfatórios para promover a ação do THPS, com trabalhos relatando a inibição da formação de biofilmes quando aplicados em combinação (JIA et al., 2019).

### 3.7.3 Isotiazolonas

Os biocidas conhecidos como isotiazolonas são compostos orgânicos heterocíclicos que apresentam uma ligação nitrogênio-enxofre em sua estrutura. Estes produtos são derivados do composto original 4-isotiazolin-3-ona. A Figura 05 apresenta os principais compostos derivados e considerados para uso como biocidas do setor de óleo e gás.

**Figura 05** - Fórmulas estruturais da Metilisotiazolona (a) e Clorometilisotiazolona (b).



Fonte: KAHRILAS et al, 2015.

As isotiazolonas contêm em sua formulação grupos cloro, metil e água associada. A presença do grupo cloro torna a ligação nitrogênio-enxofre mais reativa, e este fator contribui para aumentar a atividade antimicrobiana da molécula. As isotiazolonas agem por interação com os grupos tióis presentes nos componentes celulares, interferindo nas reações enzimáticas de processos vitais aos microrganismos, tais como o ciclo de Krebs (WILLIAMS, 2006).

O uso de isotiazolonas como biocidas no setor de óleo e gás é bastante restrito devido à sua extrema sensibilidade ao  $H_2S$ , o que inviabiliza principalmente o tratamento de sistemas de alimentação de águas de produção. Seu uso acaba sendo mais direcionado como preservante do conteúdo extraído de poços e em dutos, devido ao seu valor de coeficiente de partição. Além da sensibilidade ao  $H_2S$ , O CMIT/MIT não apresenta compatibilidade com grupos amina, tiol ou mercaptano, e sua estabilidade térmica somente está presente até a temperatura de  $55^{\circ}C$  (WILLIAMS, 2007).

Dos compostos apresentados, a combinação CMIT/MIT é a mais popular com aplicação biocida e também para eliminação do conteúdo de sulfato da água do mar em unidades dedicadas. Esta combinação obedece a razão de 3 partes para uma (CMIT:MIT), com ambas as moléculas apresentando comportamento eletrofílico. A molécula de 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMIT) possui um átomo de cloro como ligante na posição 5 do anel, fator este que torna a molécula altamente reativa (WILLIAMS, 2007).

A maioria das formulações comerciais do composto CMIT/MIT se apresentam com valor de 14% em solução, com pH ácido e aspecto visual translúcido a límpido. O tratamento com esta combinação apresenta a vantagem de, em estágio mais tardio, permitir a formação de radicais livres que contribuem para um aumento gradual na eliminação de microrganismos no ambiente. Este fator permite que sejam utilizadas baixas doses aplicadas da formulação (faixa de 5 a 25 mg/L) (WILLIAMS; SCHULTZ, 2011).

### **3.8 Ensaio para avaliação de biocidas.**

Um biocida somente pode ser considerado como eficaz de acordo com as características dos sistemas que se pretendem tratar, nos quais devem ser avaliados, de acordo com os seguintes critérios descritos por ARAÚJO et al. (2013):

- (a) os materiais constituintes da estrutura física do sistema;
- (b) as condições de operação, tais como regime de fluxo, temperatura, alimentação com água de produção, dentre outros;
- (c) microrganismos alvo que o biocida atuará, e;
- (d) concentração e tempo de contato pretendidos para aplicação do biocida selecionado.

A literatura relata diversas abordagens para a condução de ensaios de avaliação de atividade de biocidas, com a adoção de metodologias tradicionais como

a determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de substâncias frente a linhagens de BRS, com a aplicação dos produtos diretamente no meio de cultura líquido inoculado com microrganismos, e também por testes de formação de halo de inibição em ágar semeado (NAKAO et al., 2009; BADAWI et al., 2010; ZAKY; NEGM, 2012).

Abordagens mais específicas foram conduzidas no sentido de avaliar o uso de substâncias que tornem os biocidas mais efetivos, ou que diminuam a dosagem necessária nas suas aplicações, tais como agentes quelantes ou D-aminoácidos (WEN et al., 2009; WEN et al., 2010; LI et al., 2016; JIA et al., 2017; JIA et al., 2017).

Ensaio que simulem condições praticadas nos sistemas industriais para transporte de fluidos que necessitam de tratamento químico para estimar a eficácia dos protocolos de tratamento também podem ser considerados para avaliação, a fim de determinar qual o composto será mais adequado, e qual será sua dose ótima para aplicação no sistema (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS, 2016).

Considerada a questão quanto às condições necessárias para a técnica de BRS pelo NMP e a perspectiva de aplicação de ensaios tradicionais de avaliação de biocidas frente a estas espécies, a proposta de miniaturização de escala para avaliações de recuperação de bactérias viáveis após aplicação de biocidas se torna atraente, devido ao fato de reduzir significativamente o volume de material e meios de cultura a serem utilizados em caso de avaliações de concentração inibitória mínima que utilizem várias concentrações.

Contudo, no conjunto da literatura pesquisada, um número bem restrito dos artigos encontrados utilizou condições de microescala para avaliar a atividade biocida de produtos para uso na indústria petrolífera, e em cada ocasião, a avaliação focou em aspectos particulares a respeito de prospecção de novos compostos, bem como de estratégias específicas para operação dos métodos propostos.

ASTUTI, PURWASENA e PUTRI (2018) avaliaram o potencial de oito substâncias surfactantes como possíveis biocidas para aplicação no ambiente petrolífero, com objetivo de eliminar biofilmes associados aos processos de biocorrosão. Na avaliação conduzida, a técnica adotada foi a exposição dos surfactantes aos microrganismos diretamente em microplaca, para determinação de

3 tipos de concentrações, como descrito pelos autores: a inibitória mínima (“MIC - Minimum Inhibitory Concentration”), a inibitória mínima para formação de biofilme (“MBIC - Minimum Biofilm Inhibitory Concentration”) e a mínima para eliminação de biofilmes formados (“MBEC - Minimum Biofilm Eradication Concentration”). Este tipo de avaliação necessitou que o contato das substâncias surfactantes com os microrganismos ocorresse na própria microplaca, com a finalidade de obtenção dos resultados pretendidos de inibição.

BAUTISTA et al. (2016) avaliaram a eficácia na inibição de microrganismos presentes em amostras de diesel submetidas a tratamento com diferentes biocidas e armazenadas por até 45 dias em tubos de 2 mL. Para quantificar as espécies viáveis nos momentos selecionados para a amostragem, foi utilizada a quantificação do NMP em microplacas, com o uso de 8 réplicas para cada uma das diluições da série do NMP, o que equivaleu a manter cada coluna da microplaca dedicada para uma diluição.

Tal proposta de quantificação encontra respaldo nos trabalhos com espécies BRS em microescala já apresentados neste texto, nos quais o objetivo foi implantar a metodologia de quantificação com base no uso de várias réplicas por diluição da série NMP executada, a fim de garantir a reprodutibilidade dos procedimentos como também validar estatisticamente a metodologia (LIMA, 2006; SEGUI, 2009; NEUMANN, 2012).

O uso de incubação em microescala também foi utilizado em ensaios de avaliação de eficácia para biocidas a curto e longo prazo em amostras obtidas de ambientes de operação de fraturamento, com o objetivo de avaliar a recuperação de espécies BRS viáveis recuperadas após tratamento com biocidas (RAYMOND; PARNELL; FICHTER, 2014).

Portanto, a adoção de um planejamento experimental comparativo entre a técnica de NMP em frascos e a técnica de NMP em microescala com uso de microplacas de 96 poços para avaliar a eficácia de produtos biocidas frente a 2 espécies de BRS se apresenta como abordagem de potencial relevância para aplicação na rotina de monitoramento e controle de contaminação nos sistemas petrolíferos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e reagentes utilizados

#### 4.1.1 Linhagens.

Foram utilizadas as seguintes linhagens de referência:

- (a) *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998, Bactéria BRS de cultivo termófilo (55°C), depositada no Laboratório de Biotecnologia Industrial como IPT 1007;
- (b) *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, Bactéria BRS de cultivo mesófilo (25°C a 30°C), depositada no Laboratório de Biotecnologia Industrial como IPT 1039.

As linhagens foram reativadas e mantidas em cultivo com repiques periódicos e sucessivos nos meios de cultura, para manutenção de sua viabilidade durante o decorrer dos ensaios.

#### 4.1.2 Meios de cultura.

Os meios de cultura inicialmente selecionados para as atividades estão relacionados nas tabelas 01, 02, 03, 04 e 05 com suas respectivas composições, de acordo com as informações obtidas para reativação das linhagens junto aos documentos disponíveis em coleções oficiais de microrganismos e também no levantamento realizado em literatura.



**Tabela 01** - composição do meio Postgate E modificado.

<b>Meio Postgate E modificado</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,5 g
Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	1,0 g
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> S)	1,0 g
Cloreto de cálcio diidratado (CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O)	0,7 g
Cloreto de magnésio heptahidratado (MgCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O)	2,0 g
Lactato de sódio 50% (m/v)	7,0 mL
Extrato de levedura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0 g
Solução de resazurina 0,025% (m/v)	4,0 mL
Agar	1,9 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL
pH = 7,6 ± 0,2	

Fontes: Postgate (1984); Associação Brasileira de Normas técnicas (2016).

**Tabela 02** - composição do meio "ATCC 42 - *Desulfovibrio* Medium".

<b>Meio "ATCC 42 - <i>Desulfovibrio</i> Medium"</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Extrato de levedura	0,2 g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	1,5 g
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1,5 g
Sulfato ferroso amoniacal – Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )	0,1 g
Glicose	5,0 g
Agar	1,9 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL
pH = 7,0 ± 0,2	

Fonte: American Type Culture Collection (ATCC), sítio eletrônico acessado em: 08/09/2022.

**Tabela 03** - composição do meio "DA".

<b>Meio "DA"</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Polipeptona	15,0 g
Peptona	7,5 g
Extrato de carne	7,5 g
Extrato de levedura	7,5 g
Citrato férrico amoniacal	0,75 g
Cloridrato de L-cisteína monohidratado	0,75 g
Agar	1,9 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL
pH = 7,0 ± 0,2	

Fonte: Nakao et al (2009).

**Tabela 04** - composição do meio "DA" Modificado.

<b>Meio "DA" modificado</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Triptona	10,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Extrato de levedura	6,0 g
Glicose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Cloridrato de L-cisteína monohidratado	0,3 g
Amido solúvel	5,0 g
Metabissulfito de sódio	1,0 g
Agar	1,9 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL
pH = 7,6 ± 0,2	

Fonte: adaptado de Nakao et al (2009).

**Tabela 05** - composição do meio “BAAR” Modificado.

<b>Meio “BAAR” modificado</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	10,0 g
Citrato de sódio	3,0 g
Sulfato de cálcio diidratado (CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	6,0 g
Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	2,0 g
Fosfato dibásico de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5,0 g
Extrato de levedura	0,3 g
Lactato de sódio 50% (m/v)	5,0 g
Solução de resazurina 0,025% (m/v)	1,0 g
Agar	1,9 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL
pH = 7,6 ± 0,2	

Fonte: adaptado de American Type Culture Collection – ATCC (sítio eletrônico acessado em: 21/04/2022) e Silva (2015).

A solução redutora utilizada nas atividades com o meio Postgate E modificado possui a composição apresentada na Tabela 06.

**Tabela 06** - composição da solução redutora.

<b>Solução redutora</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Ácido ascórbico	0,1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0 g
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Resazurina 0,025% (m/v)	4,0 mL
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL
pH = 7,6 ± 0,2	

Fonte: adaptado de Araújo et al (2013).

A solução salina fisiológica utilizada nas atividades com os meios DA e DA modificado possui a composição apresentada na Tabela 07.

**Tabela 07** - composição da solução salina fisiológica.

<b>Solução salina fisiológica</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000 mL

A solução de Água do Mar Sintética (AMS) utilizada nos ensaios com amostras obtidas de campo possui a composição apresentada na Tabela 08.

**Tabela 08** - composição da água do mar sintética.

<b>Água do mar sintética (AMS)</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Fluoreto de sódio (NaF)	0,003 g
Cloreto de estrôncio hexahidratado (SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0,020 g
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0,030 g
Brometo de potássio (KBr)	0,10 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,700 g
Cloreto de cálcio diidratado (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	1,478 g
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4,0 g
Cloreto de magnésio Hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	10,78 g
Cloreto de sódio (NaCl)	23,50 g
Silicato de sódio nonaidratado (Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O)	0,020 g
Ácido Etilenodiaminotetracético (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> )	0,001 g
Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	0,20 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 mL
pH = 7,6 ± 0,2	

Fonte: Adaptado de Moore et al (2010).

Todos os meios e soluções preparados foram mantidos sob purga de gás nitrogênio comum ( $N_2$ ) durante sua distribuição nos frascos de vidro de 10 mL com o dispensador automático programável “Integra – dose it P910”. Foi utilizado o volume de 9 mL para a dispensação de todos os meios e da solução nos frascos. Os frascos preparados foram fechados e lacrados, e submetidos à esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Após o resfriamento do meio POSTGATE E Modificado, foi adicionado a cada frasco 0,1 mL de solução estéril de tioglicolato de sódio a 1,24 g/mL, para garantir a condição de potencial redox adequada ao crescimento das BRS (POSTGATE, 1984).

No preparo do meio BAAR Modificado, após o resfriamento do meio foi adicionado a cada frasco 0,2 mL de solução estéril de Sulfato Ferroso Amoniacal –  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$  a 5%, e após a devida homogeneização, 0,1 mL de solução estéril de tioglicolato de sódio a 1,24 g/mL (SILVA, 2016; ATCC, 2022).

#### 4.1.3 Biocidas.

Foram avaliados os seguintes produtos biocidas, em suas respectivas concentrações:

- (a) Glutaraldeído grau I, da marca “Sigma”, a 10, 25, 50, 100 e 250 mg/L.
- (b) Sulfato de Tetra(hidroximetil)fosfônio (THPS), da marca “Sigma”, a 10, 25, 50, 100 e 350 mg/L.
- (c) CMIT/MIT, de nome comercial “Proclin $\square$  950” da marca “Sigma”, a 25, 50, 75, 100 e 500 mg/L.

As soluções de trabalho para cada biocida foram obtidas por meio de diluições em água destilada estéril até atingir concentrações teóricas 10 vezes superiores às escolhidas para a avaliação. Cada solução de trabalho preparada foi esterilizada por filtração em membrana (0,22  $\mu$ m), a fim de remover eventuais partículas ou contaminantes durante manuseio.

#### 4.1.4 Materiais utilizados.

A aplicação das soluções de trabalho dos biocidas nos frascos de ensaio foi feita com seringa estéril.

Os ensaios em microescala foram realizados com microplacas de 96 poços. A incubação destas microplacas foi realizada usando jarras para cultivo em anaerobiose com o sistema de geração “GASPAK EZ® (BD)”, que utiliza envelopes com reagente químico promotor de anaerobiose pela produção de CO<sub>2</sub>.

## 4.2 Métodos realizados.

### 4.2.1 Definição das condições de cultivo.

Os meios que apresentaram crescimento visual específico para BRS foram selecionados para preparação do inóculo de trabalho para os ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana. A evidência de crescimento para BRS consiste na formação de precipitados negros característicos como produção de Sulfeto Ferroso (FeS) em quantidade considerável no meio de cultura.

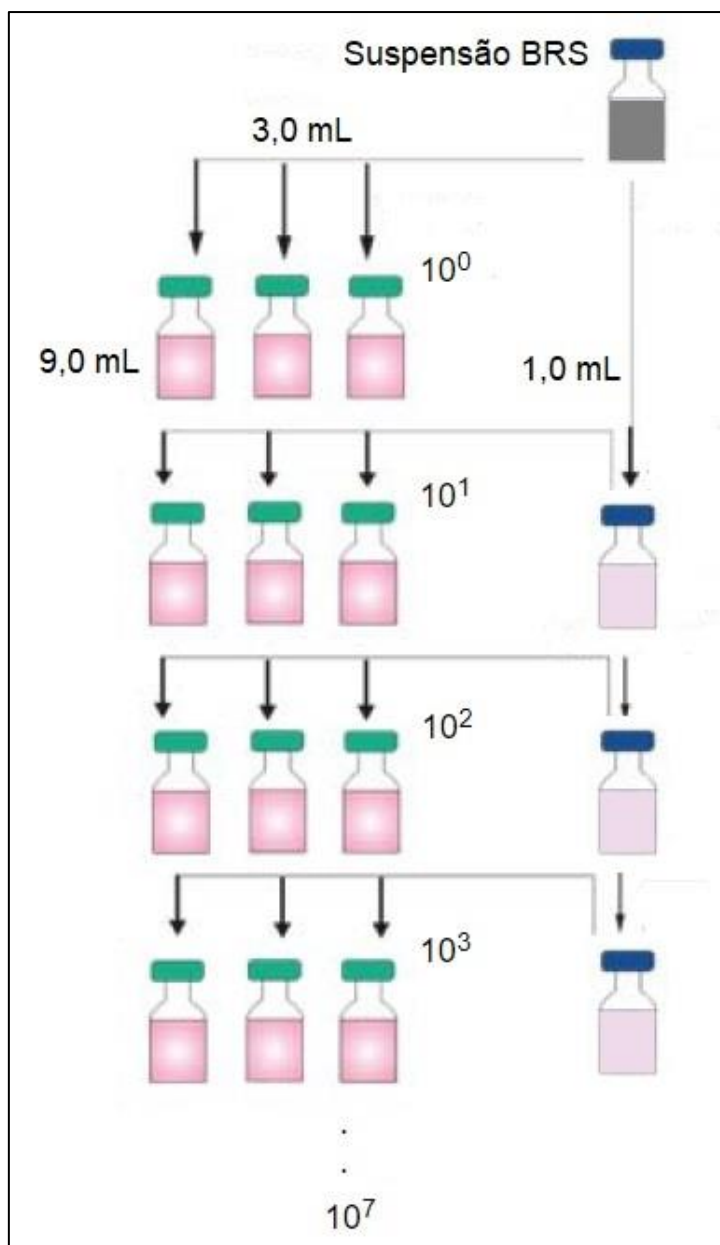
Os inóculos para uso nos ensaios executados foram obtidos a partir da reativação das linhagens de referência na forma liofilizada, em cada um dos meios selecionados. Após a ressuspensão do pellet com um pequeno volume de solução salina fisiológica ou de solução salina redutora (especificamente para o meio Postgate E modificado), os microrganismos foram incubados e cultivados por até 28 dias, com monitoramento do crescimento durante este período.

### 4.2.2 Ensaios de NMP em escala convencional (frascos).

Os ensaios de quantificação de BRS foram realizados com o repique das linhagens em novos lotes dos meios selecionados para obter a quantificação pela técnica de Número Mais Provável (NMP) em triplicata, com diluições até a ordem de  $10^{-7}$  e posterior incubação por até 28 dias, no método de frascos (SANT'ANNA, 2009).

O procedimento para o ensaio de NMP em frascos consistiu na inoculação de 1 mL de suspensão bacteriana nos 3 primeiros frascos com meio de cultura da série do NMP (identificados como " $10^0$ "), como também em 1 frasco de solução redutora para criar a diluição seguinte (" $10^1$ "). Deste frasco de solução inoculado, foram retirados 3 mL para injeção nos meios da diluição seguinte do NMP (" $10^1$ ") e 1 mL para o frasco de solução para próxima diluição (" $10^2$ "). O procedimento foi repetido sucessivamente até atingir a última diluição da série de NMP (" $10^7$ "). A figura 06 apresenta o esquema utilizado para o ensaio por NMP (SANT'ANNA, 2009).

**Figura 06** - Esquema de diluição para o NMP em frascos.



Fonte: adaptado de SANT'ANNA (2009)

#### 4.2.3 Ensaio de NMP em microplacas

O procedimento para o ensaio de NMP em microplacas seguiu procedimento semelhante ao NMP em frascos para a obtenção da série de diluição decimal, com a



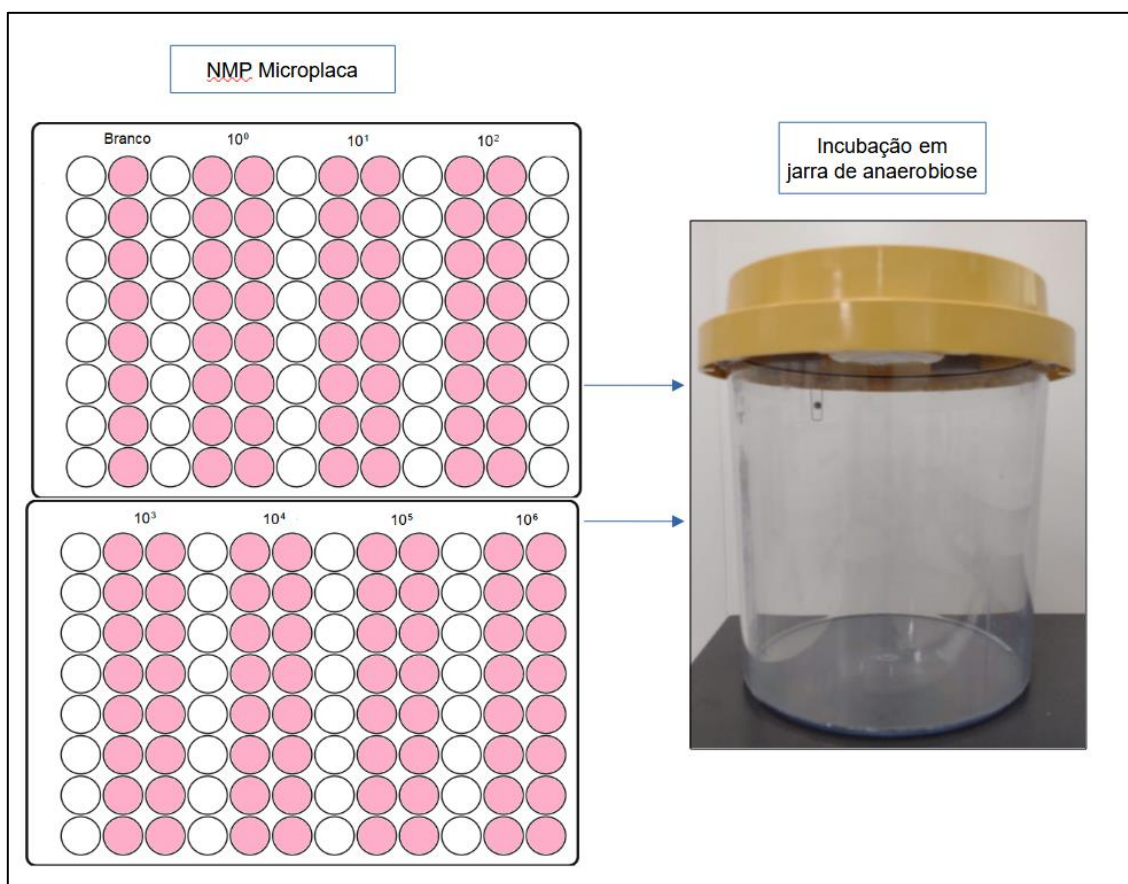
diferença de que no caso da técnica de microplaca, a diluição foi feita separadamente nos frascos inoculados, dos quais foram retiradas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  para deposição nos poços da microplaca.

O primeiro frasco com meio de cultura da série de diluição ( $10^0$ ) foi inoculado com 1 mL de suspensão bacteriana e homogeneizado. A partir dele, foi retirado 1 mL para injeção no frasco da diluição seguinte ( $10^{-1}$ ), e o restante do meio foi utilizado para aplicação na microplaca. Foram preenchidas 2 fileiras de 8 poços de uma microplaca de 96 poços, totalizando 16 poços para a diluição, conforme procedimento de quantificação já adotado na literatura para esta abordagem (NEUMANN, 2012).

Este procedimento foi repetido sucessivamente até atingir a diluição  $10^{-6}$  da série de NMP. As figuras 07 e 08 apresentam o esquema utilizado para o ensaio por NMP em microplacas e as microplacas preparadas para incubação em anaerobiose, respectivamente.



**Figura 08** - Esquema da distribuição preparada do NMP para incubação.



Cada ensaio de NMP foi conduzido com 2 microplacas preparadas para cada condição avaliada no planejamento experimental. Foi mantida uma fileira de 8 poços somente com o meio de cultura aplicado (condição branco) antes da primeira série do NMP, para fins de comparação e evidência do crescimento visual.

Foram utilizadas jarras de tamanho grande para o posicionamento das microplacas preparadas em seu interior, e 3 envelopes do gerador químico foram posicionados para produzir o ambiente anaeróbico em sua melhor condição, conforme indicação do fabricante. As Jarras foram fechadas e mantidas por até 2h30 antes da incubação, de maneira a permitir que a reação de anaerobiose promovida pelo gerador químico fosse alcançada sem interferência da temperatura dos ensaios.

Após este período, as jarras foram incubadas nas temperaturas de 30°C e 55°C conforme o microrganismo do ensaio por até 7 dias, com a abertura da jarra realizada

para observação do crescimento visual detectado (poços com escurecimento dos meios de cultura).

#### 4.2.4 Avaliação de atividade antibacteriana com as linhagens de referência.

Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foram utilizadas culturas das linhagens com incubação média entre 14 e 28 dias, período no qual é esperada a maior atividade metabólica das linhagens conforme dados de literatura.

Os ensaios foram conduzidos nas 2 escalas descritas (frascos e microplacas), de acordo com o planejamento experimental descrito a seguir:

(1) foi adicionado 0,1 mL de cultura BRS de referência para cada 9 mL de solução contida nos frascos com solução redutora;

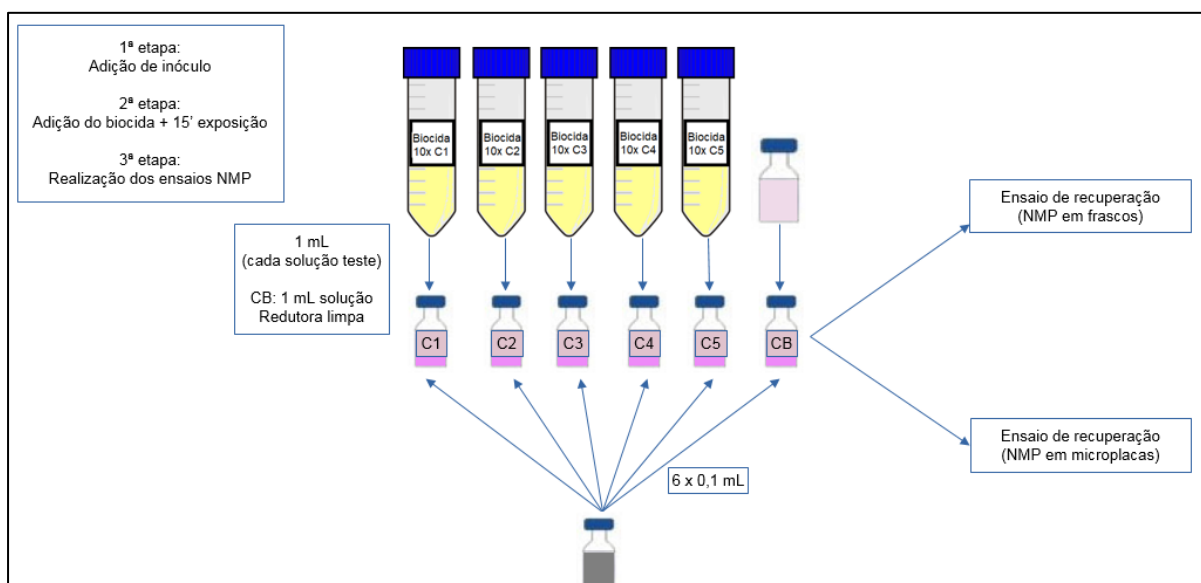
(2) foi adicionado 1 mL de cada solução de trabalho preparada para os biocidas nos frascos inoculados, de maneira a alcançar as concentrações selecionadas para as avaliações biocida.

(3) o contato dos biocidas com as bactérias na solução de ensaio foi mantido pelo período de 15 minutos. Decorrido este tempo, foi retirado 1 mL de cada frasco para os ensaios de recuperação de BRS viáveis pelos 2 tipos de técnica de NMP. A inoculação foi feita para atingir 2 objetivos de avaliação:

- Qualitativo: validar a concentração mínima na qual os produtos passam a exercer a ação biocida;
- Quantitativo: Verificar o grau de redução bacteriana encontrado após o tratamento com os produtos biocidas selecionados.

Em paralelo, foram realizados os controles biológicos (solução inoculada sem adição de biocida) e branco (fluido com biocida, sem adição de inóculo). A figura 09 apresenta o esquema geral para o ensaio de avaliação biocida executado.

**Figura 09** - Esquema para as avaliações de atividade antibacteriana executadas.



#### 4.2.5 Avaliação de atividade antibacteriana do THPS em amostras ambientais

Com o objetivo de verificar a aplicabilidade da avaliação antibacteriana proposta frente às amostras obtidas de ambiente da indústria petrolífera, foi executado um ensaio com enfoque na avaliação da eficiência biocida do produto THPS por tempos de exposição de 4h e 24h, o qual já é considerado como protocolo de rotina no setor de óleo e gás. Tal protocolo apresenta algumas particularidades em sua execução, como o uso de inóculos preparados a partir dos frascos da contagem de NMP das BRS encontradas para tais amostras, como também a aplicação de etapa preliminar de adição de sequestrante de oxigênio, como maneira de simular o tratamento prévio da água produzida para injeção em dutos que serão submetidos à hibernação (ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE, 2014).

De maneira breve, foi preparado inóculo de BRS com ajuste em sua concentração para um valor entre  $1,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^7$  NMP/mL para avaliar o grau de redução microbiana após o contato com o biocida. Para este ensaio, foi utilizado o inóculo obtido da quantificação de NMP para BRS de 2 amostras de campo

identificadas como “Amostra 1” e “Amostra 2”, disponíveis no Laboratório de Biotecnologia do IPT. O ensaio foi realizado para espécies em condição planctônica.

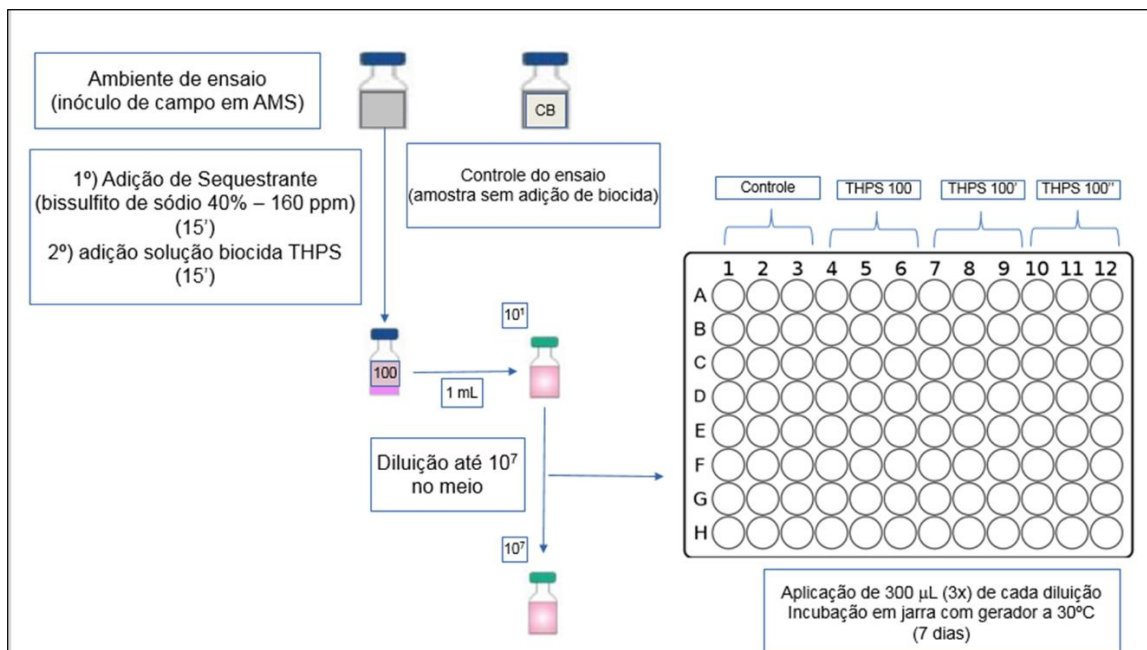
Os inóculos preparados foram injetados em frasco com água do mar sintética (AMS), preparada conforme a fórmula descrita na tabela 08 já apresentada, que foi distribuída em frascos de 50 mL. O volume acondicionado em cada frasco foi de 45 mL. Foi realizado um tratamento preliminar desta água inoculada com sequestrante de oxigênio bissulfito de sódio e manutenção em repouso pelo período mínimo de 15 minutos para permitir a sua ação.

Após o tratamento com sequestrante nos frascos inoculados, soluções preparadas do biocida foram injetadas nos frascos, de maneira a obter as seguintes concentrações na avaliação: 100, 200 e 300 mg/L. Os frascos preparados foram mantidos em repouso para as exposições ao biocida por 4h e 24h, e após estes períodos, foi realizada a recuperação de espécies BRS viáveis após exposição ao biocida pela incubação no meio Postgate E modificado, de maneira a obter a contagem do NMP das espécies sobreviventes ao tratamento.

A quantificação do NMP foi conduzida com protocolo de incubação em microplaca semelhante ao adotado para as linhagens BRS de referência, com a diferença de que este ensaio foi realizado com a mesma quantidade de réplicas utilizadas na escala convencional (triplicata), portanto o objetivo da atividade foi verificar se somente a redução da escala sem alteração no padrão de tratamento dos resultados de NMP. Em paralelo, foram conduzidos os ensaios com um controle biológico (sem a adição das soluções de THPS aos frascos).

A figura 10 apresenta o esquema realizado para as recuperações em microplaca do ensaio com amostras de campo.

**Figura 10** - Esquema para as avaliações de atividade antibacteriana executadas.



### 4.3 Tratamento e expressão dos resultados

Os frascos de cultivo que apresentaram meio com coloração preta ou com presença de grumos pretos foram considerados positivos para o crescimento de BRS, e com base nos frascos ou poços de microplaca onde foi possível observar este tipo de crescimento, foi realizado o tratamento necessário para obter o valor de NMP para crescimento das bactérias.

A quantificação do NMP em frascos foi feita a partir da identificação dos frascos das três últimas diluições representativas, as quais são consideradas como as três últimas diluições que apresentam resultados positivos, ou com duas diluições com resultados positivos e uma só com resultados negativos. Com a combinação mais adequada de resultados, foi aplicado o fator de correção com base na tabela para determinação de NMP apresentada na Figura 02.

A quantificação do NMP em microplacas usou o tratamento proposto por NEUMANN (2012), que aplica a seguinte fórmula descrita:

$$NMP_{MP} = (-2,305/v) * \log(s/n)$$

Onde:

$NMP_{MP}$  = NMP obtido em microplaca.

n = Número total de poços;

v = volume de inóculo de cada amostra aplicada nos poços;

s = número de amostras sem crescimento visível de organismos (total de poços – poços positivos);

log = logaritmo na base 10.

A aplicação da fórmula descrita permite obter a seguinte tabela 09 do valor de fator NMP para uso no cálculo dos resultados obtidos:

**Tabela 09** - Fator de NMP calculado para os ensaios em microescala (continua).

<b>NMP em microplacas</b>		
<b>nº de poços negativos</b>	<b>nº de poços positivos</b>	<b>NMP</b>
16	0	0
15	1	21,52
14	2	44,52
13	3	69,23
12	4	95,91
11	5	124,92
10	6	156,7
9	7	191,82
8	8	231,09
7	9	275,61
6	10	327



**Tabela 09** - Fator de NMP calculado para os ensaios em microescala (conclusão).

5	11	387,79
4	12	462,18
3	13	558,09
2	14	693,27
1	15	924,36
0	16	>924,36

Fonte: Neumann (2012)

Para a quantificação do NMP em microplacas, foi considerada para expressão dos resultados em cada ensaio a maior diluição que apresentou ao menos 8 poços com crescimento positivo nas fileiras preparadas da diluição (NEUMANN, 2012).

De posse dos resultados de NMP/mL de cada ensaio executado, foi possível verificar o grau de atividade biocida de cada produto, com base na redução das populações bacterianas. Para melhor visualização deste resultado, foi adotada a apresentação dos valores nos gráficos em escala logarítmica.

Os resultados obtidos em réplicas nas duas abordagens de escala (frascos e microplacas) foram verificados quanto à sua significância estatística com o uso do teste de Análise Normal de Variância (ANOVA) de fator único (nível de significância = 95%), com o uso das fórmulas do programa “Microsoft Excel 2019”.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios para avaliações de biocida com uso de metodologia de recuperação de inóculo de BRS em escala convencional (cultivo em frascos) e em escala reduzida (cultivo em microplacas) foram executados e terão seus resultados apresentados e discutidos a seguir.

Os ensaios foram conduzidos com linhagens de crescimento em condições distintas de temperatura, para fins de comparação dos perfis de crescimento obtido nos meios de cultura e dos perfis de atividade antibacteriana obtidos frente a cada microrganismo específico.

Os ensaios realizados com o microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 a 55°C foram conduzidos com o objetivo adicional de verificar se a aplicação de uma maior temperatura de incubação alterou os resultados obtidos de NMP em microescala, uma vez que, conforme indicação do fornecedor do gerador químico de anaerobiose, a temperatura para incubação de culturas incubadas em jarras de anaerobiose não deve ser superior a 45°C.

### **5.1 Seleção dos meios de cultura**

Os meios utilizados nos ensaios com as linhagens foram selecionados com base na obtenção de resposta mais rápida (ou seja, menor tempo de incubação necessário para confirmação visual de crescimento) e também considerando a melhor reprodutibilidade desta resposta, de acordo com o número de réplicas obtidas.

A linhagem *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 apresentou significativo crescimento ao ser cultivada nos meios de cultura DA e DA Modificado, como observado nas figuras 11 e 12. No caso do meio Postgate E modificado, não houve qualquer sinal de crescimento visual, uma vez que não houve a formação dos precipitados escuros de FeS característicos para detecção de BRS.

**Figura 11** - Crescimento de linhagem BRS no meio DA Modificado.



**Figura 12** - Crescimento de linhagem BRS no meio DA.



Para o crescimento da linhagem *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 os meios de cultura que se mostraram adequados foram os meios Postgate E modificado, DA Modificado e ATCC 42. O meio DA não apresentou crescimento detectável para esta linhagem. Apesar das linhagens BRS terem apresentado crescimento significativo no meio BAAR modificado na reativação, os repiques preparados com este meio não apresentaram crescimento satisfatório. Uma vez que o meio de cultura possui um preparo complexo e com restrição informada na literatura quanto ao grau de anaerobiose necessário no seu preparo e envase, foi decidido não utilizar tal meio de cultura nas atividades do projeto.

## 5.2 Resultados de quantificação de NMP

Os valores obtidos na quantificação de NMP tanto em escala convencional como em microplaca do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 demonstram que os meios de cultura utilizados ofereceram condições para recuperação do microrganismo em altas concentrações, inclusive ultrapassando a diluição máxima para quantificações por NMP realizadas na rotina do laboratório.

A quantificação realizada em microescala apresentou resultados adequados para avaliação de recuperação microbiana, com o detalhe de que foi possível alcançar ordens de diluição maiores com o uso da tabela de tratamento elaborada para o cultivo em microplaca.

**Tabela 10** - Resultados de concentração de NMP conduzido com a bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 (7 dias de incubação).

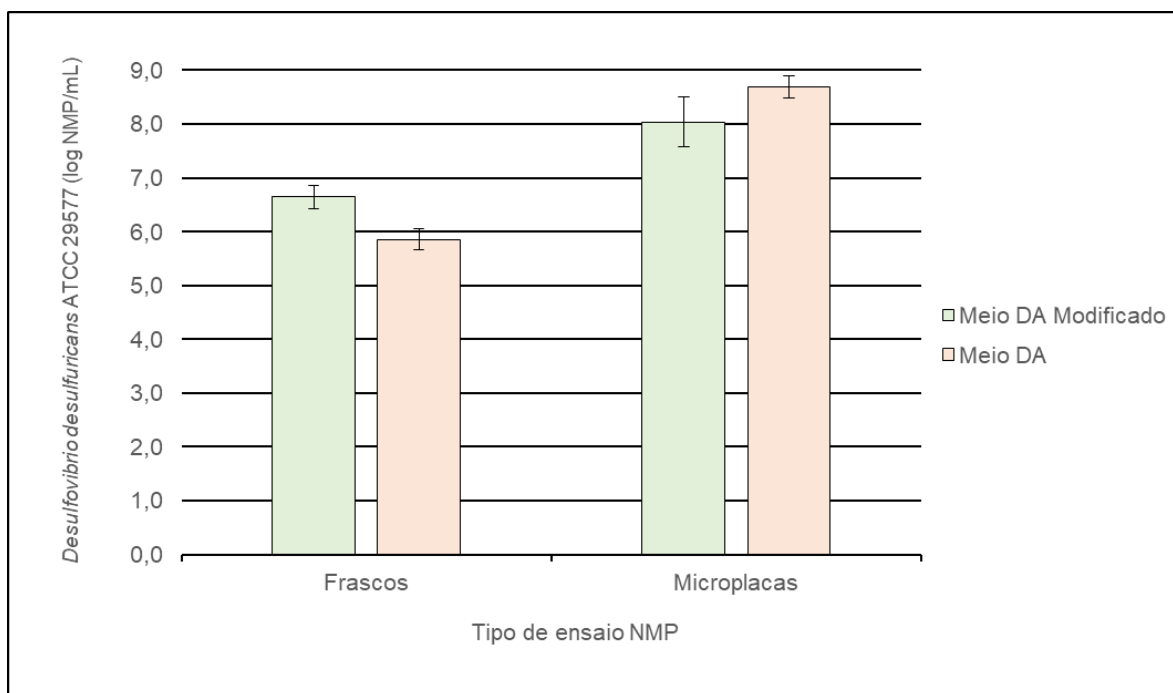
Meio de Cultura	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)	
	Método de frascos	Método de Microplacas
DA Modificado	$4,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$
DA	$7,1 \times 10^5$	$4,9 \times 10^8$

Era esperado que o método de microplacas apresentasse maior valor de resposta de crescimento quando comparado ao método em frascos em ordens de diluição iguais, uma vez que os parâmetros da equação utilizada para o NMP em microescala consideram a diluição do inóculo ( $v = 0,003$  mL) no conteúdo de meio aplicado em cada poço da série do NMP.

A Figura 13 apresenta a comparação dos resultados de crescimento do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 em cada método e com cada

meio utilizado. Os valores de NMP/mL estão expressos em escala logarítmica para adequação a uma escala possível de visualização.

**Figura 13** - Comparação dos métodos utilizados para quantificação de NMP da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577.



Os resultados obtidos nos ensaios foram expressos a partir dos valores médios resultantes das baterias de ensaios executadas com cada um dos meios e conforme o método utilizado para a quantificação (n=6 para ensaios em frascos, e n=5 para ensaios em microplacas, em ambos os meios de cultura).

Os resultados obtidos indicam que os dois meios de cultura são opções viáveis para crescimento do microrganismo utilizado para as avaliações biocidas, e em menor tempo de incubação quando comparado ao tempo padrão de 28 dias adotado para ensaios de NMP.

Uma característica comum aos dois meios é a presença em suas formulações do composto cloridrato de L-cisteína que atua como agente redutor, o que favorece os processos metabólicos envolvidos na redução do sulfato pelas BRS. Esta

característica já havia sido considerada em trabalhos anteriores (NAKAO et al., 2009; ZAMORA; MALAVER, 2012).

O meio DA modificado também apresenta o reagente metabissulfito de sódio que também atua como agente redutor, que favorece ainda mais a atividade metabólica das BRS.

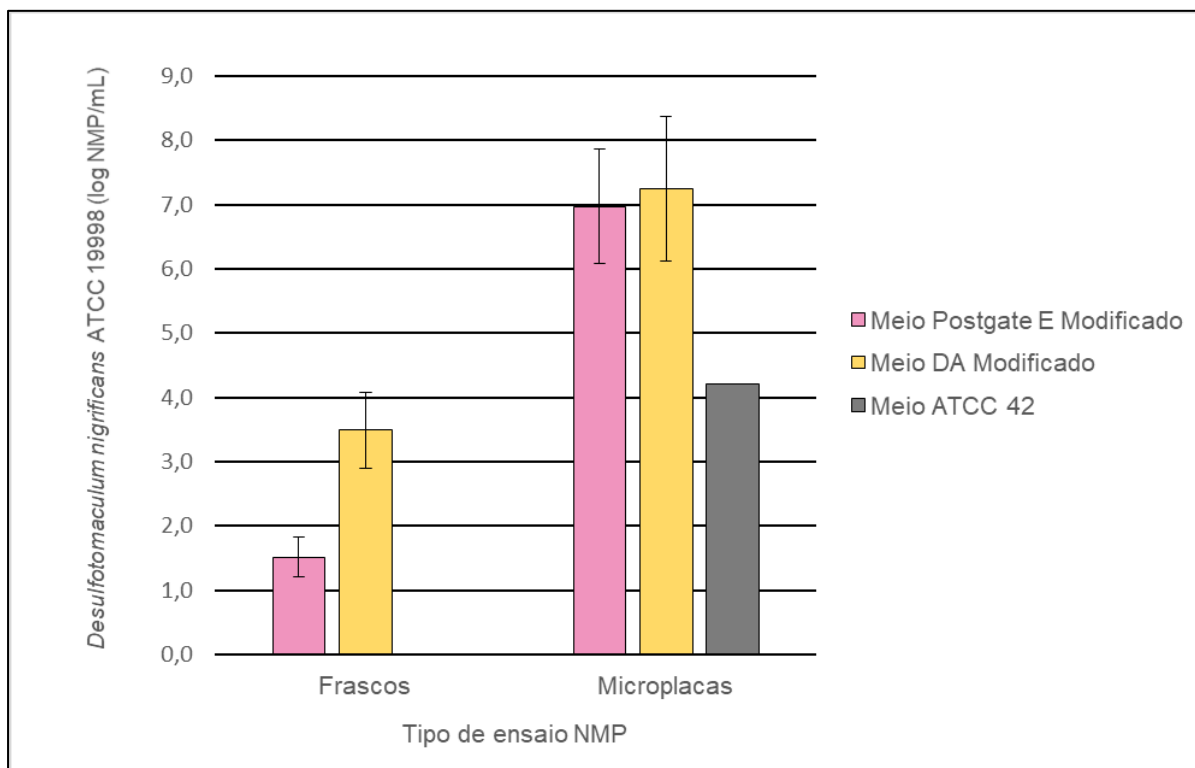
A presença de compostos redutores nas fórmulas, aliada aos demais componentes em suas respectivas quantidades, podem ser considerados como os principais fatores que permitem a diminuição no tempo de incubação utilizado nas avaliações. O tempo médio de incubação observado para os ensaios em frascos foi de 4 dias em frascos e de 7 dias em microplacas, para ambos os meios de cultura.

Os resultados obtidos de concentração de NMP com o microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 nos meios de cultura estão apresentados na Tabela 11 e Figura 14.

**Tabela 11** - Resultados de concentração de NMP conduzido com a bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 (7 dias de incubação).

Meio de Cultura	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998 (NMP/mL)	
	Método de frascos	Método de Microplacas
Postgate E Modificado	$3,2 \times 10^1$	$9,4 \times 10^6$
DA Modificado	$3,1 \times 10^3$	$5,2 \times 10^4$
Meio ATCC 42	Não executado	$1,6 \times 10^4$

**Figura 14** - Comparação dos métodos utilizados para o ensaio de quantificação do NMP da bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998.



Os resultados obtidos nos ensaios com os meios Postgate E modificado e DA modificado foram expressos a partir dos valores médios resultantes das baterias de ensaios executadas com cada um dos meios e conforme o método utilizado para a quantificação (Postgate E Modificado: n=4 para ensaios em frascos, e n=3 para ensaios em microplacas; DA Modificado: n=10 para ensaios em frascos, e n=5 para ensaios em microplacas).

Foi executado ensaio com o meio de cultura ATCC 42 pelo método de microplaca, na busca de um meio alternativo ao meio DA que não apresentou crescimento para o microrganismo nesta condição. Como os valores obtidos na quantificação por NMP foram semelhantes aos obtidos no meio DA modificado, optou-se por seguir com este último meio para a obtenção das réplicas necessárias para o tratamento dos resultados.

Pelos resultados obtidos, foi constatado que os ensaios em microplaca apresentaram valores de NMP/mL do microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans*

ATCC 19998 superiores quando comparados aos resultados obtidos nos ensaios em frascos. Este comportamento foi bastante acentuado principalmente para os ensaios com o meio Postgate E Modificado, onde foi possível observar diferença de 5 unidades logarítmicas entre as cargas bacterianas recuperadas de cada tipo de ensaio.

Antes de apontar que os ensaios conduzidos a 55 °C tiveram sucesso no seu objetivo, devem-se considerar vários aspectos no uso do gerador químico de anaerobiose. É importante lembrar que, por indicação do fornecedor do produto, não é recomendado o uso para temperaturas acima de 45 °C.

Como houve a necessidade de incubação na temperatura de 55 °C, foi possível constatar que mesmo com o uso em temperatura superior à recomendada pelo fabricante não prejudicou a proliferação do microrganismo, indicando que a anaerobiose obtida nos ensaios foi favorável. A condição de anaerobiose também foi confirmada pela cor branca visualizada no indicador aderido ao envelope do gerador químico colocado nas jarras incubadas.

Os resultados de NMP/mL obtidos indicam que a anaerobiose foi suficientemente favorável para a condução dos ensaios realizados a 55 °C. Importante destacar que se adotou a estratégia de manter o gerador agindo por um tempo mínimo em temperatura ambiente antes da incubação a 55 °C, o que pode ter contribuído para alcance da anaerobiose e sua respectiva manutenção das condições necessárias para o adequado crescimento do microrganismo.

A linhagem *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 é conhecida por ser formadora de esporos que permitem sua persistência nos ambientes menos favoráveis à sua proliferação, então é pouco provável que este período de ação prévia à incubação possa ter causado estresse significativo ao metabolismo do microrganismo (AÜLLO et al, 2013).

Adicionalmente, como o mecanismo de ação para obter anaerobiose pelo gerador é a produção de CO<sub>2</sub> via reação química em contato com o ar com participação de catalisador metálico, é possível admitir que a saturação da jarra com este gás pode ter favorecido a proliferação do microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. De acordo com o fabricante do gerador de anaerobiose, em



24h após a abertura e ativação o teor do CO<sub>2</sub> no ambiente interior da jarra deve se encontrar em torno de 13% (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2007).

Foi constatado que as microplacas incubadas na temperatura de 55°C apresentaram perda no volume de meio aplicado nos poços, sendo possível constatar condensação acentuada no interior da jarra de anaerobiose no momento da leitura de 7 dias. Este evento não interferiu no crescimento e detecção da bactéria nos poços, e por consequência na quantificação do NMP.

### 5.3 Resultados das avaliações com biocidas.

#### 5.3.1 THPS

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados do ensaio realizado com a linhagem *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, com os valores obtidos para a população bacteriana recuperada nos meios de cultura, pelas duas técnicas de NMP utilizadas e o maior valor de detecção possível dentro do número de diluições aplicadas nos ensaios.

**Tabela 12** - Resultados do ensaio de avaliação do biocida THPS com a bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 em frascos (resultados para 7 dias de incubação).

Meio de Cultura	Concentração THPS (g/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	350 mg/L
DA Modificado	9,8 x 10 <sup>6</sup>	8,3 x 10 <sup>6</sup>	9,3 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>	8,3 x 10 <sup>1</sup>	Não Detectado
DA	4,6 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>	2,5 x 10 <sup>1</sup>	1,5 x 10 <sup>1</sup>	Não Detectado

**Tabela 13** - Resultados do ensaio de avaliação do biocida THPS com a bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 em microplacas (resultados para 7 dias de incubação).

Meio de Cultura	Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	350 mg/L
DA Modificado	$3,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	Não Detectado	Não Detectado
DA	$9,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$9,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$

A avaliação biocida do THPS realizada por quantificação de NMP em frascos com o meio DA modificado apresentou a concentração de 100 mg/L do produto THPS como valor mínimo onde se visualizou a inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, com redução de 99,9991% na carga aplicada deste microrganismo calculada a partir dos resultados observados para tratamento de 15 minutos de exposição ao THPS. Esta concentração está coerente com resultados obtidos em trabalhos anteriores, que apresentam este valor como responsável na redução de 3 ordens de grandeza na população de bactérias planctônicas e sésseis (LAVANIA et al., 2011).

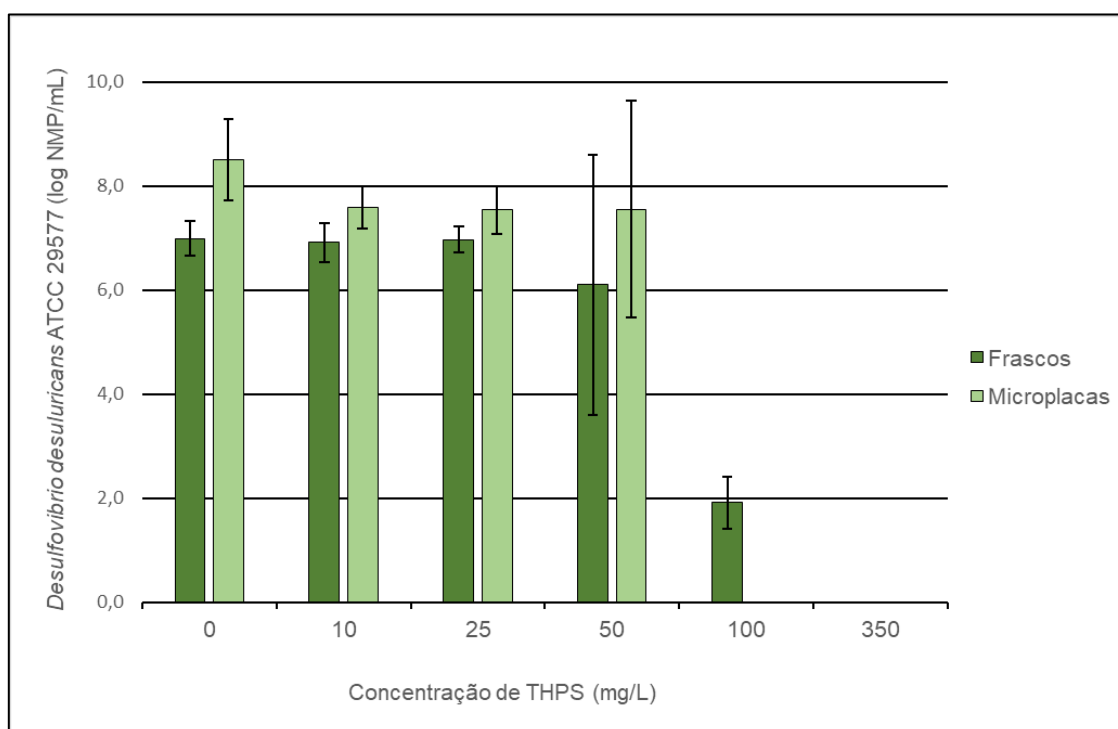
Na concentração de 350 mg/L a inibição do microrganismo foi considerada total, uma vez que não houve recuperação de microrganismo viável nos ensaios de NMP. Quando utilizado o meio DA nas quantificações de NMP, o valor de concentração mínima com inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 foi de 50 mg/L, com redução de carga do microrganismo em 99,9946%. Na concentração de 100 mg/L a redução observada foi semelhante, com valor de 99,9967%, enquanto que em 350 mg/L do THPS a inibição novamente foi considerada total. Tais resultados obtidos de concentração de uso do THPS estão consistentes com os valores de literatura e também para as especificações técnicas consultadas para apresentações comerciais dos biocidas frente às BRS (DOW CHEMICAL CONTROL, 2009).

Por outro lado, ao usar o método de recuperação do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 pelo NMP em microplacas, foi possível observar redução na população bacteriana frente ao tratamento com THPS, porém somente a avaliação com o meio DA modificado apresentou resultados consistentes para atestar a atividade antibacteriana do produto.

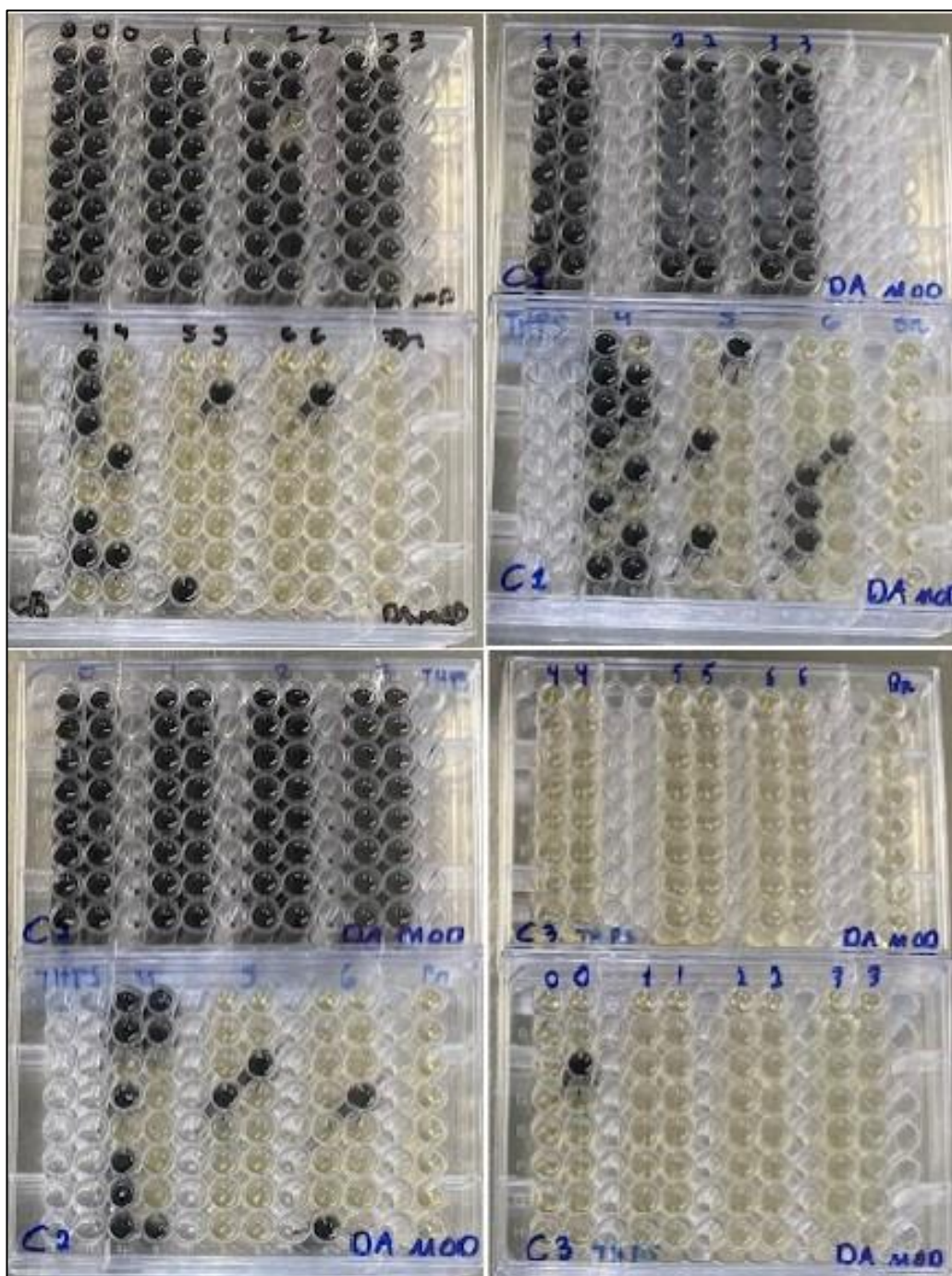
Os resultados obtidos na quantificação de NMP em microplacas com o meio DA modificado mostraram que a inibição foi completa com o produto usado nas concentrações de 100 e 350 mg/L, com o detalhe de que foi possível confirmar um maior valor da carga do inóculo utilizado neste ensaio ( $3,2 \times 10^8$  NMP/mL), quando comparado ao método conduzido em frascos ( $9,8 \times 10^6$  NMP/mL).

As figuras 15, 16 e 17 apresentam o resultado do crescimento da linhagem *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 nos dois meios de cultura após exposição ao THPS nas concentrações selecionadas e com a condição controle (sem aplicação de biocida) em paralelo, com os métodos de quantificação de NMP utilizados em comparação. Os valores de NMP/mL estão expressos em escala logarítmica.

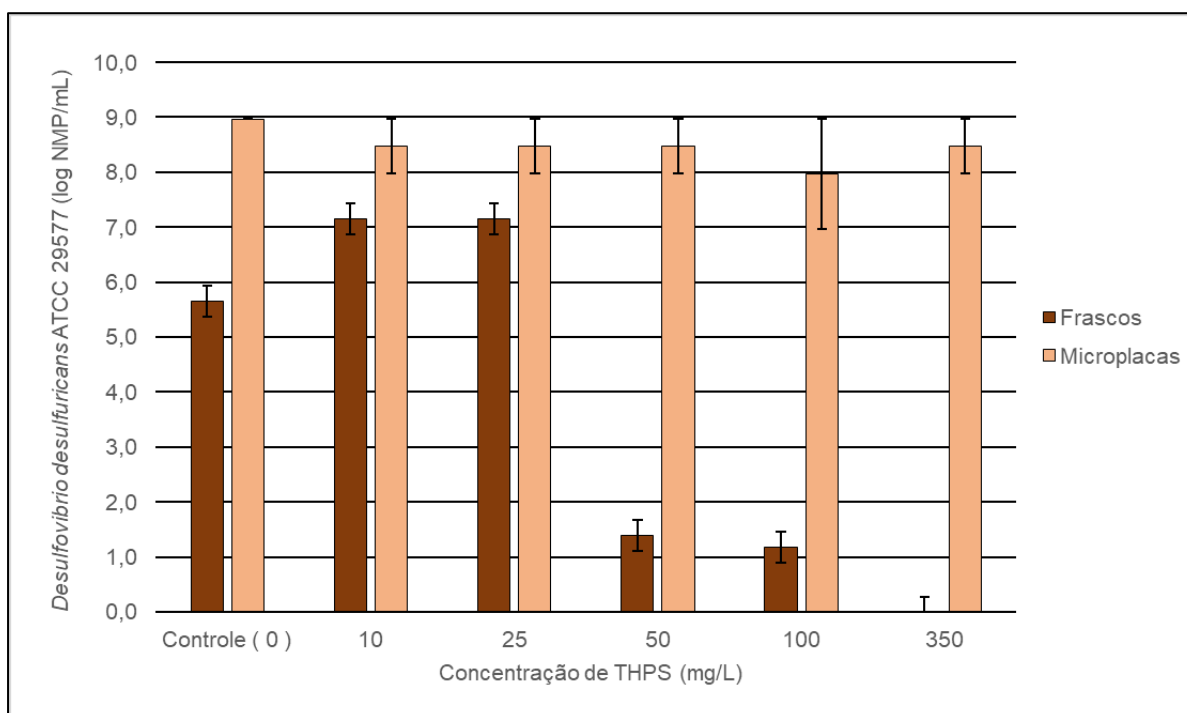
**Figura 15** - Resultados da avaliação da atividade biocida do THPS frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 no meio DA Modificado.



**Figura 16** - Apresentação visual dos resultados de atividade biocida do THPS frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 no meio DA Modificado.



**Figura 17** - Resultados da avaliação biocida do THPS frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 no meio DA.



É possível considerar a ausência de resultados de inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 pelo biocida THPS na avaliação em microplaca com o meio DA devido a alguma interação do biocida com o meio de cultura, que permite retomada do crescimento dos organismos sobreviventes, aliado ao ambiente promovido de anaerobiose pelo gerador químico comercial.

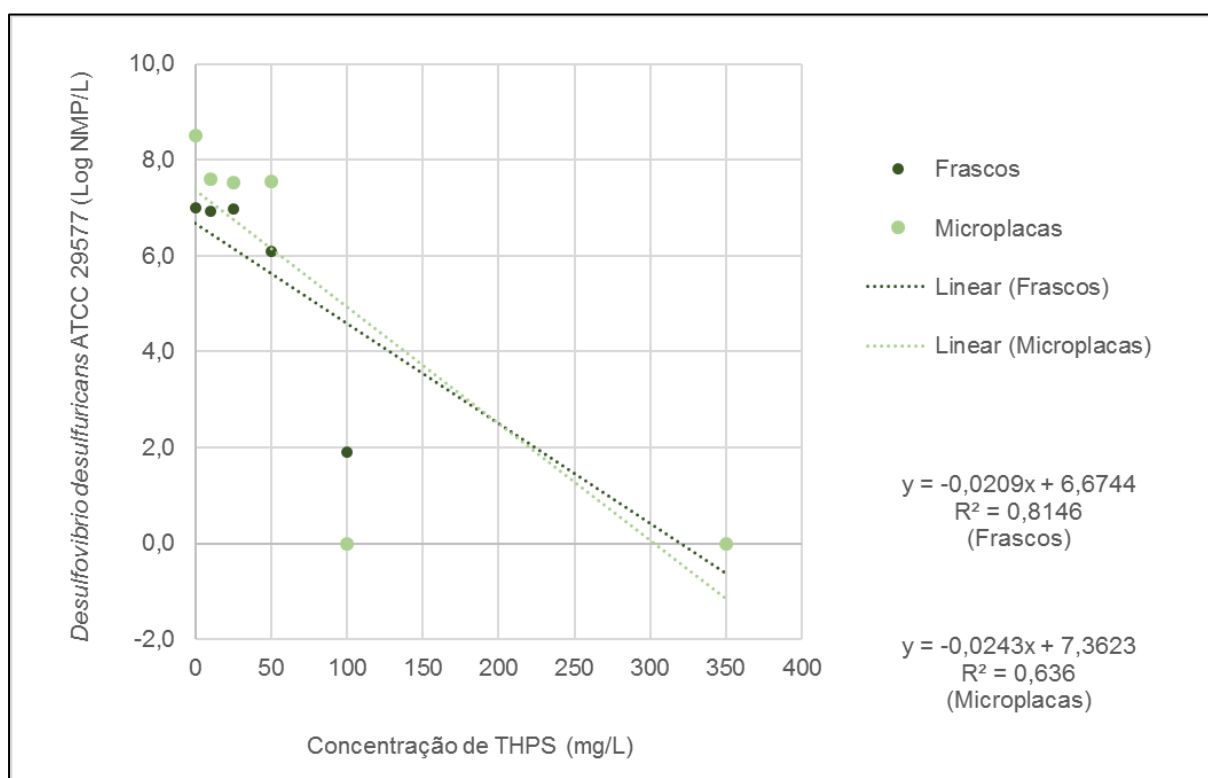
Uma vez que foi observado resultado de atividade biocida na avaliação com o meio DA em frascos, apresenta-se como fato não esperado o valor de recuperação da condição controle do microrganismo em meio DA em microplacas se apresentar significativamente superior ao valor de recuperação da mesma condição no meio DA em frascos. Este fato pode servir para corroborar a influência do ambiente de CO<sub>2</sub> produzido para anaerobiose junto às culturas de recuperação.

Adicionalmente, não se deve descartar a possibilidade deste comportamento ter ocorrido devido a erro operacional durante o processamento das amostras para a incubação no meio de cultura. Como as atividades de diluição foram realizadas nos próprios frascos dos quais foram obtidas as alíquotas para deposição nas

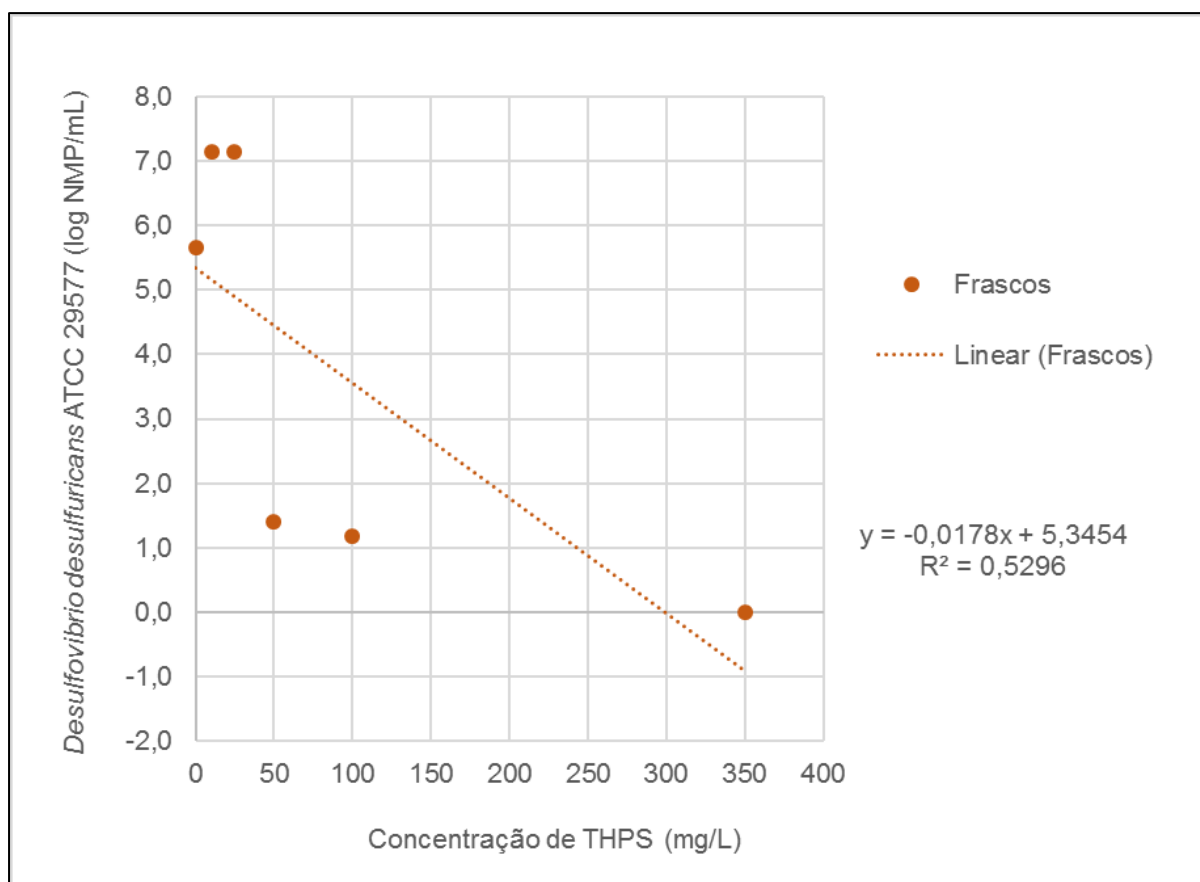
microplacas, a execução desta atividade deve ser feita com a devida atenção para que não ocorram erros como: troca da ordem das diluições no desenho da microplaca; deposição de volume inferior ao estabelecido no poço; manutenção das microplacas preparadas por excessivo tempo fora da incubação em anaerobiose.

A partir dos resultados obtidos e nos cenários em que foi observada a redução bacteriana, foi possível estabelecer as equações de redução da população do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, com seus respectivos gráficos apresentados nas figuras 18 e 19.

**Figura 18** - Equações obtidas das reduções de população do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 nas avaliações com THPS pelos métodos de NMP em frascos e em microplacas com o meio DA modificado.



**Figura 19** - Equação obtida da redução da população do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 na avaliação com THPS pelo método de NMP em frascos com o meio DA.



A partir dos gráficos obtidos, foi possível verificar que o resultado da avaliação da atividade biocida de THPS pela quantificação de NMP em frascos do meio DA modificado apresentou melhor linearidade para o perfil de redução bacteriana em comparação com a metodologia de quantificação de NMP em microplacas no mesmo meio, a partir dos valores de análise de regressão obtidos ( $r^2 = 0,8146$  para o ensaio em frascos e  $r^2 = 0,6360$  para o ensaio em microplacas).

Para confirmar se os resultados obtidos em cada método de incubação foram significativamente distintos, foi realizado o tratamento estatístico de ANOVA dos resultados de recuperação do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* após contato com o THPS utilizando o meio DA Modificado, que foi a bateria com maior número de réplicas executadas. Os dados obtidos a partir do tratamento com as fórmulas disponíveis no software "Microsoft Excel 2019" permitiram confirmar que, no nível de significância de 95% ( $p=0,05$ ), e considerando o fator de variação como

único, foi possível confirmar que os dados obtidos de cada bateria de ensaio eram significativamente distintos. Estes resultados estão apresentados na tabela 14.

**Tabela 14** - Tratamento estatístico para os resultados de contagens obtidas do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 com o meio DA Modificado, nos 2 tipos de escala utilizados para o cultivo de recuperação.

<b>Anova: fator único (Contagens ATCC 29577)</b>						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Meio DA (Frascos)	6	39,8768	6,6461	0,3		
Meio DA (Microplacas)	6	48,2212	8,0369	1,2464		
<b>ANOVA (p=0,05)</b>						
Fonte da variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de liberdade (gl)	Média dos Quadrados (MQ)	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	5,8025	1	5,8025	<b>7,5045</b>	<b>0,0209</b>	<b>4,9646</b>
Dentro dos grupos	7,7321	10	0,7732			
TOTAL	13,5346	11				

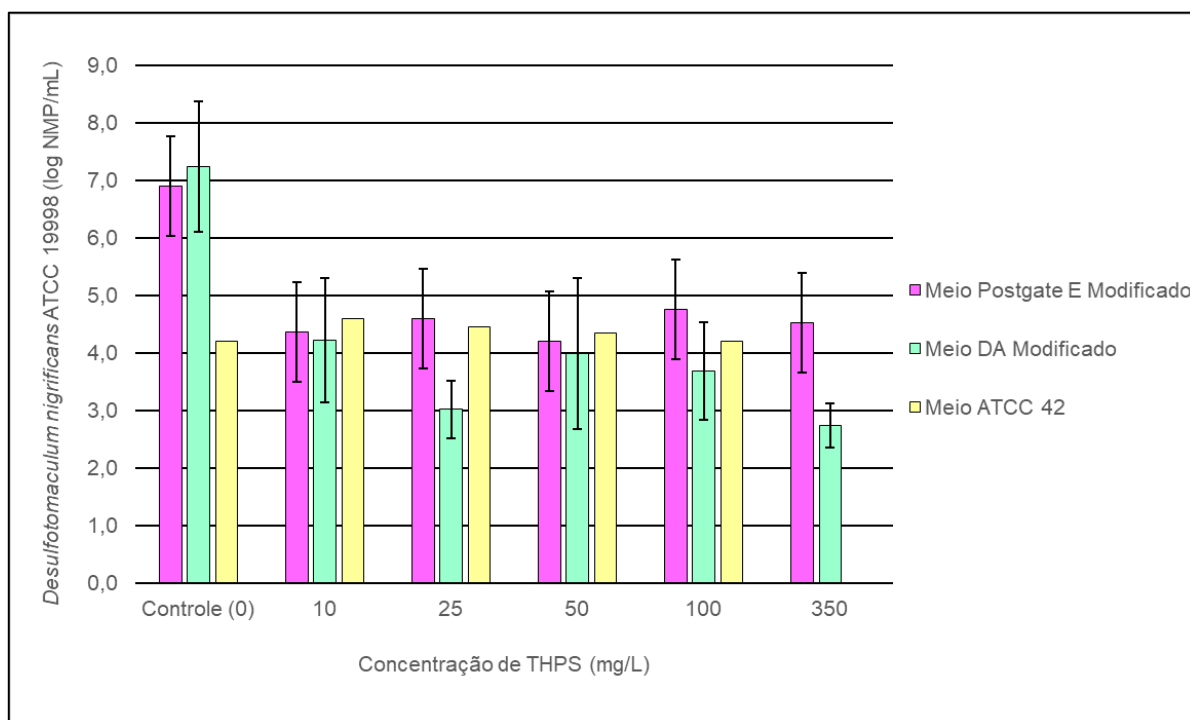
Os ensaios realizados com o microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 estão com seus resultados apresentados na tabela 15 e na figura 20.



**Tabela 15** - Resultados da avaliação do biocida THPS frente a bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 em microplacas (7 dias de incubação).

Meio de Cultura	Concentração de THPS (mg/L) - <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	350 mg/L
Postgate E Modificado	$7,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$
DA Modificado	$1,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$
Meio ATCC 42	$1,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	Não Detectado

**Figura 20** - Resultados da avaliação biocida em microplacas do THPS frente ao microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 em três meios de cultura.



Foi possível constatar redução na população do microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 em todas as concentrações avaliadas do THPS, nos 3 meios de cultura usados na avaliação. Porém, não foi possível evidenciar uma concentração mínima inibitória do produto frente a este

microrganismo pelo método de quantificação de NMP em microplacas com os meios Postgate E modificado e DA modificado.

No caso do meio ATCC 42, foi possível evidenciar inibição completa do microrganismo frente ao THPS na concentração de 350 mg/L. Não foi possível evidenciar ação antibacteriana nas demais concentrações avaliadas do THPS, pois os valores observados de carga microbiana do microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* com exposição ao THPS a 10, 25, 50 e 100 mg/L apresentaram-se na mesma ordem de grandeza do valor observado nas condição controle.

Os resultados obtidos permitiram identificar a metodologia de quantificação do NMP em microplaca do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 após tratamento com o biocida THPS como uma alternativa viável ao uso do NMP em frascos para esta quantificação, uma vez que foi possível recuperar valores comparáveis de NMP/mL ao realizar ensaio com os dois métodos de quantificação.

Importante destacar que o microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 somente cresceu nos meios que possuem formulação mais rica em componentes nutricionais, então já era esperado que o tempo de incubação apresentasse diminuição quando comparado com o período de 28 dias estabelecido como padrão para as análises. Entende-se como pertinente continuar a prospecção de outras formulações de meios de cultura, a fim de obter mais resultados de cultivo e assim confirmar se o perfil de crescimento do microrganismo encontrará respaldo nos dados existentes em literatura.

Ainda que somente tenha sido possível obter resultados de NMP/mL em microplaca para quantificar a eficácia biocida do THPS frente ao microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998, foi importante verificar que a temperatura utilizada na incubação do ensaio não inviabilizou a obtenção de resultados de quantificação na microescala, uma vez que a medida realizada utiliza o critério visual de detecção do crescimento com réplicas em quantidade suficiente de poços preparados.

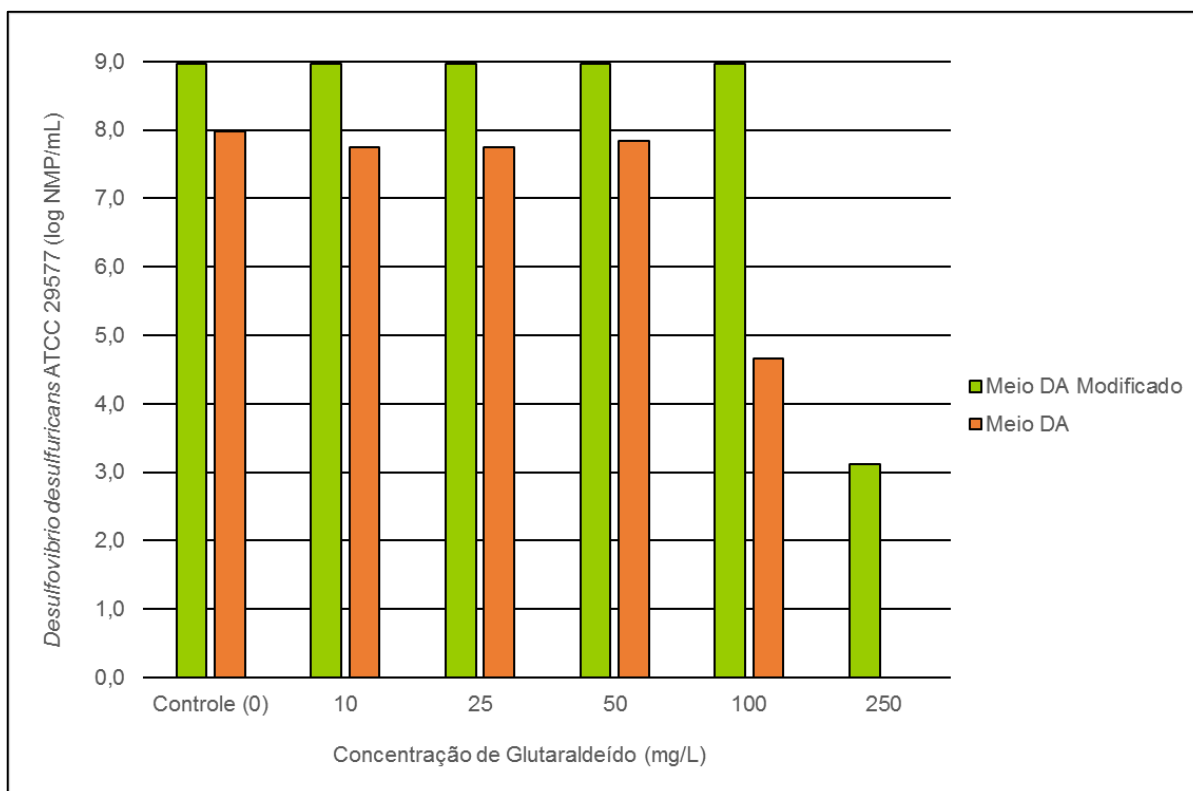
### 5.3.2 Glutaraldeído

Foi realizado um ensaio de avaliação da atividade biocida do glutaraldeído frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 utilizando a metodologia de quantificação de NMP em microplacas. Os resultados estão apresentados na Tabela 16 e na Figura 21.

**Tabela 16** - Resultados do ensaio de avaliação do biocida Glutaraldeído com a bactéria ATCC 29577 em microplacas (7 dias de incubação).

Meio de Cultura	Concentração de Glutaraldeído (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	10 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	250 mg/L
DA Modificado	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^3$
DA	$9,3 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$4,6 \times 10^4$	Não Detectado

**Figura 21** - Resultados da avaliação biocida do Glutaraldeído frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 nos dois meios de cultura.



Foi possível observar inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 a partir da concentração de 100 mg/L do glutaraldeído, valor este que se encontra de acordo com os dados encontrados na literatura frente aos microrganismos *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas*. Cabe destacar que já foi observado que o glutaraldeído pode apresentar inibição a partir de baixos valores de concentração (25 mg/L) para este microrganismo, devido às suas propriedades físico químicas que permitem a auto-polimerização e reticulação das moléculas citoplasmáticas (LAVANIA et al., 2011; STRUCHTEMEYER; MORRISON; ELSHAHED, 2012).

Os resultados obtidos indicam que o uso do meio DA para obter o resultado de NMP/mL do microrganismo viável após exposição ao glutaraldeído permitiu discriminar ao menos 2 concentrações nas quais a população do microrganismo foi inibida (100 e 250 mg/L), enquanto que com o meio DA modificado, somente foi possível recuperar população viável após exposição na concentração de 250 mg/L.

Trabalhos consultados demonstraram que a atividade do glutaraldeído é fortemente influenciada pelas condições de exposição do biocida ao inóculo, com a obtenção de uma discreta redução bacteriana (1 unidade logarítmica) na concentração de 100 mg/L quando usado na avaliação de *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas* em condição planctônica (LAVANIA et al., 2011).

Nesta mesma concentração do glutaraldeído, outro efeito verificado em trabalho semelhante foi o retardo na fase de crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* ao usar as concentrações de 20 e 100 mg/L durante 5 dias de contato do produto com o microrganismo, com necessidade de maior tempo de incubação para recuperação do microrganismo (LEE et al., 2010).

Uma consideração que pode ser feita é de que o glutaraldeído possa ter tido interferência na sua reatividade devido à presença de sulfeto residual na suspensão de microrganismos utilizada nos ensaios com o biocida em contato por 15 minutos. Para confirmar o grau de degradação da molécula neste tempo de contato, seria necessário colocar uma técnica analítica para monitoramento do teor do glutaraldeído. Como o enfoque do projeto foi avaliar os produtos por uma metodologia

microbiológica (contagem de NMP), o planejamento experimental ficou restrito às atividades para esta finalidade.

Devido à necessidade de replanejamento de ensaios e às questões apresentadas nos ensaios iniciais a 55°C com o produto THPS, não foram executados ensaios de avaliação biocida quantitativa do glutaraldeído em microescala frente ao microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. Somente foram executadas avaliações de caráter qualitativo, que consistiram na exposição do microrganismo ao biocida pelo tempo de 15 minutos, com posterior incubação em triplicata nos meios de cultura, sem seguir com as diluições para o NMP. O resultado obtido nesta avaliação de caráter qualitativo foi de que todas as concentrações do ensaio avaliadas apresentaram inibição do microrganismo ao usar o meio Postgate E Modificado, e somente na concentração de 250 mg/L com o meio DA Modificado foi verificada sua inibição.

Assim como considerado para o produto THPS, os resultados obtidos com este ensaio de avaliação do glutaraldeído permitem considerar como promissor o uso da metodologia de quantificação do NMP em microplaca do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 após tratamento com este biocida. Contudo, ensaios adicionais devem ser executados com os meios de cultura identificados a fim de avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

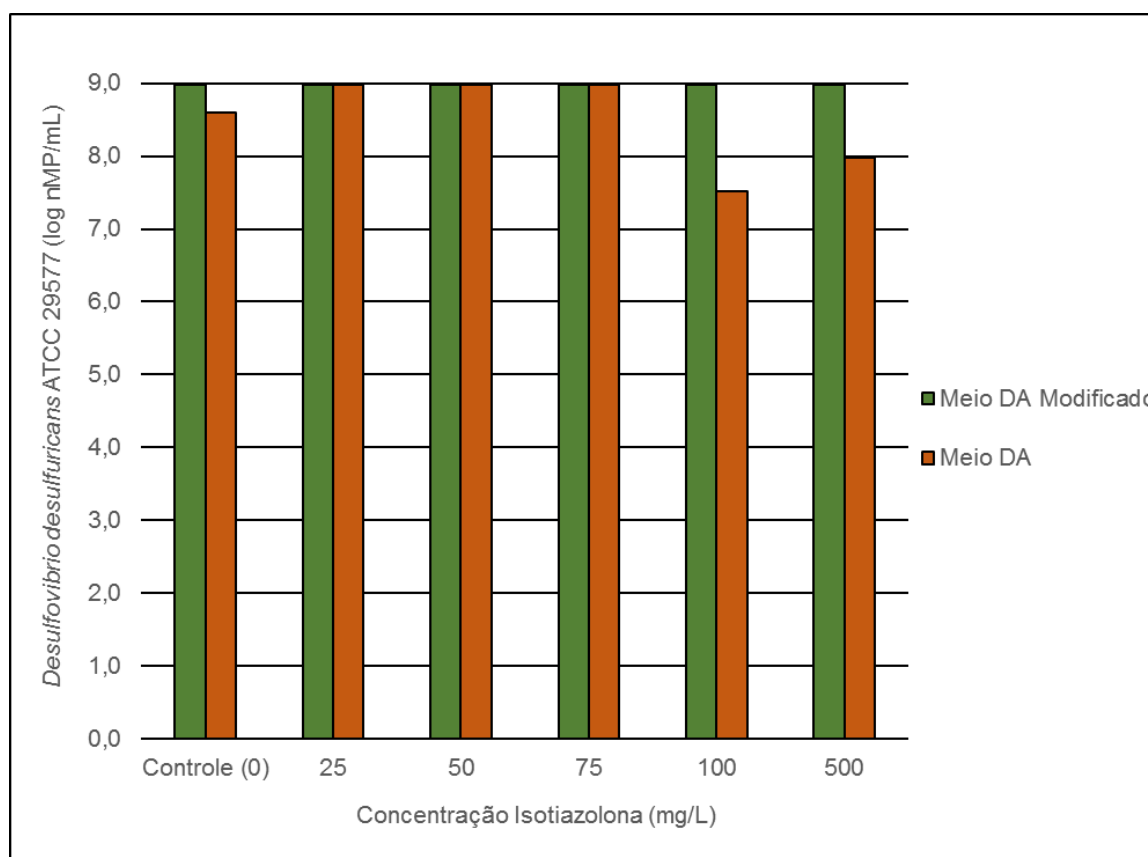
### 5.3.3 Isotiazolona

Foi executado um ensaio de avaliação de eficiência biocida da classe isotiazolonas frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577. O ensaio foi conduzido na condição de microplaca, e os resultados estão apresentados na tabela 17 e figura 22.

**Tabela 17** - Resultados do ensaio de avaliação do biocida Isotiazolona com a bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 em microplacas (7 dias de incubação).

Meio de Cultura	Concentração de Isotiazolona (mg/L) - <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL)					
	Controle (0 mg/L)	25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L	100 mg/L	500 mg/L
DA Modificado	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$
DA	$3,9 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$

**Figura 22** - Resultados da avaliação biocida da Isotiazolona frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 nos 2 meios de cultura.



Não foi possível observar redução bacteriana após exposição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 ao biocida da classe das

isotiazolonas. É possível que este produto tenha interagido com os componentes da solução redutora usada como ambiente de ensaio, de modo a inativá-lo e assim permitindo a recuperação total da carga bacteriana usada no ensaio (WILLIAMS; SCHULTZ, 2015).

Mesmo que tenha sido possível observar um leve decréscimo na população bacteriana recuperada nas condições do biocida a 100 mg/L e 500 mg/L, não foi possível afirmar que há atividade biocida da Isotiazolona frente ao microrganismo. Os valores observados foram de redução de somente uma unidade na escala logarítmica, os quais não podem ser considerados como significativos para atestar atividade biocida do produto.

Não foram executados ensaios de avaliação biocida da isotiazolona em microescala com o microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. Somente foram executadas avaliação de caráter qualitativo, nas quais o resultado obtido foi a presença de efeito inibitório em todas as concentrações avaliadas no ensaio com o meio Postgate E modificado, e inibição somente na concentração de 250 mg/L do produto quando usado o meio DA Modificado para quantificar a recuperação do microrganismo.

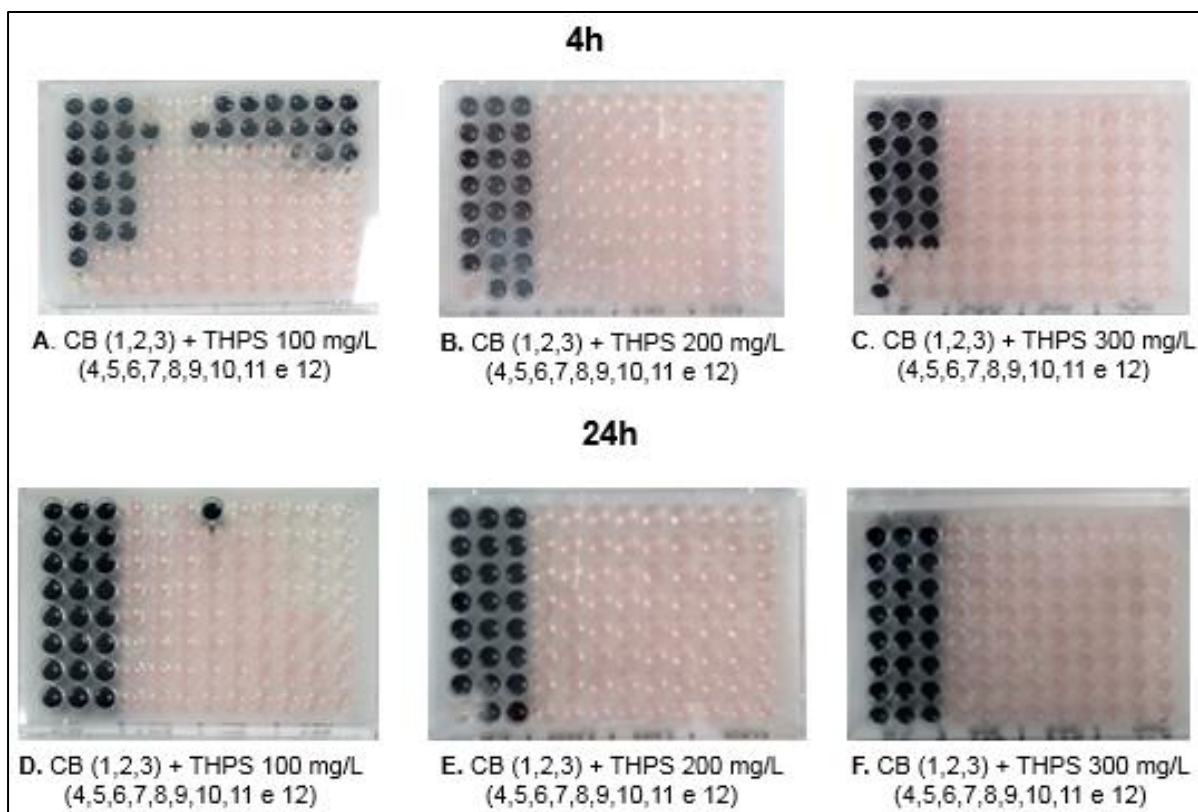
O fato de a avaliação do NMP em microescala não ter apresentado resultados satisfatórios para a recuperação do microrganismo *Dessulfovibrio dessulfuricans* ATCC 29577 após contato com a isotiazolona não significa que tal método não serve para este produto biocida em especial. Uma possibilidade de explicar os resultados obtidos está numa primeira hipótese referente à composição da solução salina redutora onde o contato do microrganismo com o biocida foi executado.

Assim, um estudo mais aprofundado a respeito das interações dos compostos da classe das isotiazolonas precisa ser realizado antes de estabelecer a aplicação da metodologia de NMP em microplacas para suas avaliações.

#### 5.4 Avaliação do THPS em amostras ambientais.

Foi possível realizar o ensaio de avaliação de eficiência do biocida THPS frente às espécies BRS obtidas de 2 amostras coletadas do ambiente de indústria petrolífera, identificadas como “Amostra 1” e “Amostra 2”. Foi observado que as 3 concentrações utilizadas no ensaio apresentaram inibição dos microrganismos presentes no inoculo. Os resultados estão apresentados nas tabelas 18 e 19, assim como o registro visual das microplacas obtidas após a incubação na figura 23 e 24.

**Figura 23** - Cultivo em microplaca do ensaio de exposição em diferentes tempos da cultura planctônica de BRS da “Amostra 1”, ao THPS nas concentrações de 100 mg/L, 200 mg/L e 300 mg/L. As numerações são referentes às colunas utilizadas de cada microplaca em triplicata para condição avaliada (CB: Controle Biológico).

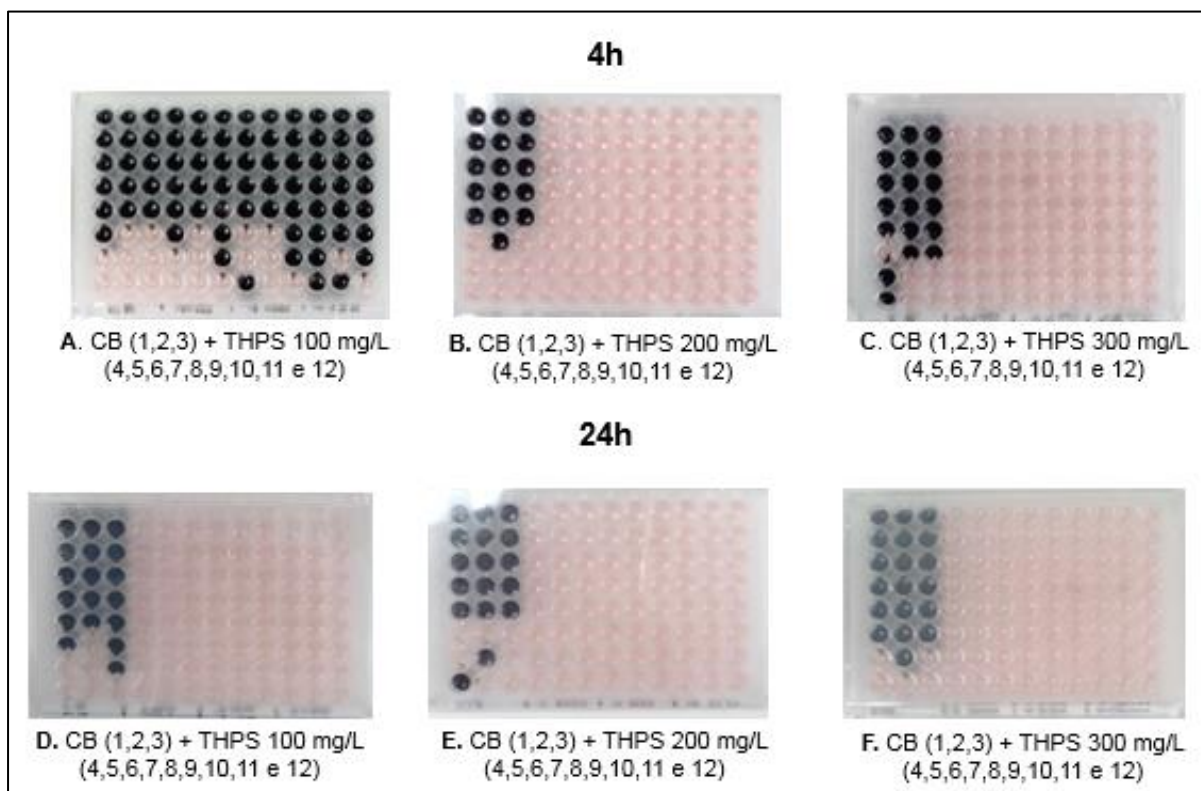




**Tabela 18** - Quantificação por NMP da condição controle do ensaio com BRS Planctônicas da “amostra “1”. Valor de NMP para a média obtida das triplicatas.

Condição	Contagem exposição 4h (NMP/mL)	Contagem exposição 24h (NMP/mL)
Controle	$3,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
THPS 100 mg/L	$6,0 \times 10^1$	Não Detectado
THPS 200 mg/L	Não Detectado	Não Detectado
THPS 300 mg/L	Não Detectado	Não Detectado

**Figura 24** - Cultivo em microplaca do ensaio de exposição em diferentes tempos da cultura planctônica de BRS da “Amostra 2”, ao THPS nas concentrações de 100 mg/L, 200 mg/L e 300 mg/L. As numerações são referentes às colunas utilizadas de cada microplaca em triplicata para condição avaliada (CB: controle Biológico).



**Tabela 19** - Quantificação por NMP da condição controle do ensaio com BRS Planctônicas da “amostra “2”. Valor de NMP para a média obtida das triplicatas.

<b>Condição</b>	<b>Contagem exposição 4h (NMP/mL)</b>	<b>Contagem exposição 24h (NMP/mL)</b>
Controle	9,7 x 10 <sup>4</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>
THPS 100 mg/L	7,41 x 10 <sup>4</sup>	Não Detectado
THPS 200 mg/L	Não Detectado	Não Detectado
THPS 300 mg/L	Não Detectado	Não Detectado

Foi possível observar uma redução significativa do inóculo de BRS nas amostras de campo, com a redução de carga bacteriana ocorrendo principalmente a partir da concentração de 200 mg/L do THPS, o que corrobora sua eficácia como biocida frente às espécies BRS.

Um detalhe importante a destacar é que este ensaio utilizou uma etapa preliminar de acondicionamento do ambiente de ensaio, procedimento distinto do que foi realizado para os ensaios com as linhagens de referência. Este procedimento provavelmente pode ter influenciado na quantificação de população viável.

Também há de se considerar os diferentes tempos de exposição usados na avaliação, que foram bem maiores que os 15 minutos selecionados para as avaliações com as linhagens de referência. Este é um dado interessante para considerar a escolha dos 15 minutos como tempo pertinente para uma exposição suficiente para se atestar a atividade biocida de produtos. Pelo observado no conjunto geral dos resultados, ambas as avaliações em 15 minutos como em 4 horas e 24 horas foram consideradas adequadas aos objetivos de cada ensaio realizado.

### **5.5 Considerações gerais sobre os resultados obtidos.**

Biocidas são amplamente utilizados na indústria petrolífera, mas pouco se sabe sobre a atuação de tais biocidas nos microrganismos presentes no local quando o problema é observado, o que é decorrente da grande diversidade da microbiota envolvida.

A informação sobre atividade de biocidas sobre um determinado grupo microbiano é de ampla importância no controle destes microrganismos. No caso das BRS, problemas resultantes de suas altas concentrações geram perdas nos processos do setor petroquímico. O monitoramento constante e atuação rápida no processo pode contribuir na redução de perdas.

O uso de uma metodologia que permita quantificar microrganismos em altas diluições nos ensaios de avaliação de produtos biocidas é relevante dentro das atividades de monitoramento e controle de biocorrosão causada por BRS, uma vez que, ao evidenciar a inibição desta classe de microrganismos presente em grande concentração frente a um determinado biocida, mais atrativo este se tornará como opção de escolha para tratamento nos sistemas.

É interessante que tal metodologia também apresente seus resultados em tempo mais curto, para que os operadores possam adotar ações mais assertivas no controle da corrosão microbiana promovida pelas BRS.

Contudo, o critério para adoção de técnica deve estar bem definido e considerar os aspectos operacionais e estruturais dos sistemas nos quais o biocida deverá ser aplicado, bem como a possibilidade de obter resultados de modo célere para direcionar as tomadas de ação.

Durante avaliações de biocidas, alguns aspectos devem ser levados em conta ao se medir a eficácia dos produtos frente aos microrganismos. Muitas vezes, é possível que produtos químicos semelhantes apresentem uma variação significativa na sua eficácia de tratamento, devido a mudanças em parâmetros relacionados ao tempo de contato e mesmo ao tipo de população avaliada nos ensaios (planctônicas ou sésseis) (BARTLETT; KRAMER, 2011).

O uso de linhagens de referência em condição planctônica nas atividades executadas no trabalho considerou o fato de ser uma atividade conduzida em caráter inovador dentro da rotina do laboratório, e, portanto, com necessidade de estabelecer uma condição mais controlada para avaliação de atividade antibacteriana. Mesmo que as recomendações adotadas na literatura sejam realizar as avaliações com microrganismos que sejam representativos das condições do sistema a ser monitorado, o fato de não haver informações suficientes para corroborar o

desempenho do gerador químico de anaerobiose frente a diversas espécies BRS foi o motivo da condução desta etapa do trabalho nos parâmetros já apresentados.

Os biocidas selecionados para as atividades consideraram a frequência de aplicação na rotina das atividades do setor petrolífero, e também os perfis de atividade relatados na literatura no que se refere ao tratamento específico para as BRS. A escolha do THPS foi considerada como a mais significativa para o projeto, e na qual a maior parte das atividades acabou sendo conduzida, uma vez que houve o atraso na entrega da linhagem de referência adquirida no projeto.

A fim de otimizar o planejamento de ensaios frente a este evento, as atividades com os produtos glutaraldeído e isotiazolona acabaram reduzidas. Contudo, o extensivo levantamento de literatura realizado a respeito dos produtos permitiu em certo modo o entendimento dos respectivos mecanismos de ação, como também servirá de subsídios para futuras atividades que necessitem avaliar tais produtos.

O ensaio de quantificação de NMP viável após exposição ao THPS em microescala conduzido com a população de BRS obtida da amostra de campo no projeto do IPT apresentou resultado bastante animador quanto à possibilidade de substituição do método de NMP em frascos atualmente utilizado pelo laboratório, o que confere uma vantagem no uso de recursos disponíveis para as análises em momentos de alta atividade laboratorial ou mesmo condução de análises NMP de outras frentes de trabalho, e que por consequência acabam por vezes por competir pelo uso dos mesmos recursos.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível constatar a aplicabilidade do método em microescala para cultivo de duas linhagens de bactérias redutoras de sulfato (BRS), com base nos dados obtidos pela revisão de literatura e pelos resultados obtidos no projeto;
- O microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 apresentou significativo crescimento nos dois meios de cultura selecionados para as atividades do projeto (DA modificado e DA). Os 2 métodos de quantificação de NMP usados nos ensaios (frascos e microplacas) permitiram obter valores de crescimento comparáveis dentro do intervalo de 7 dias;
- O microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 apresentou crescimento em 3 meios (Postgate E Modificado, DA modificado e ATCC 42). Foi possível verificar que, no ensaio NMP em frascos, o meio DA Modificado apresentou melhor resultado de crescimento, enquanto que no ensaio NMP em microplacas o meio Postgate E Modificado foi o que apresentou maior crescimento do microrganismo;
- A concentração mínima observada de ação biocida do THPS frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 foi verificada como 100 mg/L para, após 15 minutos de exposição ao biocida nesta concentração, com redução mínima observada de 99,99% na população pelos dois tipos de ensaio de NMP. Adicionalmente, a inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 foi considerada completa na presença do THPS a 350 mg/L, quando utilizado o método do NMP em microplacas.
- Foi observada redução na população recuperada do microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 após ensaio com o biocida THPS, porém não foi possível confirmar um valor de concentração mínima inibitória do produto frente a este microrganismo, devido às questões relacionadas à incubação em alta temperatura com uso de gerador químico de anaerobiose.

- O biocida Glutaraldeído apresentou inibição frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, após 15 minutos de exposição às concentrações de 100 e 250 mg/L, quando aplicado o ensaio NMP em microplaca para verificação dos resultados;
- Não foi possível obter resultado de atividade antibacteriana do biocida Isotiazolona frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, nas condições utilizadas no ensaio de NMP em microplacas;
- Quando aplicado a amostras obtidas de ambiente da indústria petrolífera, o método de NMP em microplaca realizado em triplicata tal qual o NMP tradicional em frasco apresentou resultados comparáveis, com a vantagem de obtenção de maiores valores de redução na população bacteriana, devido à vantagem de quantificação em maiores diluições.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

ABDULINA, D.; KOVÁČ, J.; LUTYNSKA, G.; KUSHKEVYCH, I. ATP sulfurylase activity of sulfate-reducing bacteria from various ecotopes. **3 Biotech**, v. 10, n. 2, p. 1-9, Feb. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-019-2041-9>>. Acesso em 08 set. 2022.

AKYON, B.; LIPUS, D.; BIBBY, K. Glutaraldehyde inhibits biological treatment of organic additives in hydraulic fracturing produced water. **Science of The Total Environment**, v. 666, p. 1161–1168, May 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.056>>. Acesso em 08 set. 2022.

ALAMRI, A. H. Localized corrosion and mitigation approach of steel materials used in oil and gas pipelines – An overview. **Engineering Failure Analysis**, v. 116, p. 1-17, Oct. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2020.104735>>. Acesso em 08 set. 2022.

ALBUQUERQUE, A. C.; ANDRADE, C; NEVES, B. Biocorrosão – Da integridade do biofilme à Integridade do material. **Corrosão e Protecção de Materiais**, v. 33, ns. 1 e 2, p.18-23, Jan - Jun. 2014. Disponível em: <[https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros\\_Prot\\_Mater\\_Vol33\\_ns1\\_2\\_2014.pdf](https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros_Prot_Mater_Vol33_ns1_2_2014.pdf)>. Acesso em 08 set. 2022.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. E1259: Standard Test Method Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C. p. 6, 2016.

ARAÚJO, L.; CARVALHO, L.; REZNIK, L.; LUTTERBACH, M.; SÉRVULO, E. Efeito de biocidas na corrosão induzida microbiologicamente do aço duplex em água de produção de petróleo. **Corrosão e Protecção de materiais**, v. 32, n. 4, p.108-114, Out/Nov/Dez. 2013. Disponível em: <[https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros\\_Prot\\_Mater\\_Vol32\\_n4\\_2013.pdf](https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros_Prot_Mater_Vol32_n4_2013.pdf)>. Acesso em 08 set. 2022.

---

\* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 16445**: Tintas para construção civil – método para avaliação de desempenho de tintas para edificações não industriais – Detecção de bactérias redutoras de sulfato em tintas, vernizes e complementos. Rio de Janeiro, 2016. 7 p.

ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE. **TM0194-2014-SG**: Field monitoring of bacterial growth in oil and gas systems. Houston, 2014. 31 p.

ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I. A.; PUTRI, F. Z. Potential of biosurfactant as an alternative biocide to control biofilm associated biocorrosion. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 104-111, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3923/jest.2018.104.111>>. Acesso em 08 set. 2022.

AÜLLO, T.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; OLLIVIER, B.; MAGOT, M. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-12, Dec. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00362>>. Acesso em 08 set. 2022.

AZZAM, E.M.S; SAMI, R.M.; KANDILE, N. G. Activity inhibition of sulfate reducing bacteria using some thiol surfactants and their nanostructures. **American Journal of Biochemistry**, v.2, n.3, p. 29-35, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.5923/j.ajb.20120203.03>>. Acesso em 08 set. 2022.

BADAWI, A.M.; HEGAZY, M.A.; EL-SAWY, A.A.; AHMED, H.M.; KAMEL, W.M. Novel quaternary ammonium hydroxide cationic surfactants as corrosion inhibitors for carbon steel and as biocides for sulfate reducing bacteria (SRB). **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, n. 1, p. 458-465, Nov. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.06.066>>. Acesso em 08 set. 2022.

BARBOSA, L.P. **Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na biorremediação de efluentes ácidos contendo metais**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), 2009.

BARTLETT, K.; KRAMER, J. Comparative performance of industrial water treatment biocides. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Houston, 2011. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., p. 11399, 2011.



BARTON, L. L. **Sulfate-Reducing Bacteria**. New York: Plenum Press, 336p., 1995.

BASAFA, M.; HAWBOLDT, K. Reservoir souring: sulfur chemistry in offshore oil and gas reservoir fluids. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 9, p. 1105–1118, Aug. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13202-018-0528-2>>. Acesso em 08 set. 2022.

BAUMGARTNER, L. K. et al. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. **Sedimentary Geology**, v. 185, n. 3–4, p. 131–145, Mar. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2005.12.008>>. Acesso em 08 set. 2022.

BAUTISTA, L. F.; VARGAS, C.; GONZÁLEZ, N.; MOLINA, M. C.; SIMARRO, R.; SALMERÓN, A.; MURILLO, Y. Assessment of biocides and ultrasound treatment to avoid bacterial growth in diesel fuel. **Fuel Processing Technology**, v. 152, p. 56 – 63, Nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.06.002>>. Acesso em 08 set. 2022.

BECTON, DICKINSON AND COMPANY. Sistemas de Recipiente Produtor de Gás GasPak EZ. Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA, 2007. Disponível em <[https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8010412\(04\)\(0907\)\\_PT.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8010412(04)(0907)_PT.pdf)>. Acesso em: 24 abr. 2022.

BELKAID, S.; LADJOUZI, M. A.; HAMDANI, S. Effect of biofilm on naval steel corrosion in natural seawater. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, n. 3, p. 525–537, mar. de 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10008-010-1118-5>>. Acesso em 08 set. 2022.

BENNET, D.; HOFFMANN, H. Oilfield microbiology: molecular microbiology techniques used during a biocide evaluation. In: Offshore Technology Conference Asia, Kuala Lumpur, Malaysia, March 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.4043/28411-MS>>. Acesso em 08 set. 2022.

BHAGOBATY, R. K. Culture dependent methods for enumeration of sulphate reducing bacteria (SRB) in the Oil and Gas industry. **Reviews in Environmental Science and**

**Bio/Technology**, v. 13, p. 11-16, Jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11157-014-9331-9>>. Acesso em 08 set. 2022.

BOWMAN, E. et al. International Measures of Prevention, Application, and Economics of Corrosion Technologies (IMPACT) Study. 216p., 2016. Disponível em: <<http://impact.nace.org/documents/Nace-International-Report.pdf>>. Acesso em: 07/02/2022.

BRAMLETT, R.; PECK, H. Some physical and kinetic properties of adenylyl sulfate reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 8, p. 2979–2986, Apr. 1975. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41583-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41583-4)>. Acesso em 08. Set. 2022

BREWER, J.H.; ALLGEIER, D.L. Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. **Applied Microbiology**, vol. 14, n.6, p. 986-988, Nov. 1966. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/am.14.6.985-988.1966>>. Acesso em 08 set. 2022.

CARLSON, H. K. et al. Monofluorophosphate is a selective inhibitor of respiratory sulfate-reducing microorganisms. **Environmental Science & Technology**, vol. 49, n. 6, p. 3727-3736, Feb. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es505843z>>. Acesso em 08 set. 2022.

COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". **Biometrics**, v. 6, n. 2, p. 105-116, June 1950. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/3001491>>. Acesso em 08 set. 2022.

CORTÁS, L. de C. **Produção biogênica de sulfetos em amostras de água e óleo**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2011.

CORTÁS, L. de C.; CARREIRA, M.V.; COSTA, A.C.A. Biogenic production of sulfides in water-oil samples and its correlation with the deterioration of storage tanks. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v.6, n.3, p.115-131, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.5419/bjpg2012-0010>>. Acesso em 08 set. 2022.

COTE, C. et al. Corrosion of low carbon steel by microorganisms from the 'pigging' operation debris in water injection pipelines. **Bioelectrochemistry**, v. 97, p. 97–109, Jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.11.001>>. Acesso em 08 set. 2022.

COUTINHO, D.A. et al. Estudo Comparativo entre as Técnicas do Número Mais Provável e PCR em Tempo Real para Quantificação de BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato) em Amostras no Setor de Óleo e Gás. In: 5th International Corrosion Meeting – INTERCORR, Fortaleza, 2014. Disponível em: <[https://intercorr.com.br/anais/2014/INTERCORR2014\\_069.pdf](https://intercorr.com.br/anais/2014/INTERCORR2014_069.pdf)>. Acesso em 08 set. 2022.

CRISTIANI, P.; PERBONI, G. Antifouling strategies and corrosion control in cooling circuits. **Bioelectrochemistry**, v. 97, p. 120–126, June 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.01.002>>. Acesso em 08 set. 2022.

CYPIONKA, H. Characterization of sulfate transport in *Desulfovibrio dessulfuricans*. **Archives of Microbiology**, v.152, n.3, p. 237-243, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/bf00409657>>. Acesso em 08 set. 2022.

DALL'AGNOL, L.T.; CORDAS, C.M.; MOURA, J.J.G. Influence of respiratory substrate in carbon steel corrosion by a sulphate reducing prokaryote model organism. **Bioelectrochemistry**, v. 97, p. 43-51, June 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.10.006>>. Acesso em 08 set. 2022.

DAVIDOVA, I.; HICKS, M.S.; FEDORAK, P.M.; SUFLITA, J.M. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.27, n.1, p.80-86, Aug. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000166>>. Acesso em 08 set. 2022.

DOW CHEMICAL CONTROL. AQUICAR™ THPS 75 Water Treatment Microbiocide Antimicrobial for Industrial Water Treatment. 2009 Disponível em: <<http://www.bencide.co.kr/data/AQUICAR%20THPS.pdf>>. Acesso em 12 set. 2022.

DOWNWARD, B. L.; TALBOT, R. E.; HAACK, T. K. Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium Sulfate (THPS): A New industrial biocide with low environmental toxicity. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, New Orleans, 1997. p. 904, March 1997.

EL-SHERIK, A. M. **Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies: Production and Transmission**. Woodhead Publishing, 2017, 928 p.

ENNING, D.; GARRELFIS, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.02848-13>>. Acesso em 08 set. 2022.

ENNING, D.; SMITH, R.; STOLLE, J. Evaluating the efficacy of weekly THPS and glutaraldehyde batch treatment to control severe microbial corrosion in a simulated seawater injection system. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Vancouver, 2016. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., July 2016, p. 1542–1556.

GENTIL, V. Corrosão. 5ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007. 341p.

GIBSON, G.R. Physiology and Ecology of the Sulfate Reducing Bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, n.6, p. 769-797, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01575.x>>. Acesso em 08 set 2022.

GU, T. New understandings of biocorrosion mechanisms and their classifications. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 4, n.4, p.iii-vi, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.4172/1948-5948.1000e107>>. Acesso em 08 set 2022.

GU, T.; JIA, R.; UNSAL, T.; XU, D. Toward a better understanding of microbiologically influenced corrosion caused by sulfate reducing bacteria. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 35, n. 4, p. 631-636, April 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmst.2018.10.026>>. Acesso em 09 set 2022.

HARRIGAN, W.F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3<sup>rd</sup> Ed., San Diego, California, 1998.

HEGGENDORN, F. L. et al. Estudo da cinética de crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) orais e ambientais em condições aeróbias e anaeróbias. **Revista**

**Brasileira de Biociências**, v. 16, n.3, p. 81-86, Jul./Set. 2018. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3875>>. Acesso em: 21 abr. 2022.

HOU, B. et al. The cost of corrosion in China. **NPJ Materials Degradation**, v.1:4, 10 p., 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41529-017-0005-2>>. Acesso em 09 set. 2022.

JAVAHERDASHTI, R.; AKVAN, F. Microbiologically Influenced Corrosion (MIC). In: **Failure Modes, Effects and Causes of Microbiologically Influenced Corrosion. Advanced Perspectives and Analysis**, Elsevier, Cap. 3, p. 43-104, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818448-6.00003-X>>. Acesso em 09 set. 2022.

JAVED, M.A.; STODDART, P.R.; PALOMBO, E.A.; McARTHUR, S.L.; WADE, S.A. Inhibition or acceleration: bacterial test media can determine the course of microbiologically influenced corrosion. **Corrosion Science**, v. 86, p.149-158, Sep. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2014.05.003>>. Acesso em 09 set. 2022.

JESUS, E.B.; LIMA, L.R.P.A.; BERNARDEZ, L.A.; ALMEIDA, P.F. Inhibition of microbial sulfate reduction by molybdate. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**. v.9, n.3, p.95-106, 2015. Disponível em: <<https://doi:10.5419/bjpg2015-0010>>. Acesso em 09 set. 2022.

JIA, R.; LI, Y.; AL-MAHAMEDH, H. H.; GU, T. Enhanced biocide treatments with D-amino acid mixtures against a biofilm consortium from a water cooling tower. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-11, Aug. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01538>>. Acesso em 09 set. 2022.

JIA, R.; YANG, D.; RAHMAN, H.B.A.; GU, T. Laboratory testing of enhanced biocide mitigation of an oilfield biofilm and its microbiologically influenced corrosion of carbon steel in the presence of oilfield chemicals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 125, p.116-124, Nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.006>>. Acesso em 09 set. 2022.

JIA, R.; TAN, J.L.; JIN, P.; BLACKWOOD, D.J.; XU, D; GU, T. Effects of biogenic H<sub>2</sub>S on the microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by sulfate reducing *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. **Corrosion Science**, v. 130, p. 1-11, Jan. 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2017.10.023>>. Acesso em 09 set. 2022.

JIA, R. et al. Effects of ferrous ion concentration on microbiologically influenced corrosion of carbon steel by sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris*. **Corrosion Science**, v. 153, p. 127-137, June 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2019.03.038>>. Acesso em 09 set. 2022.

JONES, C. et al. A novel approach to using THPS for controlling reservoir souring. In: In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Houston, Texas, 2011. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., March 2011, paper NACE-11219.

JONES, C. et al. THPS: A review of the first 25 years, lessons learned, value created and visions for the future. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Salt Lake City, Utah, 2012. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., March 2012, paper NACE-2012-1505.

JURELEVICIUS, D. et al. Effect of nitrate injection on the bacterial community in a water-oil tank system analyzed by PCR-DGGE. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 251–255, Apr. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-007-0297-2>>. Acesso em 09 set. 2022.

KAHRILAS, G. A.; BLOTEVOGEL, J.; STEWART, P. S.; BORCH, T. Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 1, p. 16-32, Nov. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es503724k>>. Acesso em 09 set. 2022.

KAHRILAS, G. A.; BLOTEVOGEL, J.; CORRIN, E. R.; BORCH, T. Downhole transformation of the hydraulic fracturing fluid biocide glutaraldehyde: implications for flowback and produced water quality. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 20, p. 11414-11423, Sep. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02881>>. Acesso em 09 set. 2022.

KOTU, S. P.; MANNAN, M. S., JAYARAMAN, A. Emerging molecular techniques for studying microbial community composition and function in microbiologically influenced corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 144: 104722, 11p., Oct. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104722>>. Acesso em 09 set. 2022.

KRAMER, J. F. Biocide combinations for improved microbiological control. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Dallas, 2015. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., July 2015, p. 5589.

KUMARASWAMY, R. et al. Molecular- and cultivation-based analyses of microbial communities in oil field water and in microcosms amended with nitrate to control H<sub>2</sub>S production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 2027-2038, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2974-8>>. Acesso em 09 set. 2022.

LAVANIA; M.; SARMA, P. M.; MANDAL, A. K.; CHEEMA, S; LAL, B. Efficacy of natural biocide on control of microbial induced corrosion in oil pipelines mediated by *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. *Journal of Environmental Sciences*, v. 23, n. 8, p. 1394–1402, Aug. 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9)>. Acesso em 09 set. 2022.

LEE, M. H. P.; CAFFREY, S. M.; VOORDOUW, J. K.; VOORDOUW, G. Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1109–1118, July 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2596-1>>. Acesso em 09 set. 2022

LI, Y.; JIA, R.; AL-MAHAMEDH, H. H.; XU, D.; GU, T. Enhanced biocide mitigation of field biofilm consortia by a mixture of D-amino acids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-13, June 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01538>>. Acesso em 09 set. 2022.

LIMA, W. B. **Avaliação de metodologia para enumeração de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em amostras ambientais utilizando microplaca de 96 poços**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2006.

LIMA, E. S. de. **Biocorrosão: Sinergismo microbiano e influência nas características de corrosão e propriedades mecânicas do aço carbono 1010**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2011.

LIMA, L. R. **Quantificação de bactérias redutoras de sulfato, utilizando as técnicas de hibridização fluorescente in situ (FISH) e qPCR, em amostras de água produzida em poços de petróleo maduros.** 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, 2016.

MOORE, J.; KEASLER, V.; BENNETT, B. Compatibility of tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS) and ammonium bisulfite (ABS). In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, San Antonio, Texas, 2010. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., March 2010, paper NACE-10407.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, n. 6, p. 14., 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>>. Acesso em 09 set. 2002.

NAKAO, K. et al. Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* isolates from humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5308–5311, Dec. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AAC.00630-09>>. Acesso em 09 set. 2022.

NEUMANN, B. **Avaliação de nova metodologia para detecção de microrganismos redutores de sulfato (MRS) aplicada à indústria de petróleo e gás.** 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2012.

OGATA, H. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, n. 11, p. 1470–1472, nov. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.07.007>>. Acesso em 09 set. 2022.

OKORO, C. C. The Biocidal Efficacy of Chlorine Dioxide (ClO<sub>2</sub>) in the Control of Oil Field Reservoir Souring and Bio-corrosion in the Oil and Gas Industries. **Petroleum Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 170–177, jan. 2015. Disponível em <<http://doi.org/10.1080/10916466.2014.908913>>. Acesso em 09 set. 2022.



OKORO, C. C.; SAMUEL, O.; LIN, J. The effects of Tetrakis-hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS), nitrite and sodium chloride on methanogenesis and corrosion rates by methanogen populations of corroded pipelines. **Corrosion Science**, v. 112, p. 507-516, Nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2016.08.018>>. Acesso em 09 set. 2022.

OLIVEIRA, T. F. et al. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a dissimilatory DsrAB sulfite reductase in complex with DsrC. *Journal of Structural Biology*, v. 164, n. 2, p. 236–239, nov. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.07.007>>. Acesso em 09 set. 2022.

PAULA, M. S. de. **Avaliação da corrosão microbiológica do aço carbono 1020 em água do mar sintética na presença de bactérias redutoras de sulfato**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010.

POSTGATE, J.R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, England, 1984.

QUEIROZ, J. C. de. **Desenvolvimento de metodologias para a determinação da atividade biogênica de bactérias redutoras de sulfato**. 2015, 124 f. Tese (Doutorado em Química. Área de concentração: Química Ambiental) – Instituto de Química, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2015.

RAYMOND, J.; PARNELL, E.; FICHTER, J. Determining effective antimicrobial treatments for long-term protection of hydrocarbon reservoirs. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, San Antonio, 2014. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., Dec. 2014, p. 3879.

ROCHA, S. M. S. **Avaliação da utilização de nitrato por cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS) em efluente contendo sulfato**. 2006. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2006.

RODRIGUES, T. et al. Diversidade de microrganismos relacionados com a biocorrosão no sistema óleo e gás. **Corrosão e Protecção de materiais**, v. 32, n. 4, p.108-114, Out/Nov/Dez. 2013. Disponível em: <<https://www.lneg.pt/wp->

content/uploads/2020/01/Corros\_Prot\_Mater\_Vol32\_n4\_2013.pdf>. Acesso em 23 abr. 2022.

ROGERS, J. D. et al. Inhibition of biodegradation of hydraulic fracturing compounds by glutaraldehyde: groundwater column and microcosm experiments. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 17, p. 10251-10261, Aug. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02316>>. Acesso em 09 set. 2022.

SANT'ANNA, G. de S. **Monitoramento Microbiológico e físico-químico de tanques de armazenamento de óleo e água**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2009.

SEGUI, P. N. **Bioatenuação da geração de sulfeto, por meio da utilização de nitrato, em água produzida proveniente da extração de petróleo**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2009.

SHARMA, M. et al. Effect of long term application of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) in a light oil-producing oilfield. **Biofouling**, v. 34, n. 6, p. 605-617, Aug. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1476500>>. Acesso em 09 set. 2022.

SILVA, P. **Utilização de THPS e Xantana como estratégia para o controle da corrosão microbiologicamente induzida**. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2011.

SILVA, P. S. da. **Avaliação de biocidas no controle da corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono 1020 por bactérias redutoras de sulfato**. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, área de concentração: Bioprocessos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2015.

SILVA, P. et al. Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) with biopolymer as strategy for the control of microbiologically influenced corrosion in a dynamic system. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 160:

108272, 10 p., Mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108272>>. Acesso em 09 set. 2022.

STRUCHTEMEYER, C. G.; MORRISON, M. D.; ELSHAHED, M. S. A critical assessment of the efficacy of biocides used during the hydraulic fracturing process in shale natural gas wells. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 71, p. 15-21, July 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.013>>. Acesso em 09 set. 2022.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>>. Acesso em: 19 mai. 2022.

VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, n. 4, p. 259-270, June 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00053-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00053-7)>. Acesso em 09 set. 2022.

VIDELA, H. A. **Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais**. 1ª ed., 160 p., Editora Edgard Blücher LTDA., São Paulo, Brasil, 2003.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: Looking to the future. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 169–180, 2005.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L.K. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n.7, p. 896-900, Oct. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.002>>. Acesso em 09 set. 2022.

VIKRAM, A.; LIPUS, D.; BIBBY, K. Produced water exposure alters bacterial response to biocides. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 21, p. 13001-13009, Oct. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es5036915>>. Acesso em 09 set. 2022.

WANG, J. et al. Mitigation of sulfate reducing *Desulfovibrio ferrophilus* microbiologically influenced corrosion of X80 using THPS biocide enhanced by

Peptide A. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 107, p. 43-51, Apr. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmst.2021.07.039>>. Acesso em 09 set. 2022.

WEN, J.; ZHAO, K; GU, T.; RAAD, I.I. Chelators enhanced biocide inhibition of planktonic sulfate-reducing bacterial growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1053–1057, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0269-y>>. Acesso em 09 set. 2022.

WEN, J.; ZHAO, K; GU, T.; RAAD, I.I. A green biocide enhancer for the treatment of sulfate-reducing bacteria (SRB) biofilms on carbon steel surfaces using glutaraldehyde. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 1102-1106, Dec. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.007>>. Acesso em 09 set. 2022.

WENTWORTH, C. C.; SRIVASTAVA, A.; KRAMER, J. F. Comparative hydrothermal stability of biocides used in the oil and gas industry. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Vancouver, 2016. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., July 2016, p. 7671.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 456–467, Dec. 2013.

WIKIEŁ, A. J. et al. Impact of *Desulfovibrio alaskensis* biofilms on corrosion behaviour of carbon steel in marine environment. **Bioelectrochemistry**, v. 97, p. 52–60, Jun. 2014.

WILLIAMS, T. M. The mechanism of action of isothiazolone biocides. **PPChem**, v. 9, n. 1, p. 14–22, 2007.

WILLIAMS, T. M. Efficacy of isothiazolone biocide versus sulfate reducing bacteria (SRB). In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Atlanta, 2009. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., Sep. 2009, p. 9059.

WILLIAMS, T. M.; COOPER., L. E. The environmental fate of oil and gas biocides: a review. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, San Antonio, 2014 **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., Dec. 2014, p. 3876.

WILLIAMS, T. M.; SCHULTZ, C. M. Effect of environmental parameters on the stability and performance of oil and gas biocides. In: SPE International Symposium on Oilfield Chemistry, The Woodlands, April 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.2118/173782-MS>>. Acesso em 09 set. 2022.

WILLMON, J. THPS degradation in the long-term preservation of sub-sea flow-lines and risers. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, San Antonio, March 2010. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., July 2010, p. 10402.

XU, D.; JIA, R.; LI, Y.; GU, T. Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33:97, 10 p., Apr. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2203-4>>. Acesso em 09 set. 2022.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. D-Methionine as a biofilm dispersal signaling molecule enhanced tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate mitigation of *Desulfovibrio vulgaris* biofilm and biocorrosion pitting. **Materials and Corrosion**, v. 65, n. 8, p. 837-845, Aug. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/maco.201206894>>. Acesso em 09 set. 2022.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. A synergistic d-tyrosine and tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate biocide combination for the mitigation of an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3067–3074, June 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1116-0>>. Acesso em 09 set. 2022.

XU, D. et al. D-amino acids for the enhancement of a binary biocide cocktail consisting of THPS and EDDS against an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1641–1646, Dec. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0970-5>>. Acesso em 09 set. 2022.

XU, J. et al. Effects of d-Phenylalanine as a biocide enhancer of THPS against the microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 109-117, Jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmst.2018.09.011>>. Acesso em 09 set. 2022.

XU, L. et al. Inadequate dosing of THPS treatment increases microbially influenced corrosion of pipeline steel by inducing biofilm growth of *Desulfovibrio hontreensis* SY-21. **Bioelectrochemistry**, v. 145:108048, 10p., Jun. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108048>>. Acesso em 9 set. 2022.

ZAKY, M.; NEGM, N. Antimicrobial and surface activities of phosphate Schiff bases. **Chimica Oggi/Chemistry Today**, v. 30, n. 4, p. 46–49, 2012

ZAMORA, A. C.; MALAVER, N. Methodological aspects for the culture and quantification of heterotrophic sulfate-reducing bacteria. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 32, n. 2, p. 121-125, May 2012. Disponível em: <[http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_vm/article/download/4811/4622](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/download/4811/4622)>. Acesso em 24 abr. 2022.

ZARASVAND, K. A.; RAI, V. R. Microorganisms: induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p.66–74, Feb. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.023>>. Acesso em 09 set. 2022.

ZHAO, K. et al. Mechanistic modeling of anaerobic thps degradation in seawater under various conditions. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, New Orleans, Louisiana, 2008. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., March 2008, paper NACE-08512.

## 8 APÊNDICE

### Trabalhos Apresentados em Congressos

#### INTERCORR 2018

Título do trabalho: **Estudos de atividade antimicrobiana de produtos químicos de acordo com sua finalidade de uso, com enfoque na inibição de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).**


Data de início: **14 / 05 / 2018**

Fim: **18 / 05 / 2018**

Publicado na (revista, jornal, etc.) **Anais do Congresso (sítio eletrônico), 2018.**

Cidade: São Paulo Estado: SP

País: Brasil

 <p style="text-align: right;">INTERCORR2018_167</p>	<p style="text-align: right;">INTERCORR2018_167</p>
<p>Copyright 2018, ABRACO Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2018, em São Paulo, no mês de maio de 2018. As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).</p> <p><b>Estudos de atividade antimicrobiana de produtos químicos de acordo com sua finalidade de uso, com enfoque na inibição de Bactérias Redutoras de Sulfato (m-BRS).</b> Henrique M. Simon<sup>a</sup>, Caroline F. da Silva<sup>b</sup>, Antônio F. Montemor<sup>c</sup>, Jonas G. dos Santos<sup>d</sup>, Maria F. de A. Rodrigues<sup>e</sup>.</p> <p><b>Abstract</b></p> <p>Two chemical products intended for the prevention of biocorrosion in industrial environments of the petroleum sector were evaluated through antimicrobial activity tests against Sulphate Reducing Bacteria (SRB), frequently involved in biocorrosion events. For a product based on silver nanoparticles, identified as "Product 01", the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by formation of inhibition halo against two SRB strains was used, whereas for a liquid preservative product, identified as "Product 02", a challenge test for a serie of concentrations of the respective product against a culture of SRB in liquid culture medium was used. For Product 01, inhibition halo was observed against the two strains evaluated, with a minimum activity value of 1,0 g/L against strain IPT 504, and 3,0 g/L against the bacterium <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998. For Product 02, all concentrations tested showed inhibitory activity against the bacterium <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998. The results confirm the potential of applying these methodologies for the evaluation of products indicated for the prevention of biocorrosion processes in the petroleum industry.</p> <p><b>Keywords:</b> antimicrobial activity, biocorrosion, SRB, MIC.</p> <p><b>Resumo</b></p> <p>Foram avaliados dois produtos químicos pretendidos para uso na prevenção da biocorrosão em ambientes industriais do setor petrolífero, através de ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana frente a Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), frequentemente envolvidas em eventos de biocorrosão. Para um produto a base de nanopartículas de Prata, identificado como "Produto 01", foi utilizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela formação de halo de inibição frente a duas linhagens de BRS, enquanto que para um produto conservante líquido, identificado como "Produto 02", foi utilizado um teste desafio para uma série de concentrações do respectivo produto frente a uma cultura de m-BRS em meio de cultura líquido. Para o Produto 01, obteve-se halo de inibição frente às duas linhagens avaliadas, com a obtenção de valor mínimo de atividade em 1,0 g/L frente à bactéria IPT 504, e em 3,0 g/L frente à bactéria <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998. Para o Produto 02, todas as concentrações testadas apresentaram atividade inibitória frente à bactéria <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998. Os resultados comprovam o potencial de</p> <p><sup>a</sup> Pesquisador Assistente – Instituto de Pesquisas Tecnológicas <sup>b</sup> Estagiária Técnica em Análises Químicas – Instituto de Pesquisas Tecnológicas <sup>c</sup> Técnico Especializado – Instituto de Pesquisas Tecnológicas <sup>d</sup> Técnico Especializado – Instituto de Pesquisas Tecnológicas <sup>e</sup> Doutora, Pesquisadora – Instituto de Pesquisas Tecnológicas</p>	<p>aplicação destas metodologias para a avaliação de produtos indicados para a prevenção de processos de biocorrosão na indústria do petróleo.</p> <p><b>Palavras-chave:</b> atividade antimicrobiana, biocorrosão, BRS, CIM.</p> <p><b>Introdução</b></p> <p>A indústria do petróleo, em suas atividades de extração, processamento, distribuição e armazenamento, apresenta frequentes e graves problemas devido à biocorrosão provocada pelos microrganismos provenientes dos ambientes onde se localizam reservas de petróleo, bem como o entorno de estruturas construídas para a execução das atividades relacionadas. Destacam-se neste processo as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), microrganismos dotados de metabolismo anaeróbio que utilizam o ion Sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) como aceptor de elétrons para sua cadeia respiratória, promovendo a redução este composto a Sulfeto (S<sup>2-</sup>), que se converte a Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) como descrito por Postgate (1). Este composto é um gás tóxico e corrosivo que atua favorecendo o processo de corrosão localizada ("pitting") sob os biofilmes estabelecidos junto à superfície de dutos e tanques de armazenamento utilizados na indústria petrolífera.</p> <p>O controle e mitigação de eventos biocorrosivos possuem como finalidade melhorar a qualidade econômica do petróleo extraído, bem como diminuir a probabilidade de ocorrência de eventos na cadeia de transporte e distribuição de petróleo até as refinarias, evitando assim impactos e atrasos no cronograma de atividades das refinarias. Estes objetivos podem ser alcançados com a aplicação de produtos químicos que atuem como inibidores microbianos ou mesmo biocidas frente a microrganismos presentes nos biofilmes estabelecidos.</p> <p>O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de 02 produtos comerciais frente a 2 microrganismos do grupo BRS, com a execução de ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) com medida do halo de inibição, e de teste desafio de uma série de concentrações de um produto em contato com cultura de um microrganismo de referência para o grupo BRS.</p> <p><b>Metodologia</b></p> <p>Os ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana foram conduzidos com 02 produtos distintos: um produto a base de nanopartículas de Prata em pó, identificado como "Produto 01", cuja utilização é pretendida como aditivo de tintas para aplicação em tanques de armazenamento de combustíveis; e um produto conservante líquido, identificado como "Produto 02", utilizado como preservante de formulações elaboradas para formação de estruturas de concreto.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Microrganismos utilizados:</b> (i) linhagem mesófila não identificada de m-BRS, isolada a partir de amostra de campo, depositada no Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT sob o código "IPT 504". (ii) linhagem de referência <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998.</li> <li>• <b>Meios de cultura utilizados:</b> (i) Meio sólido DA modificado para crescimento de microrganismos anaeróbios, adaptado da metodologia descrita por Nakao et al (2). (ii) Meio semi-sólido "Postgate E" modificado.</li> </ul> <p style="text-align: right;">- 2 -</p>

INTERCORR2018\_167

O Produto 01 foi avaliado no ensaio de determinação de CIM por halo de inibição, planejado a partir de metodologia descrita por Zaky e Nagma (3). Uma série de soluções de trabalho do Produto foi obtida, nas seguintes concentrações: 0,1g/L, 0,2 g/L, 0,3 g/L, 0,4 g/L, 0,5 g/L, 1,0 g/L, 2,5 g/L e 3,0 g/L. O meio DA modificado foi inoculado com as 02 linhagens separadamente, ao qual o volume de 1,0 mL de cada suspensão aquosa do Produto nas concentrações informadas foi aplicado por gotejamento sobre a superfície do meio de cultura. As placas de teste foram incubadas sob condições adequadas, descritas a seguir, em triplicata: (i) 37 °C durante 10 dias em ambiente de anaerobiose (microrganismo IPT 504); (ii) 50 °C durante 10 dias em ambiente de anaerobiose (microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998), com posterior leitura dos resultados obtidos (observação de halos de inibição produzidos).

O Produto 02 foi avaliado no ensaio de determinação de CIM por teste de desafio. Uma série de soluções de trabalho do Produto foi obtida, e 1,0 mL de cada solução foi adicionado ao seu respectivo frasco com meio de cultura Postgate E modificado, de modo que as concentrações finais do produto fossem as seguintes: 1,0 mL/L, 2,0 mL/L, 4,0 mL/L, 5,0 mL/L, 7,0 mL/L, 8,0 mL/L e 10,0 mL/L. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do inóculo de *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 (cultivo prévio de 10 dias obtido em Postgate E modificado) em todos os frascos preparados, e posteriormente incubados em quintuplicata para cada concentração testada por 28 dias a 50°C, com leituras registradas a cada 7 dias a contar do início do ensaio. Para fins de controle, paralelamente, foram incubados frascos controle positivo (meio + inóculo) e controle negativo (meio + produto na concentração avaliada), nas mesmas condições dos frascos do Teste.

**Resultados e discussão**

Biocidas são produtos nos quais a indústria petrolífera tem feito grande investimento para poder combater problemas decorrentes da corrosão influenciada por microrganismos, atuando com base na supressão das atividades metabólicas das espécies microbianas, bem como a supressão de seu crescimento. A escolha dos produtos mais adequados para este controle, então, deve considerar alguns critérios tais como: concentração de aplicação, compatibilidade com o sistema operacional e tempo de aplicação, como estabelecido por Araújo et al. (4). Os agentes químicos mais utilizados incluem compostos oxidantes, tais como halogênicos e Ozônio, e os compostos não-oxidantes, tradicionalmente utilizados como conservantes, tais como formaldeído, glutaraldeído, isotiazóis e compostos quaternários de Amônio, como listado por Videla e Herrera (5). Os principais desafios no uso de biocidas consistem em alcançar a região sob o biofilme aderido às superfícies das instalações aonde o processo de biocorrosão ocorre, pois estes produtos geralmente são menos efetivos contra organismos sésseis, quando comparados frente a populações planctônicas, devido a resistência apresentada pelos microrganismos quando presentes na estrutura do biofilme. Desta maneira, maiores concentrações de biocidas são usadas para compensar este fenômeno de resistência, porém essa ação causa impactos ambientais, uma vez que muitos destes produtos são tóxicos, já destacado por Zuo (6).

O delineamento das metodologias utilizadas nos ensaios foi realizado considerando os critérios citados em conjunto com as propriedades físico-químicas dos produtos avaliados, incluindo também a forma de aplicação dos mesmos junto aos meios de cultura propostos no planejamento experimental, de acordo com a finalidade pretendida para cada um dos produtos.

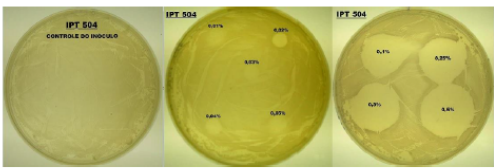
- 3 -

INTERCORR2018\_167

Os resultados obtidos de formação de halo de inibição com as suspensões do Produto 01 frente à linhagem m-BRS "IPT 504" e frente a *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 estão demonstrados na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

**Tabela 1 – Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana do Produto 01 frente à linhagem IPT 504.**

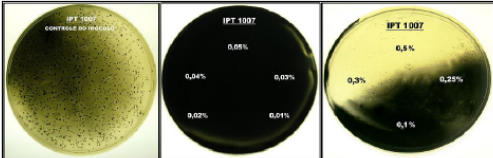
Concentração das suspensões do Produto (g/L)	Halo de Inibição (em mm)
0,1	Não Detectado
0,2	13,50
0,3	13,01
0,4	13,67
0,5	10,54
1,0	32,10
2,5	43,05
3,0	43,76
5,0	49,70



**Figura 1 – Avaliação de atividade antimicrobiana para as suspensões do produto 01 frente ao microrganismo IPT 504 em meio DA modificado.**

- 4 -

INTERCORR2018\_167



**Figura 2 – Avaliação de atividade antimicrobiana para as suspensões do Produto 01 frente ao microrganismo IPT 1007 em meio DA modificado.**

Os resultados obtidos para o Produto 01 frente ao microrganismo IPT 504 apresentam inibição a partir da concentração de 1,0 g/L, que se mantém na mesma magnitude até a maior concentração avaliada (5,0 g/L). Para o microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998, os resultados obtidos não permitiram visualizar a formação de halo de inibição para as suspensões do Produto 01. Porém, foi possível observar o não crescimento de colônias nas regiões correspondentes à aplicação das concentrações de 3,0 g/L e 5,0 g/L, indicando ação antimicrobiana do produto.

Uma das vantagens da aplicação deste ensaio é a possibilidade de avaliar o efeito inibitório de biocidas em superfície, fator este que se aproxima com a forma de corrosão ocasionada pelas BRS, já que suas colônias se situam na interface biofilme/superfície metálica. Porém, maiores estudos devem ser conduzidos considerando o cultivo de consórcios microbianos em meios sólidos, como forma de simular o estabelecimento de biofilmes corrosivos.

Os resultados obtidos para o teste desafio com a série de soluções do Produto 02 em concentrações distintas para a linhagem de *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 estão demonstrados na Tabela 2 e na Figura 3.

**Tabela 2 – Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana do Produto 02 frente ao microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. (ND = Não detectado)**

Ensaio CIM	Leituras para verificação do crescimento (dias)			
	7	14	21	28
Concentração do produto (mL/L)				
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND

- 5 -

INTERCORR2018\_167



**Figura 3 – Teste de desafio por CIM para o Produto 02 frente ao microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 em meio Postgate E modificado. (1º frasco: controle positivo; 2º frasco: controle negativo; 3º ao 7º frasco: teste em quintuplicata)**

Foi confirmada a presença do microrganismo *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 após 28 dias de ensaio, com a turvação do meio e precipitado negro no controle positivo. O controle negativo demonstrou que não ocorreram alterações visuais significativas com a adição do Produto 02 no meio de cultura utilizado. A inibição do microrganismo pelo Produto 02 foi observada em todas as concentrações testadas, sendo o resultado da menor concentração utilizada (1,0 mL/L) visualizado na figura 3, observado pela inibição da formação de precipitado negro nos frascos inoculados. A faixa de concentrações utilizada neste ensaio leva em conta a aplicação pretendida para o produto (preservante bacteriológico de concreto), aonde se considera o volume de solução aplicado em relação ao peso total de argamassa.

Deve-se levar em conta que o efeito inibitório do Produto 02 não necessariamente esteja atribuído à ação direta do Produto sobre o microrganismo, considerando que os componentes do meio utilizado podem ter interagido com o produto. Os resultados obtidos neste ensaio não significam necessariamente que os 02 produtos avaliados possam ser considerados inibitórios sob outras condições de cultivo e incubação.

**Conclusões**

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível obter subsídios para o delineamento de novos experimentos a serem realizados para avaliação de diferentes produtos indicados para aplicação na prevenção de processos de biocorrosão na indústria do petróleo. A metodologia de determinação de CIM pela medida de halo em meio DA modificado, aplicada ao Produto 01, mostrou-se promissora para esta finalidade, com a vantagem de obtenção dos resultados em menor tempo de incubação quando comparada ao cultivo tradicional de 28 dias.

- 6 -



No entanto, esta metodologia é limitada a produtos que possam se difundir no ágar do meio de cultura. A metodologia aplicada para o Produto 02 (desafio em meio líquido) tem a vantagem de ser aplicada para qualquer produto, no entanto sua aplicação como produtos a serem usados frente às BRS ainda necessita de ensaios complementares, tais como a avaliação do seu uso em condições de cultivo dinâmicas, como biorreatores ou sistemas simuladores de transporte.

#### Referências bibliográficas

- (1) POSTGATE, J.R. *The sulphate-reducing bacteria*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1984, 208 p.
- (2) NAKAO, K.; TANAKA, K.; ICHIISHI, S.; MIKAMO, H.; SHIBATA, T.; WATANABE, K. Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* Isolates from Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington D.C., v. 53, n. 12, p. 5308–5311, Dec. 2009.
- (3) ZAKY, M.; NEGM, N. Antimicrobial and surface activities of Phosphate Schiff bases. *Chimica oggi/Chemistry Today*. Milão, v. 30, n. 3, p. 10-13, May/June 2012.
- (4) ARAÚJO, L.; CARVALHO, L.; REZNIK, L.; LUTTERBACH, M.; SÉRVULO, E. Efeito de biocidas na corrosão induzida microbiologicamente do aço duplex em água de produção de petróleo. *Corrosão & Proteção de Materiais*. Lisboa, v. 32, n. 4, p. 108-114, Out./Nov./Dez. 2013.
- (5) VIDELA, H. A.; HERRERA, L.K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology Madrid*, v. 8, p. 169-180, 2005.
- (6) ZUO, R. Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Münster, v.76, p.1245-1254, Aug. 2007.

\* \* \*

## INTERCORR 2021

Título do trabalho: **Evaluation of the efficiency of biocidal products for the Oil and Gas industry by using microscale cultivations**

Data de início: **20 / 07 / 2021** Fim: **23 / 07 / 2021**

Publicado na (revista, jornal, etc.) **Anais do Congresso (sítio eletrônico), 2021.**

Cidade: São Paulo Estado: SP País: Brasil

21 <sup>st</sup> ICC Congress	INTERCORR CORROSION CONGRESS 2021	THE WORLD CORROSION CONGRESS																		
ICC INTERCORR WCO 2021_251																				
<p>Copyright 2021, ICC &amp; ABRACO The work presented during 21<sup>st</sup> INTERNATIONAL CORROSION CONGRESS &amp; 8<sup>th</sup> INTERNATIONAL CORROSION MEETING in the month of July of 2021. The information and opinions contained in this work are of the exclusive right of the author(s).</p>																				
<p>Poster <input checked="" type="checkbox"/> Oral <input type="checkbox"/></p>																				
<p><b>Evaluation of the efficiency of biocidal products for the Oil and Gas industry by using microscale cultivations</b> Simon, H. M.<sup>a</sup>, Rodrigues, M. F. A.<sup>a</sup>, Silva, W. C.<sup>b</sup>, Rodrigues, A. A. P.<sup>a</sup></p>																				
<p><b>Abstract</b> In the Oil &amp; Gas industry, Microbiological monitoring of the efficiency of treatments with biocides uses methods based on the response of cultivation in appropriate media, in order to confirm the inactivation of common species in this environment. These cultivation-dependent procedures are limited by the long incubation time required to obtain reliable results, since species such as Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) have a slow metabolism when inoculated in the standardized cultivation conditions for quantification by the Most Probable Number (MPN) technique. Considering the monitoring difficulty resulted by the limitation imposed by long test times, a method for evaluation of biocidal efficiency was carried out to the chemical product THPS, aiming the reduction of incubation time with an alternative culture medium and also the optimization of the physical space for incubation, by miniaturization in 96-well microplates. Tests carried out with the strain <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 allowed reduction of time to obtain inoculum and decrease in samples with the biocide evaluated, however it was not possible to quantify the bacterial susceptibility observed to each concentration. Further assays are planned to adjust the parameters of the applied method.</p>																				
<p><b>Keywords:</b> biocidal efficiency, SRB, microplate, THPS.</p>																				
<p><b>Introduction</b> In Oil &amp; Gas industry, microbiological monitoring of treatment with biocides uses methods based on the cultivation in appropriate media, in order to confirm inactivation of common species in this environment [1]. These cultivation-dependent procedures are limited by the long incubation time required to obtain reliable results, since species such as Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) present slow metabolism when inoculated in medium for quantification by Most Probable Number (MPN) technique [2]. Considering the monitoring difficulty as result of limitation imposed by long test times, a method for evaluation of biocidal efficiency by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was carried out to the chemical product Tetra-hydroxymethylphosphonium sulfate (THPS), aiming the reduction of incubation time and use of an alternative culture medium to recover viable bacteria after treatment and also the optimization of the physical space required for incubation, by scale miniaturization in 96-well microplates, based on previous works [3,4,5].</p>																				
<p><b>Methodology</b> The experimental procedure was planned considering the following parameters:</p>																				
<p><sup>a</sup> Graduate, Assistant Researcher – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). <sup>b</sup> Researcher, Ph.D. - Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). <sup>c</sup> Graduate, Researcher – Fundação de Apoio ao IPT (FIPT). <sup>d</sup> Graduate, Pharmacist – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).</p>																				
<p>21<sup>st</sup> ICC Congress</p>																				
<p>INTERCORR CORROSION CONGRESS 2021</p>																				
<p>THE WORLD CORROSION CONGRESS</p>																				
<p>ICC INTERCORR WCO 2021_251</p>																				
<p>Copyright 2021, ICC &amp; ABRACO The work presented during 21<sup>st</sup> INTERNATIONAL CORROSION CONGRESS &amp; 8<sup>th</sup> INTERNATIONAL CORROSION MEETING in the month of July of 2021. The information and opinions contained in this work are of the exclusive right of the author(s).</p>																				
<p>- Reference strain: <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577, purchased from American Type Culture Collection (ATCC.org). [6]</p>																				
<p>- Culture medium: "DA medium" [7], described on Table 1 and it was prepared with modifications in our laboratory.</p>																				
<p>Table 1 – Culture medium composition</p>																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">"DA Modified" Culture Medium</th> </tr> <tr> <th>Ingredient</th> <th>g/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Polypeptone</td> <td>15.0</td> </tr> <tr> <td>Peptone</td> <td>7.5</td> </tr> <tr> <td>Meat Extract</td> <td>7.5</td> </tr> <tr> <td>Yeast Extract</td> <td>7.5</td> </tr> <tr> <td>Ammonium Ferric Citrate, Green</td> <td>0.75</td> </tr> <tr> <td>L-Cysteine hydrochloride monohydrate</td> <td>0.75</td> </tr> <tr> <td>Agar</td> <td>1.9</td> </tr> </tbody> </table>			"DA Modified" Culture Medium		Ingredient	g/L	Polypeptone	15.0	Peptone	7.5	Meat Extract	7.5	Yeast Extract	7.5	Ammonium Ferric Citrate, Green	0.75	L-Cysteine hydrochloride monohydrate	0.75	Agar	1.9
"DA Modified" Culture Medium																				
Ingredient	g/L																			
Polypeptone	15.0																			
Peptone	7.5																			
Meat Extract	7.5																			
Yeast Extract	7.5																			
Ammonium Ferric Citrate, Green	0.75																			
L-Cysteine hydrochloride monohydrate	0.75																			
Agar	1.9																			
<p>- Biocide: THPS (Sigma®), evaluated at the following concentrations (v/v): 0.001%, 0.0025%, 0.005%, 0.010% and 0.025%, in saline solution (0.85% NaCl solution, w/v).</p>																				
<p>- Exposure Time: 15 minutes.</p>																				
<p>- Recovery cultivation in new batch of DA modified medium with incubation at 30 °C until 3 days, under anaerobe conditions using Gaspak® EZ generating gas system in jars [8].</p>																				
<p>The quantification of microorganisms was performed by MPN technique in microscale using 96-well microplates. 0.1 mL aliquots of prepared inoculum were added to 9.0 mL of culture medium, in 10 mL-flasks. 1.0 mL of each test solution was added in triplicate to the flasks, obtaining the concentrations previously described.</p>																				
<p><b>Conclusions</b> Table 2 presents the results obtained to the MIC assay performed at the conditions described. The results show that the proposed method allowed obtaining growth response time shorter than the standardized condition with use of traditional culture media "Postgate E".</p>																				
<p><sup>a</sup> Graduate, Assistant Researcher – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). <sup>b</sup> Researcher, Ph.D. - Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). <sup>c</sup> Graduate, Researcher – Fundação de Apoio ao IPT (FIPT). <sup>d</sup> Graduate, Pharmacist – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).</p>																				

Copyright 2021, ICC &amp; ABRACO

The work presented during 21<sup>st</sup> INTERNATIONAL CORROSION CONGRESS & 8<sup>th</sup> INTERNATIONAL CORROSION MEETING in the month of July of 2021.

The information and opinions contained in this work are of the exclusive right of the author(s).

Table 2 – Results of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using the microscale assay

Concentration of THFS	Recovery Cultivation obtained (3-day incubation) (MPN/mL)
0% (control)	$> 9.3 \times 10^8$
0.001%	$9.3 \times 10^7$
0.0025%	$9.3 \times 10^7$
0.005%	$9.3 \times 10^7$
0.010%	$> 9.3 \times 10^8$
0.025%	$9.6 \times 10^7$

The DA modified medium was satisfactory for growth of the reference strain, reaching values greater than  $10^8$  MPN/mL. The composition of the medium was modified considering the dilution in anaerobic flasks and posterior addition on the microplate wells, with reduction of the agar concentration in order to achieve a proper semisolid state, promoting the distribution of bacteria and improving the estimation by MPN [9].

The results obtained indicate a minor decrease in most samples with the biocide compared to the control, in an assay using microscale cultivation and with generating gas system. However, it was not evidenced difference of bacterial susceptibility between the concentrations evaluated. New tests are being planned using other product concentrations and future tests will be carried out to adjust the methodology on a microscale.

The microscale tests are attractive since they allow saving of time, labor and material. The results bring good perspectives for future work related to the screening of biocides against SRB, but further assays for confirmation are needed.

## References

- [1] NATIONAL ASSOCIATION OF CORROSION ENGINEERS. NACE TM0194-2014: Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems. Houston: 2014.
- [2] POSTGATE, J.R. The sulphate-reducing bacteria. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1984, 208 p.
- [3] LIMA, Wagner Bissa. Emuneração de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em amostras ambientais utilizando microplacas de 96 poços. 104 p., Master's thesis (Environmental Engineering Post-Graduate Program), Technological Center of the Federal University of Espírito Santo, Vitória, 2006.
- [4] NEUMANN, Bruna. Avaliação de nova metodologia para detecção de Microrganismos Redutores de Sulfato (MRS) aplicada à indústria de Óleo e Gás. 127 p., Masters thesis

<sup>1</sup> Graduate, Assistant Researcher – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).<sup>2</sup> Researcher, Ph.D. - Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).<sup>3</sup> Graduate, Researcher – Fundação de Apoio ao IPT (FIPT).<sup>4</sup> Graduate, Pharmacist – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).

Copyright 2021, ICC &amp; ABRACO

The work presented during 21<sup>st</sup> INTERNATIONAL CORROSION CONGRESS & 8<sup>th</sup> INTERNATIONAL CORROSION MEETING in the month of July of 2021.

The information and opinions contained in this work are of the exclusive right of the author(s).

(Environmental Engineering Post-Graduate Program), Technological Center of the Federal University of Espírito Santo, Vitória, 2012.

- [5] ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I. A.; PUTRI, F. Z. Potential of Biosurfactant as an Alternative Biocide to Control Biofilm Associated Biocorrosion. Journal of Environmental Science and Technology. V. 11, n. 2 (2018), pp. 104-111.

- [6] FICHTER, J.; JANES, C.; SUMMER, E. J. Identification of Microbiocides that Mitigate a Broad Spectrum of Problematic Microorganisms. CORROSION 2018. Document ID: NACE-2018-11484.

- [7] NAKAO, K.; TANAKA, K.; ICHISHI, S.; MIKAMO, H.; SHIBATA, T.; WATANABE, K. Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* Isolates from Humans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, n. 12 (2009), p. 5308-5311.

- [8] [https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8010412\(04\)\(0907\)\\_PT.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8010412(04)(0907)_PT.pdf) Access at: July 2<sup>nd</sup> 2021.

- [9] COCHRAN, W. G. Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number". Biometrics, V. 6, n. 2 (1950), pp. 105-116.

<sup>1</sup> Graduate, Assistant Researcher – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).<sup>2</sup> Researcher, Ph.D. - Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).<sup>3</sup> Graduate, Researcher – Fundação de Apoio ao IPT (FIPT).<sup>4</sup> Graduate, Pharmacist – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).