

BRUNA ALMEIDA LEÃO

**AGENTES INIBIDORES DA ATIVIDADE METABÓLICA E DO PROCESSO DE
ADESÃO DE *Desulfotomaculum nigrificans* EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

BRUNA ALMEIDA LEÃO

**AGENTES INIBIDORES DA ATIVIDADE METABÓLICA E DO PROCESSO DE
ADESÃO DE *Desulfotomaculum nigrificans* EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de Julho de 2009.

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Coorientador)

Prof. Nélio José de Andrade
(Coorientador)

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional, pela saúde e por permanecer ao meu lado em todos os lugares e situações, especialmente nos momentos mais difíceis dessa jornada, dando-me força para vencer.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela excelente formação e pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, meu orientador, pela oportunidade, apoio e pelos ensinamentos transmitidos, que foram fundamentais para a transposição desta etapa na minha vida.

Às professoras Andréa Barros Ribon e Elza Fernandes de Araújo, cujos valiosos ensinamentos durante a graduação foram essenciais para minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Antônio Galvão do Nascimento, pelas sugestões neste trabalho, pelos conselhos e ensinamentos desde meu ingresso no Departamento de Microbiologia.

Ao professor Nélio José de Andrade pelas sugestões neste trabalho e pela disponibilidade em ajudar, sempre que solicitado.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Maria Cristina Dantas Vanetti, pelos ensinamentos e pela participação na banca de defesa da dissertação.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelas sugestões e por disponibilizar o uso do laboratório sempre que necessário.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos que contribuíram, direta ou indiretamente, para minha formação profissional e para a conclusão deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial Paulo Rosa, Danilo, Evandro e Toninho pela amizade, carinho e pelos agradáveis e inesquecíveis momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA): Nívea, Patrícia Leal, Péricles, Aline Leal, Adriano, Ivan, Guilherme, Aline e Marcela pela amizade, ajuda na realização dos experimentos e pelos bons momentos de convivência.

À querida Adélia, pela amizade e ajuda durante a execução dos experimentos.

À Marina, pelos ensinamentos e pela grande ajuda nas análises estatísticas.

Aos companheiros de sempre: Alexandra, Guilherme, Priscila, Fabíola, Thiago, Juliana, Marliane e Zé Maria, pela amizade e carinho.

Ao meu namorado Tiago, pela compreensão, carinho e pelo apoio em todos os momentos.

À Tauana e Lecimar pela compreensão, amizade e pela agradável convivência.

Aos meus amigos e parentes, que mesmo de longe torceram para que essa conquista se concretizasse.

Ao paizinho, mãezinha, minhas queridas irmãs Sabrina e Cinthia, pelos conselhos, orações, pelo amor incondicional e por torcerem por mim em todas as etapas da minha vida.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

Bruna Almeida Leão, filha de Oswaldo Silva de Almeida e Rosemeire Ribeiro de Almeida, nasceu no dia 03 de julho de 1982, em Governador Valadares, Minas Gerais.

Em março de 2002 iniciou o curso de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em março de 2007.

Em março de 2007, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.EXTRAÇÃO DO PETRÓLEO	3
1.2. BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	5
1.3. INIBIDORES DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	8
1.4. BIOFILMES.....	14
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

CAPÍTULO 2. EFEITO DO BIOSURFACTANTE RAMNOLIPÍDEO, DO BIOCIDA THPS E DO INIBIDOR METABÓLICO MOLIBDATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE METABÓLICA DE *Desulfotomaculum nigrificans*

2.1. INTRODUÇÃO.....	29
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.2.1. Microrganismo	31
2.2.2. Condições de Cultivo	31
2.2.3.Compostos Inibidores	32
2.2.4. Determinação da Concentração de Sulfato	32
2.2.5. Estimativa do Número de Células Viáveis ..	33
2.2.6. Planejamento Estatístico	34
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.3.1. Curva de Crescimento de <i>D. nigrificans</i>	36
2.3.2. Efeito dos Compostos Sobre a Concentração de Células Viáveis de <i>D. nigrificans</i>	37
2.3.3. Efeito dos Compostos Sobre a Atividade de Redução do Sulfato por <i>D. nigrificans</i>	40
2.4. CONCLUSÕES.....	44
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPÍTULO 3. EFEITO DO BIOSSURFACTANTE RAMNOLIPÍDEO, DO BIOCIDA THPS E DO INIBIDOR METABÓLICO MOLIBDATO DE SÓDIO SOBRE A ADESÃO DE *Desulfotomaculum nigrificans* A CUPONS DE AÇO INOXIDÁVEL

3.1. INTRODUÇÃO	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.2.1. Condições de Cultivo.....	50
3.2.2. Preparo dos Cupons de Aço Inoxidável	51
3.2.3. Processamento de Amostras para Contagem de Células.....	51
3.2.4. Quantificação de Células Aderidas.....	51
3.2.5. Planejamento Estatístico	52
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.3.1. Observações Microscópicas da Adesão de <i>D. nigrificans</i> a Cupons de Aço Inoxidável.....	54
3.3.2. Efeito dos Compostos Sobre a Adesão de <i>D. nigrificans</i> a Cupons de Aço Inoxidável.....	56
3.4. CONCLUSÕES.....	67
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIações

AFS	adenosina 5'-fosfosulfato
AHSL	acil homoserina lactona
AISI	American Iron and Steel Institute
ASTM	American Society of Testing and Material
BOS-RN	bactérias oxidantes de sulfeto e redutoras de nitrato ou nitrito
BRS	bactérias redutoras de sulfato
CIM	corrosão influenciada por microrganismos
CMC	concentração micelar crítica
DCCR	delineamento composto central rotacional
DMC	diluição micelar crítica
FAFS	fosfoadenosina 5'-fosfosulfato
MEOR	recuperação do petróleo melhorada por microrganismos
NMP	número mais provável
Offshore	em alto mar
Pits	corrosão pontual direcionada por bactérias redutoras de sulfato
SDS	dodecil sulfato de sódio
THPS	sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Classes de alguns biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores	11
Tabela 2.1	Matriz do planejamento estatístico segundo o DCCR para avaliação do efeito dos compostos na atividade metabólica de <i>D. nigrificans</i> . As variáveis independentes estudadas foram concentração de ramnolipídeo, concentração de THPS e concentração de molibdato de sódio	35
Tabela 2.2	Estimativa do número mais provável de células viáveis de <i>D. nigrificans</i> . Os resultados são mostrados para cada tratamento analisado segundo o planejamento no DCCR	38
Tabela 2.3	Análise de variância para o efeito dos compostos ramnolipídeo, THPS e molibdato de sódio sobre a concentração de células viáveis de <i>D. nigrificans</i> cultivada em meio Baars anaeróbico a 55 °C. A avaliação foi realizada nos tempos de 6 e 18 horas após adição dos compostos ao meio de cultivo	39
Tabela 2.4	Concentração de sulfato residual no meio Baars. Os resultados são mostrados para cada tratamento analisado segundo o planejamento no DCCR	42
Tabela 3.1	Matriz do planejamento estatístico segundo o DCCR para avaliação do efeito dos compostos na adesão de <i>D. nigrificans</i> a cupons de aço inoxidável AISI 304. As variáveis independentes estudadas foram concentração de ramnolipídeo, concentração de THPS e concentração de molibdato de sódio	53
Tabela 3.2	Número de células de <i>D. nigrificans</i> aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304. Os resultados mostrados são de cada tratamento analisado segundo o planejamento no DCCR	57
Tabela 3.3	Coeficientes da regressão entre a concentração de células de <i>D. nigrificans</i> aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C e a concentração de molibdato de sódio, 8 horas após a inoculação do meio de cultivo (D.O. _{600nm} inicial de 0,05)	58
Tabela 3.4	Análise de variância do efeito dos compostos na adesão de <i>D. nigrificans</i> a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C, 8 horas após inoculação do meio de cultivo (D.O. _{600nm} inicial de 0,05)	59
Tabela 3.5	Coeficientes da regressão entre a concentração de células de <i>D. nigrificans</i> aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C e a concentração de ramnolipídeo em 24, 48 e 96 horas após a inoculação do meio de cultivo (D.O. _{600nm} inicial de 0,05)	62
Tabela 3.6	Análise de variância do efeito dos compostos na adesão de <i>D. nigrificans</i> a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C em 24, 48 e 96 horas após inoculação do meio de cultivo (D.O. _{600nm} inicial de 0,05)	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Bioquímica da redução de sulfato. (a) Duas formas de sulfato ativo podem ser produzidas, adenosina 5'-fosfosulfato (AFS) e fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (FAFS). (b) Esquemas das reduções assimilativa e dissimilativa de sulfato.	8
Figura 1.2	Diagrama esquemático da variação da tensão superficial e solubilidade em função da concentração de surfactante (CMC representa a concentração micelar crítica).	12
Figura 1.3	Estrutura das moléculas de monoramnolípido (a) e diramnolípido (b) produzidas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	13
Figura 1.4	Esquema do desenvolvimento de biofilme como um processo de 5 estádios. 1. Adsorção inicial de células à superfície. Estádio 2: Produção de polissacarídeos extracelulares (EPS). Estádio 3: Desenvolvimento inicial da estrutura do biofilme. Estádio 4: Maturação da estrutura do biofilme. Estádio 5: Dispersão de células a partir do biofilme.	16
Figura 2.1	Curva de crescimento da bactéria <i>D. nigrificans</i> em meio Baars anaeróbio, incubada a 55 °C. Os dados representam as médias de três repetições.	36
Figura 2.2	Efeito dos compostos ramnolípido, THPS e molibdato de sódio sobre a população de <i>D. nigrificans</i> cultivada em meio Baars anaeróbio a 55 °C. Os tratamentos de 1 a 18 correspondem às concentrações dos compostos no meio de cultivo apresentadas na Tabela 2.2. A adição dos compostos foi feita no tempo de 18 horas após a inoculação do meio de cultivo.	40
Figura 2.3	Efeito dos compostos ramnolípido, THPS e molibdato de sódio sobre a atividade de redução de sulfato por <i>D. nigrificans</i> cultivada em meio Baars anaeróbio a 55 °C. Os compostos foram adicionados ao meio de cultivo no tempo correspondente a 18 horas de incubação. Os tratamentos de 1 a 18 correspondem às concentrações dos compostos no meio de cultivo, apresentadas na Tabela 2.2.	43
Figura 3.1	Microfotografias da formação de biofilme por <i>D. nigrificans</i> em cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbio no período de 8 a 96 horas de incubação a 55 °C em câmara anaeróbia (D.O. _{600nm} inicial de 0,05). Os cupons foram corados com alaranjado de acridina 0,4 % e observados em microscópio de epifluorescência em aumento de 1000 vezes sob filtro IB2.	55
Figura 3.2	Variação da concentração de células de <i>D. nigrificans</i> aderidas a cupons de aço inoxidável 304 em função da concentração de molibdato de sódio, no tempo de 8 horas após a inoculação.	60
Figura 3.3	Variação do número de células de <i>D. nigrificans</i> aderidas a cupons de aço inoxidável 304 em função da concentração de ramnolípido, nos tempos de 24 (a), 48 (b) e 96 horas (c) após a inoculação.	65

RESUMO

LEÃO, Bruna Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Agentes inibidores da atividade metabólica e do processo de adesão de *Desulfotomaculum nigrificans* em superfície de aço inoxidável.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Antônio Galvão do Nascimento e Nélio José de Andrade.

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas o principal grupo de microrganismos envolvidos na formação de biofilmes e biocorrosão de oleodutos. A prevenção e o controle do crescimento desse grupo bacteriano têm sido realizados principalmente pela utilização de agentes biocidas ou bacteriostáticos, bem como pelo uso de inibidores metabólicos. Neste trabalho foi avaliado o efeito de misturas contendo o biossurfactante ramnolípideo, o inibidor metabólico molibdato de sódio e o biocida sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) sobre a atividade metabólica de *Desulfotomaculum nigrificans*, bem como sobre a sua adesão a cupons de aço inoxidável AISI 304. O efeito das misturas sobre a atividade metabólica foi avaliado pela estimativa de células viáveis e pela determinação de sulfato residual no meio de cultura. A avaliação da adesão a cupons de aço inoxidável foi realizada pela contagem direta em microscópio de epifluorescência. O planejamento experimental foi realizado segundo o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para se analisar o delineamento experimental. Não houve diferença significativa entre os efeitos causados pelos três compostos na viabilidade celular em 6 e 18 horas após a adição dos compostos à cultura de *D. nigrificans*. Todos os compostos avaliados foram capazes de inibir o crescimento de *D. nigrificans* em meio Baars anaeróbio a 55 °C. Os dados de concentração de sulfato residual confirmaram o efeito inibitório dos compostos testados também sobre a atividade metabólica dessa bactéria. Dentre os compostos avaliados, o biossurfactante ramnolípideo foi o que apresentou maior efeito inibitório na adesão de *D. nigrificans* a cupons de aço inoxidável, quando cultivada em meio Baars a 55 °C. Ele foi o único composto com efeito estatisticamente significativo nos tempos de 24, 48 e 96 horas de tratamento avaliados. A Metodologia de Superfície de Resposta revelou que a maior inibição da adesão ocorre quando o biossurfactante é adicionado em concentrações de 1,0 a 1,6 vezes o valor da sua concentração micelar crítica. Os resultados sugerem o potencial de aplicação do

biossurfactante ramnolípido no controle da adesão e, eventualmente, da biocorrosão causada por *D. nigrificans*.

ABSTRACT

LEÃO, Bruna Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Agents of inhibition of the metabolic activity and of the process of adhesion of *Desulfotomaculum nigrificans* in surface of stainless steel.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Antônio Galvão do Nascimento and Nélio José de Andrade.

The sulphate reducing bacteria (SRB) are considered the principal group of microorganisms involved in the formation of biofilms and biocorrosion of pipelines. The prevention and the control of the growth of that bacterial group have been accomplished mainly by the use of biocide or bacteriostatic agents, as well as for the use of metabolic inhibitors. In this work the effect of mixtures was evaluated containing the biosurfactant rhamnolipid, the inhibitor metabolic molybdate of sodium and the biocide tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS) about the metabolic activity of *Desulfotomaculum nigrificans* as well as about your adhesion to coupons of stainless steel AISI 304. The effect of the mixtures about the metabolic activity was evaluated by the estimate of viable cells and for the determination of residual sulphate in the medium of culture. The evaluation of the adhesion to coupons of stainless steel was accomplished by the direct count to the epifluorescence microscope. The experimental planning was accomplished according to Central Design Compost Rotational (DCCR) and the Methodology of Surface of Answer (MSR) was used to analyze the experimental design. There was not significant difference among the effects caused by the three compounds in the cellular viability in 6 and 18 hours after the addition of the compounds to the culture of *D. nigrificans*. All the appraised compounds were capable to inhibit the growth of *D. nigrificans* in anaerobic medium Baars to 55 °C. The data of concentration of residual sulphate confirmed the effect of inhibition of the compounds also tested about the metabolic activity of that bacterium. Among the appraised compounds, the biosurfactant rhamnolipid was what presented larger effect of inhibition in the adhesion of *D. nigrificans* to coupons of stainless steel, when cultivated in medium Baars to 55 °C. It was the only compounds with effect significant statistics appeared in the times of 24, 48 and 96 hours of treatment evaluated. The Methodology of Surface of Answer revealed that the largest inhibition of the adhesion happens when the biosurfactant is added in concentrations from 1,0 to 1,6 times the value of your concentration critical micelar. The

results suggest the potential of application of the biosurfactant rhamnolipid in the control of the adhesion and, eventually, of the biocorrosion caused by *D. nigrificans*.

INTRODUÇÃO GERAL

O processo de extração do petróleo inicia-se com a fase em que ele jorra na superfície por pressão natural no interior da jazida, a denominada fase primária. A esta segue-se a fase secundária, na qual água é injetada no reservatório para restaurar a pressão interna e aumentar a vazão do petróleo. A injeção de água do mar, rica em sulfato, pode estimular o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, que causam sérios prejuízos à indústria petroquímica, decorrentes da formação de biofilmes na superfície metálica e conseqüente corrosão de oleodutos e reservatórios de petróleo, bem como da diminuição da qualidade do óleo extraído.

A deterioração de metal devida à atividade microbiana é denominada biocorrosão ou corrosão influenciada por microrganismos (CIM), a qual é resultado de interações entre a superfície do metal, produtos da corrosão abiótica, células bacterianas e seus metabólitos, como ácidos orgânicos e inorgânicos e compostos voláteis, como amônia e sulfeto de hidrogênio. Conquanto seja bem reconhecido que ambos os mecanismos, químico e microbiológico, contribuem para a corrosão, ainda é difícil precisar a contribuição relativa da atividade microbiana na corrosão de oleodutos. No entanto, tem sido estimado que 20 a 40 % de toda corrosão interna em oleodutos e tubulações utilizados na indústria de gás podem ser atribuídos à corrosão microbiana. Estima-se que o custo anual de todas as formas de corrosão na indústria petroquímica é de aproximadamente \$13,4 bilhões de dólares, sendo a biocorrosão responsável por cerca de \$2 bilhões.

Dentre os microrganismos envolvidos na formação de biofilmes e conseqüente biocorrosão de oleodutos, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas o principal grupo. As BRS constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos em muitos ambientes anaeróbios. Elas apresentam ampla variação morfológica e metabólica e são geralmente reconhecidas como anaeróbias estritas. As BRS são capazes de oxidar vários compostos orgânicos utilizando o íon sulfato comoceptor de elétrons. A produção de H_2S biogênico freqüentemente indica a atividade e a presença das bactérias redutoras de sulfato em ambientes naturais, sendo esse composto considerado o principal fator na atividade corrosiva desses microrganismos. Além disso, esse gás é tóxico à saúde humana.

Em decorrência dos inúmeros prejuízos econômicos relacionados à atividade metabólica das BRS na indústria petroquímica, muitas pesquisas têm sido direcionadas à prevenção e ao controle da corrosão causada por esse grupo de bactérias. O tratamento da água de injeção com o biocida sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) é comumente utilizado para controle da produção do H₂S biogênico. O THPS é um composto iônico solúvel em água, que apresenta ação antimicrobiana rápida e de amplo espectro. Ele apresenta fácil manipulação e baixa toxicidade ambiental.

Outra substância, o íon molibdato (MoO_4^{2-}), tem sido utilizada como inibidor metabólico específico de BRS. O molibdato entra na célula via sistema de transporte de sulfato e interfere com a formação do composto adenosina fosfosulfato, o qual é indispensável para as reduções dissimilativa e assimilativa de sulfato.

Outras substâncias promissoras no controle de biofilmes bacterianos e potencial aplicação no controle de bactérias redutoras de sulfato incluem os surfactantes biológicos ou biossurfactantes. Surfactantes, de origem biológica ou química, são moléculas anfipáticas, constituídas de um grupo hidrofílico e outro hidrofóbico. Eles são capazes de agir na interface entre duas fases fluidas com diferentes polaridades, como óleo/água ou ar/água, reduzindo a tensão superficial. Essa propriedade confere aos surfactantes excelentes propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes e dispersantes, o que possibilita sua aplicação em vários setores industriais.

Neste trabalho, foi avaliada a hipótese de que a associação do biossurfactante ramnolipídeo, produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, com molibdato de sódio ou com THPS, aumenta a eficácia desses compostos como inibidores da atividade metabólica e da adesão da bactéria redutora de sulfato *Desulfotomaculum nigrificans* em superfície de aço inoxidável.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. 1. EXTRAÇÃO DO PETRÓLEO

O processo de extração do petróleo pode ser dividido em três etapas clássicas: recuperação primária, recuperação secundária e recuperação terciária (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

A recuperação primária do petróleo corresponde à recuperação sustentada pela pressão interna do reservatório. Quando o poço é aberto, a pressão inicial do reservatório é freqüentemente alta o suficiente para permitir que óleo e gás no reservatório fluam espontaneamente para a superfície. Quando a pressão diminui, os níveis de produção decaem e a produção primária torna-se ineficiente. Geralmente, apenas 10 % do óleo podem ser recuperados por esse método, exigindo que outras técnicas sejam utilizadas para aumentar o volume de óleo recuperado. Quando a extração de óleo na fase primária declina, são implantadas as técnicas de recuperação secundária, as quais se baseiam na injeção de água ou gás para manter a pressão interna do reservatório e melhorar a recuperação. Em média, 15 a 60 % do óleo podem ser recuperados, dependendo das características do mesmo, das do reservatório e do número e posição dos poços (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

A recuperação do petróleo pode ser ainda aumentada pela adoção das tecnologias de recuperação melhorada, que caracterizam a recuperação terciária. Destaca-se, nessa etapa, a recuperação do petróleo melhorada por microrganismos (MEOR), a qual utiliza microrganismos e, ou seus metabólitos, como biopolímeros, ácidos e gases, com a finalidade de aumentar a recuperação do mesmo (SEN, 2008). Nos processos de MEOR, biossurfactantes são potencialmente úteis, dada a sua capacidade de reduzir a tensão interfacial entre o óleo residual e o fluido de injeção (BORDOLOI & KONWAR, 2008). Há três principais estratégias para utilização desses compostos em MEOR: (i) injeção do microrganismo produtor de biossurfactante no reservatório, com conseqüente multiplicação do microrganismo *in situ* nas rochas do reservatório, (ii) injeção de nutrientes selecionados no reservatório para estimular o crescimento de microrganismos indígenas produtores de biossurfactantes e (iii)

produção de biossurfactante *ex situ* e sua subsequente injeção no reservatório (BANAT, 1995).

Recuperação Secundária

Na fase secundária de recuperação do petróleo, água do mar é freqüentemente utilizada para restaurar a pressão interna de reservatórios *offshore* e aumentar a vazão do petróleo (ANTONIO *et al.*, 2000; HUBERT & VOORDOUW, 2007). A injeção de água do mar, rica em sulfato, pode ter como efeito indesejável o estímulo do crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que causam sérios prejuízos à indústria petroquímica, decorrentes da formação de biofilmes na superfície metálica e de sua participação na corrosão de oleodutos e reservatórios de óleo (HUBERT *et al.*, 2005; GONZÁLEZ *et al.*, 2006), bem como da produção de ácido sulfídrico (H_2S) (DAVIDOVA *et al.*, 2001).

Nas operações de recuperação secundária do petróleo, a concentração de sulfato introduzida nos reservatórios depende da fonte da água de injeção, a qual é especialmente alta (aproximadamente 30 mmol L^{-1}) quando a água do mar é injetada em operações *offshore*. Uma vez que grandes volumes de água do mar são injetados (tipicamente $10.000 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$, dependendo do reservatório), grandes quantidades de sulfeto biogênico podem ser produzidas (acima de $1.100 \text{ Kg dia}^{-1}$) (HUBERT & VOORDOUW, 2007). Apesar de também ser produzido quimicamente pela dissolução dos sulfetos metálicos da rocha nos reservatórios, a maior parte do H_2S produzido em oleodutos origina-se da atividade metabólica de bactérias redutoras de sulfato (MOUGIN *et al.*, 2007).

A produção de H_2S biogênico freqüentemente indica a atividade e a presença das bactérias redutoras de sulfato em ambientes naturais (DOLLA *et al.*, 2006), sendo esse composto considerado o principal fator na atividade corrosiva desses microrganismos. A corrosão do aço nos tanques de armazenamento e o azedamento do óleo são os principais prejuízos decorrentes do aumento da concentração de H_2S na indústria petroquímica (ANTONIO *et al.*, 2000). Além disso, esse gás é tóxico ao homem (LAMBERT *et al.*, 2006). Além de contribuir para a ocorrência de corrosão, os biofilmes causam diminuição do fluxo de óleo nos dutos, elevando com isso os gastos de energia

para bombeamento e o desgaste de equipamentos (NEMAT *et al.*, 2001; REMPEL *et al.*, 2006).

1.2. BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

As BRS constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos em muitos ambientes anaeróbios, onde elas utilizam o sulfato como aceptor final de elétrons para a degradação de compostos orgânicos, resultando na produção de sulfeto. Elas apresentam ampla variação morfológica e metabólica (DOLLA *et al.*, 2006) e são geralmente reconhecidas como anaeróbias estritas, apesar de algumas espécies apresentarem significativa tolerância ao oxigênio (KJELDSEN *et al.*, 2004; KJELDSEN *et al.*, 2005).

Bactérias redutoras de sulfato são capazes de oxidar vários compostos orgânicos de baixo peso molecular, incluindo ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos, álcoois, hidrocarbonetos e compostos aromáticos (DOLLA *et al.*, 2006), utilizando o íon sulfato ou outros compostos de enxofre (tiosulfato, sulfito e S^0) como aceptores de elétrons (FANG *et al.*, 2002; PALLUD & VAN CAPPELLEN, 2006). Acetato, lactato, piruvato e etanol estão entre os substratos mais utilizados pelas BRS (PALLUD & VAN CAPPELLEN, 2006).

BRS constituem um grupo de bactérias fisiologicamente complexo e várias propriedades têm sido usadas em esquemas de classificação tradicionais, dentre as quais citam-se o formato da célula, motilidade, formação de esporos, conteúdo GC do DNA e temperatura ótima de crescimento. Para classificação dentro de um gênero, diferentes doadores de elétrons são testados (GIBSON, 1990; CASTRO *et al.*, 2000). Entretanto, a maioria das informações sobre a diversidade de BRS em ambientes naturais tem sido obtida pela utilização de genes marcadores. O gene mais comumente usado é o que codifica RNA 16S ribossomal (rRNA) (LEU *et al.*, 1998; SCHEID & STUBNER, 2001).

Com base em análises comparativas de seqüências do 16S RNA, BRS conhecidas são agrupadas em sete grupos filogenéticos: cinco no domínio Bacteria e dois no domínio Archaea. A maioria das BRS pertence a aproximadamente 23 gêneros dentro do grupo Deltaproteobacteria. Outro grupo representativo é o das BRS gram-

positivas que se incluem no grupo Clostridia (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* e *Desulfosporomusa*). Três grupos filogenéticos - Nitrospirae (gênero *Thermodesulfovibrio*), Thermodesulfobacteria (gênero *Thermodesulfobacterium*) e Thermodesulfobiaceae (gênero *Thermodesulfobium*) - contêm apenas redutores de sulfato termófilos. No domínio Archaea, estão os gêneros *Archaeoglobus*, no Euriarqueota, e *Thermocladium* e *Caldivirga*, no Crenarqueota (MUYZER & STAMS, 2008).

O Gênero *Desulfotomaculum*

O prefixo *Desulfo*, em latim, indica a redução de compostos de enxofre por essas bactérias, e *tomaculum* indica a forma semelhante a “lingüiça”. São bactérias anaeróbias estritas, em forma de bastonetes retos ou recurvados, geralmente únicos, embora possam ser encontrados algumas vezes formando cadeias. São capazes de formar esporos ovais ou esféricos em posição central, terminal ou subterminal. A maioria apresenta motilidade, com flagelos geralmente peritríqueos (CAMPBELL & POSTGATE, 1965). Bactérias desse gênero freqüentemente apresentam reação de Gram negativa; no entanto, micrografias eletrônicas de transmissão revelam organização da parede celular típica de bactérias gram-positivas (ROSNES *et al.*, 1991; TARDY-JACQUENOD *et al.*, 1998).

O gênero *Desulfotomaculum* contém várias espécies de termófilos moderados, com temperatura ótima de crescimento entre 54 e 65 °C. O primeiro isolado desse gênero foi descrito como *Clostridium nigrificans* (WERKMAN & WEAVER, 1927, citados por WIDDEL, 1992), depois como *Sporovibrio desulfuricans* (STARKEY, 1938, citados por WIDDEL, 1992) e finalmente foi nomeado *Desulfotomaculum nigrificans* (CAMPBELL & POSTGATE, 1965). Subseqüentemente, outros termófilos moderados e alguns mesófilos pertencentes ao gênero foram isolados.

Diferentes espécies do gênero *Desulfotomaculum* exibem grande versatilidade nutricional, utilizando ácidos graxos, hexoses, ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos e aminoácidos como fontes de carbono e de energia durante a redução dissimilativa do sulfato (CAMPBELL & POSTGATE, 1965). Dependendo da espécie, substratos

orgânicos são oxidados incompletamente a acetato ou completamente a CO_2 (CASTRO *et al.*, 2000).

Os redutores de sulfato formadores de esporos são encontrados essencialmente nos mesmos habitats que os tipos não-formadores de esporos, como solo (STUBNER & MEUSER, 2000), regiões geotermiais (KAKSONEN *et al.*, 2006), rúmen (PADO & PAWŁOWSKA-ĆWIEK, 2005), água e solo contaminados com óleo (TARDY-JACQUENOD *et al.*, 1998, LIU *et al.*, 2008), entre outros. No entanto, dada a sua capacidade de formar endosporos, esses microrganismos são adaptados a sobreviverem a condições óxicas e a ressecamento por meses ou anos, bem como em ambientes com mudanças regulares nas condições redox, tais como solos de cultivo de arroz, os quais drenam entre os períodos de cultivo (STUBNER & MEUSER, 2000).

Redução Dissimilativa do Sulfato

O enxofre apresenta vários estados de oxidação, de -2 (completamente reduzido) a +6 (completamente oxidado) (MUYZER & STAMS, 2008). Em seu maior estado de oxidação, o enxofre existe na forma do íon sulfato (SO_4^{2-}), o qual é reduzido a sulfeto (S^{2-}) pela maioria das bactérias, fungos e plantas antes de ser incorporado nos aminoácidos. Esse processo é denominado redução assimilativa de sulfato (GIBSON, 1990). Em contrapartida, a capacidade de utilizar o sulfato como acceptor final de elétrons constitui um processo de redução restrito às BRS. Na redução assimilativa de sulfato, o H_2S formado é imediatamente convertido a enxofre orgânico, enquanto na redução dissimilativa, o H_2S é excretado (MADIGAN *et al.*, 2002).

A redução do sulfato a H_2S ocorre por meio de algumas etapas envolvendo a transferência de oito elétrons. A etapa inicial é a ativação do sulfato, uma vez que ele é um íon estável, não podendo ser reduzido antes da sua ativação (OLLIVIER & MAGOT, 2005). A ativação do sulfato ocorre por intermédio da enzima ATP sulfurilase, que catalisa a ligação de um íon sulfato a um fosfato do ATP, levando à formação de adenosina fosfosulfato (AFS) (Figura 1.1a). Na redução dissimilativa, o sulfato do AFS é diretamente reduzido a sulfito (SO_3^{2-}) pela enzima AFS redutase, com a liberação de adenosina monofosfato (AMP). Na redução assimilativa, outro fosfato é adicionado à AFS, formando fosfoadenosina fosfosulfato (FAFS) (Figura 1.1a). Somente a partir desse

momento o sulfato pode ser reduzido. Em ambas as reduções, dissimilativa e assimilativa, o primeiro produto da redução do sulfato é o sulfito. Uma vez que o sulfito é formado, a enzima sulfito redutase catalisa sua conversão em sulfeto (Figura 1.1b) (MADIGAN *et al.*, 2002).

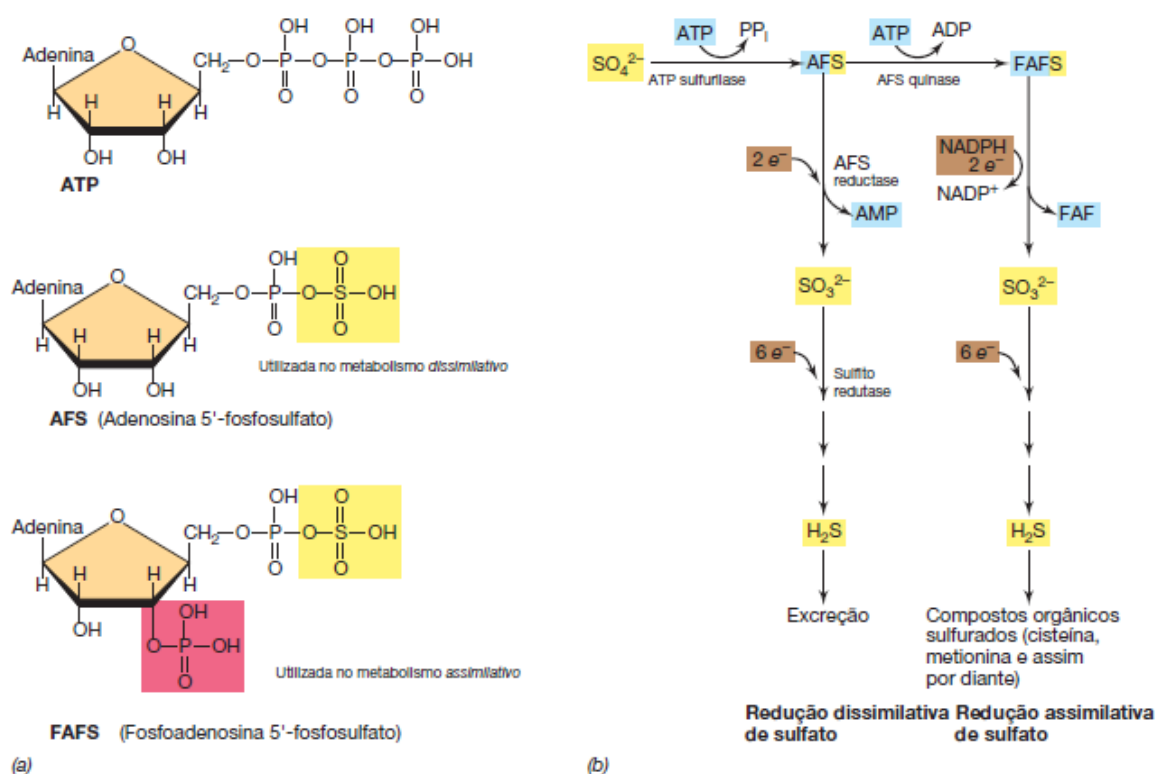


Figura 1.1. Bioquímica da redução de sulfato. (a) Duas formas de sulfato ativo podem ser produzidas, adenosina 5'-fosfosulfato (AFS) e fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (FAFS). (b) Esquemas das reduções assimilativa e dissimilativa de sulfato. Fonte: MADIGAN *et al.*, (2002).

1.3. INIBIDORES DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

Em decorrência dos numerosos prejuízos econômicos relacionados com a atividade metabólica das BRS na indústria petroquímica, muitas pesquisas têm sido direcionadas à prevenção e ao controle da corrosão causada por esse grupo de bactérias. Estratégias para o controle da atividade metabólica de BRS e conseqüente inibição da produção de H₂S biogênico incluem a suplementação da água de injeção com inibidores metabólicos, tais como molibdato e nitrito, e aplicação de agentes

biocidas, como glutaraldeído e sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (TANG *et al.*, 2009).

O tratamento da água de injeção com o biocida sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) é comumente utilizado para controle da produção do H₂S biogênico (NEMATI *et al.*, 2001; GREENE *et al.*, 2006). O THPS é um composto iônico solúvel em água, com ação antimicrobiana rápida e eficaz contra bactérias, fungos e algas. Ele apresenta fácil manipulação e baixa toxicidade ambiental (VIDELA, 2002). Além disso, é capaz de dissolver sulfetos de ferro na indústria petroquímica (LARSEN *et al.*, 2000). O THPS tem sido efetivo nas avaliações para inibir o crescimento de BRS em fase planctônica e aderida, em concentrações de 25 µL L⁻¹ a 250 µL L⁻¹ (COOPER *et al.*, 1998; PENNA *et al.*, 2001). Formulações contendo THPS e outros biocidas ou inibidores metabólicos de BRS também têm sido avaliadas (GREENE *et al.*, 2006). COOPER *et al.*, (1998) verificaram que a atividade biocida do THPS é aumentada pela associação com surfactantes.

Outras substâncias, como nitrato, nitrito e molibdato, têm sido utilizadas como inibidores metabólicos de BRS (ISA & ANDERSON, 2005; KJELLERUP *et al.*, 2005; REMPEL *et al.*, 2006).

Vários mecanismos podem contribuir para conter o processo de formação do H₂S biogênico pela adição de nitrato ou nitrito. Um desses mecanismos é a competição entre BRS e bactérias heterotróficas redutoras de nitrito ou nitrato por doadores de elétrons comuns. Isso pode resultar na exclusão competitiva das BRS (DAVIDOVA *et al.*, 2001). Uma vez que a produção biológica de sulfeto de hidrogênio ocorre apenas em potencial redox baixo (abaixo de -100 mV), o crescimento de BRS pode ser inibido pelo aumento do potencial redox, o que pode ser promovido pela presença dos intermediários da redução do nitrato, como óxido nitroso e óxido nítrico (GREENE *et al.*, 2003). Algumas BRS podem ainda alterar o metabolismo energético, reduzindo nitrato em vez de sulfato (HUBERT *et al.*, 2005). Em outro mecanismo, bactérias oxidantes de sulfeto e redutoras de nitrato ou nitrito (BOS-RN) usam o nitrato ou o nitrito para reoxidar o sulfeto produzido a S⁰ e sulfato, criando um ciclo de enxofre envolvendo BOS-RN e BRS que resulta na remoção de sulfeto (HUBERT *et al.*, 2003). Por fim, o nitrito inibe a redução de sulfeto a sulfeto pela enzima dissimilatória redutase do sulfeto, a qual realiza a etapa enzimática

final na via de redução do sulfato pelas BRS. Entretanto, muitas BRS possuem uma redutase do nitrito que previne essa inibição (GREENE *et al.*, 2003).

Apesar de algumas pesquisas defenderem o uso de nitrato e, ou nitrito como uma alternativa de controle das BRS na indústria de petróleo (DAVIDOVA *et al.*, 2001; KJELLERUP *et al.*, 2005), outros pesquisadores têm recentemente criticado o uso desses inibidores metabólicos. O alvo da crítica está no fato de que a utilização de tais compostos tem sido associada ao aumento no risco de corrosão metálica (NEMATİ *et al.*, 2001; HUBERT *et al.*, 2005; REMPEL *et al.*, 2006). O aumento da taxa de corrosão e a presença de “pits” nas superfícies metálicas têm sido explicados pela formação de formas agressivas de enxofre, tais como polisulfeto, $S^0_{(aq)}$ e tiosulfato por meio da oxidação simultânea do sulfeto e redução do nitrato por BOS-RN (NEMATİ *et al.*, 2001).

Outro inibidor metabólico específico de BRS é o íon molibdato (MoO_4^{2-}), um análogo que inibe a redução do íon sulfato. O molibdato entra na célula por um sistema de transporte de sulfato e interfere com a formação de adenosina fosfosulfato, a forma ativa de sulfato na célula durante as reduções assimilativa e dissimilativa de sulfato. A presença de molibdato leva à formação de adenosina fosfomolibdato na célula, em vez de adenosina fosfosulfato (PATIDAR & TARE, 2005; GREENE *et al.*, 2006), o que provoca escassez de compostos de enxofre reduzido necessários ao crescimento bacteriano. Além disso, adenosina fosfomolibdato é instável e hidrolisa espontaneamente a AMP e molibdato, esgotando as reservas de ATP na célula (GREENE *et al.*, 2006). Alguns estudos têm demonstrado o uso de molibdato em doses que variam de 0,1 mmol L⁻¹ a 4 mmol L⁻¹ para inibir a atividade metabólica de BRS (PATIDAR & TARE, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2005; ISA & ANDERSON, 2005).

Surfactantes

Outras substâncias promissoras no controle de biofilmes bacterianos e potencial aplicação no controle de bactérias redutoras de sulfato incluem os surfactantes biológicos ou biosurfactantes. Surfactantes, de origem biológica ou química, são moléculas anfipáticas que podem reduzir a tensão interfacial e superficial por se acumularem na interface de fluidos imiscíveis e formarem estruturas agregadas, tais como as micelas (VAN HAMME *et al.*, 2006)

Os surfactantes são constituídos de um grupo hidrofílico e outro hidrofóbico. O grupo apolar é frequentemente hidrocarbônico. Já a parte polar apresenta muitas variações, o que leva à classificação dos surfactantes em aniônicos, catiônicos, não-aniônicos ou zwitteriônicos (BANAT *et al.*, 2000). Os surfactantes produzidos por certas bactérias, fungos e leveduras são moléculas complexas e compreendem diferentes estruturas que incluem peptídeos, glicolipídeos, glicopeptídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (Tabela 1.1) (DESAI & BANAT, 1997).

Tabela 1.1. Classes de alguns biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores

Microrganismo	Tipo de surfactante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glicolipídeo (ramnolipídeo)
<i>Candida bombicola</i>	Glicolipídeo (soforolipídeo)
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptídeo (surfactina, iturina e fengicina)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Surfactante polimérico (lipoheteropolissacarídeo)
<i>Corynebacterium lepus</i>	Fosfolipídeo

Adaptada de MUTHUSAMY *et al.* (2008).

Os surfactantes são capazes de agir na interface entre duas fases fluidas com diferentes polaridades, como óleo/água ou ar/água. Essa propriedade permite a tais moléculas reduzirem as tensões interfaciais e, em misturas óleo/água, formar emulsões, tornando as moléculas hidrofóbicas mais solúveis no meio aquoso. Além disso, confere aos surfactantes excelentes propriedades detergentes, emulsificantes e dispersantes (DESAI & BANAT, 1997; VAN HAMME *et al.*, 2006), o que possibilita sua aplicação em vários setores industriais como biorremediação de poluentes no solo, recuperação do óleo na indústria petroquímica e como agentes antimicrobianos (BANAT, 1995; KOSARIC, 2001; SINGH & CAMEOTRA, 2004; MULLIGAN, 2005).

A concentração relativa de um biossurfactante no meio de cultura pode ser expressa em termos de diluição micelar crítica (DMC), fator pelo qual a concentração efetiva excede a concentração micelar crítica (CMC), ou seja, a concentração acima da

qual o surfactante começa a se agregar em micelas e não mais se observa uma redução adicional da tensão superficial (Figura 1.2). A CMC é conceituada, portanto, como a concentração do surfactante necessária para iniciar a formação de micelas (MULLIGAN, 2005). Surfactantes eficientes apresentam uma baixa CMC, ou seja, menor concentração do surfactante é necessária para se iniciar a formação de micelas.

Um biossurfactante eficaz pode reduzir a tensão superficial da água (72 mN m^{-1} a 25°C) para valores abaixo de 40 mN m^{-1} , quando encontra-se em concentração acima da CMC. Por exemplo, o ramnolípídeo, um glicolípídeo produzido por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, é caracterizado por propiciar a redução da tensão superficial para valores entre 25 e 30 mN m^{-1} (DESAI & BANAT, 1997).

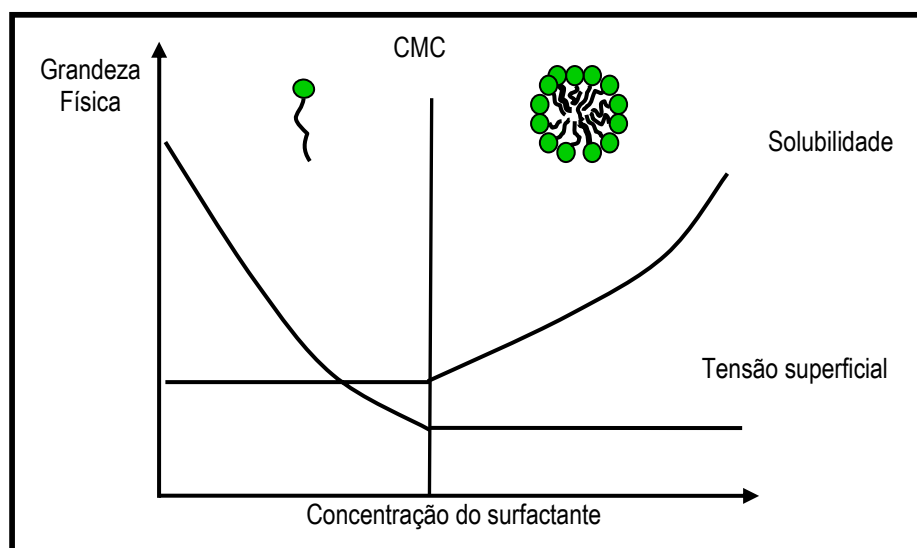


Figura 1.2. Diagrama esquemático da variação da tensão superficial e solubilidade em função da concentração de surfactante (CMC representa a concentração micelar crítica) Adaptada de MULLIGAN (2005).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos está compreendida na classe dos glicolípídeos. Eles são carboidratos ligados por um grupo éter ou éster a ácidos alifáticos de cadeia longa ou a ácidos hidroxialifáticos (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008).

Ramnolípídeos são glicolípídeos produzidos durante a fase estacionária do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Esses compostos apresentam em sua

estrutura uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico (MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

As duas principais moléculas de ramnolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* são ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolipídeo) (Figura 1.3a) e ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolipídeo) (Figura 1.3b). A síntese desses compostos envolve reações de transferência seqüencial de grupos ramnosil, cada uma catalisada por uma ramnosiltransferase específica. Monoramnolipídeos são sintetizados pela ação da ramnotransferase 1 (Rt 1), com a desoxi-timidina-difosfo-L-ramnose agindo como doador de ramnosil e β -hidroxil-decanoil- β -hidroxidecanoato agindo como receptor. Já os di-ramnolipídeos são sintetizados pela ramnosiltransferase 2 (Rt 2) a partir de desoxi-timidina-difosfo-L-ramnose agindo como doador e mono-ramnolipídeos como receptores (BURGER *et al.*, 1966). A expressão dos genes envolvidos com a produção de mono e di-ramnolipídeos é coordenadamente regulada em nível transcricional, envolvendo pelo menos dois sistemas *quorum sensing* (MAIER & CHÁVEZ, 2000).

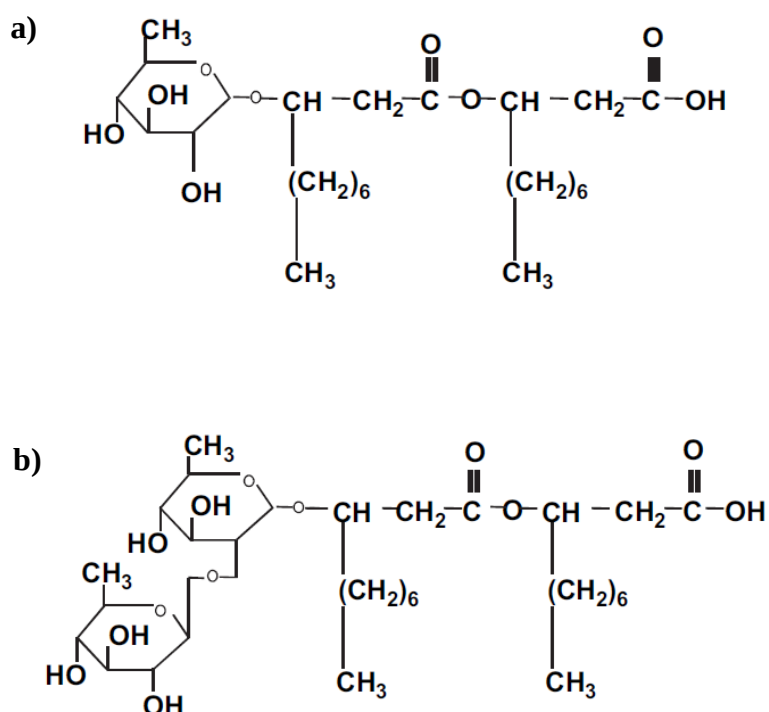


Figura 1.3. Estrutura das moléculas de monoramnolipídeo (a) e diramnolipídeo (b) produzidas por *P. aeruginosa* (MULLIGAN, 2005).

P. aeruginosa é capaz de usar diferentes fontes de carbono para produzir ramnolipídeos, como glicose, glicerol, óleos vegetais, hidrocarbonetos, entre outros (PRIETO *et al.*, 2008; PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008; LOTFABAD *et al.*, 2009), sendo a composição e quantidades produzidas dependentes da linhagem bacteriana, do requerimento nutricional do meio, do pH, do substrato e da temperatura.

Ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m⁻¹ para 30 mN m⁻¹, com uma concentração micelar crítica de 5 a 200 mg L⁻¹, dependendo dos componentes da mistura. Esses tipos de biossurfactantes têm sido extensivamente utilizados em pesquisas direcionadas à biorremediação de solos e águas contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (CAMEOTRA & SINGH, 2008; WANGH *et al.*, 2008), remoção de metais pesados do solo (WHANG & MULLIGAN, 2009), aumento da recuperação de petróleo (BORDOLOI & KONWAR, 2008), como agentes antimicrobianos (IRIE *et al.*, 2005), entre outros.

1.4. BIOFILMES

Biofilmes são conceituados como comunidades de microrganismos sésseis, sendo caracterizados pela presença de células que estão ligadas a um substrato ou interface, ou ainda entre si, envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e que exibem um fenótipo diferente das células planctônicas em relação à taxa de crescimento, metabolismo e transcrição gênica (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Os biofilmes podem ser compostos de uma única espécie ou de uma comunidade contendo múltiplas espécies de algas, fungos, bactérias e protozoários (SINGH *et al.*, 2006) e podem formar um vasto arranjo em superfícies bióticas e abióticas (DAVEY & O'TOOLE, 2000). A espessura de um biofilme pode variar entre uma única camada de células a uma numerosa comunidade de células em uma compacta matriz polimérica (SHIRTLIFF *et al.*, 2002). A placa dentária, por exemplo, pode conter mais de 500 espécies diferentes de bactérias, algumas ligadas à superfície do dente, enquanto outras estão ligadas às células vizinhas, através de interações moleculares específicas, por meio de adesinas e de seus receptores correspondentes. Esse biofilme pode atingir 40 a 65 µm de espessura (KOLENBRANDER *et al.*, 2002).

Observações microscópicas diretas e técnicas de recuperação quantitativa mostram que mais de 99 % das bactérias crescem formando biofilmes em uma grande variedade de superfícies (DONLAN & COSTERTON, 2002). A preferência por esse tipo de crescimento é explicada por algumas vantagens apresentadas pelas células aderidas em relação às células planctônicas. Dentre elas, destaca-se que a estrutura do biofilme e a fisiologia das células nele presentes conferem um aumento da resistência das células a agentes antimicrobianos, como antibióticos e desinfetantes (DONLAN & COSTERTON, 2002), além de conferir resistência às defesas do hospedeiro (SHIRTLIFF *et al.*, 2002; STOODLEY *et al.*, 2004), a limitações de nutrientes e a variações no pH do ambiente circundante (JEFFERSON, 2004; LATASA *et al.*, 2006). Os mecanismos responsáveis por essa resistência podem ser um ou mais dos seguintes fatores: dificuldade de penetração do agente anti-microbiano na matriz do biofilme; taxa de crescimento alterada dos microrganismos no biofilme; outras mudanças fisiológicas atribuídas ao modo de crescimento do biofilme (DONLAN & COSTERTON, 2002). A invulnerabilidade dos biofilmes não é completamente compreendida, mas é dependente da heterogeneidade fisiológica das células presentes (JEFFERSON, 2004).

Formação e Regulação de Biofilmes

Assim como outros processos de desenvolvimento, a construção de um biofilme requer uma série de etapas discretas e bem reguladas. Enquanto os exatos mecanismos moleculares podem diferir de um organismo a outro, os estádios de desenvolvimento do biofilme parecem ser conservados na maioria dos microrganismos. Esses estádios incluem a adsorção das células à superfície, o crescimento e agregação das células em microcolônias e a maturação e manutenção da arquitetura do biofilme (O'TOOLE, 2003).

Dada a ubiquidade e considerável importância dos biofilmes na vida humana, muitos processos têm sido desenvolvidos para o estudo e elucidação dos mecanismos que direcionam a formação dessas estruturas microbianas. Nas últimas décadas, o aperfeiçoamento de técnicas de observação microscópica tem permitido distinguir o processo de formação do biofilme em cinco principais estádios (Figura 1.4).

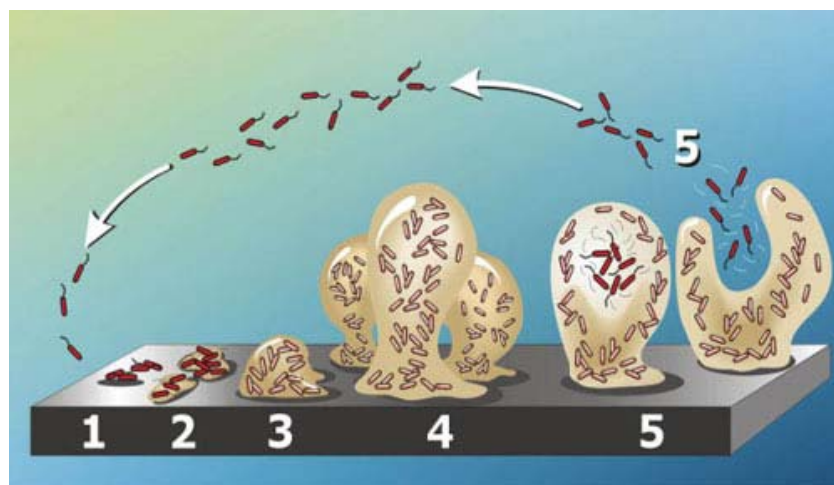


Figura 1.4. Esquema do desenvolvimento de biofilme como um processo de 5 estádios. Estádio 1. Adsorção inicial de células à superfície. Estádio 2: Produção de polissacarídeos extracelulares (EPS). Estádio 3: Desenvolvimento inicial da estrutura do biofilme. Estádio 4: Maturação da estrutura do biofilme. Estádio 5: Dispersão de células a partir do biofilme. Adaptada de STOODLEY *et al.*, (2002).

A etapa inicial de formação de um biofilme é caracterizada pela interação de células com a superfície ou interface, bem como com outras células. A adsorção inicial das células planctônicas a uma superfície sólida pode ser feita pela corrente do fluido ou pela motilidade da célula, etapa em que é necessário que as forças repulsivas entre a célula e a superfície sejam superadas. A etapa seguinte é a transição da adsorção reversível para a irreversível, a qual envolve a produção de polímeros extracelulares pela bactéria e/ou de adesinas específicas localizadas no pili e fimbrias, as quais interagem com a superfície (VAN HOUTDT & MICHIELS, 2005).

Uma vez que essas células se agregam na superfície, o biofilme inicia o processo de desenvolvimento pela produção de uma matriz extracelular, a qual contribui grandemente para a estrutura final da comunidade. Diferenças na estrutura do biofilme podem resultar de pequenas mudanças nas condições ambientais e parecem ser reflexo das diferenças na composição da matriz extracelular (BRANDA *et al.*, 2005). A composição da matriz extracelular é complexa e variável entre diferentes espécies de bactérias e dentro da mesma espécie sob diferentes condições ambientais. No entanto, exopolissacarídeos e proteínas são constantemente descritos como componentes essenciais da matriz, provendo a estrutura na qual as células são inseridas (LASA &

PENADÉS, 2006). Proteínas de superfície estão ainda regularmente presentes no biofilme, mas sua presença tem sido relacionada principalmente à adsorção inicial da célula microbiana (LASA & PENADÉS, 2006).

No estágio 4 inicia-se o desenvolvimento de microcolônias no biofilme maduro. Durante esse estágio, substâncias poliméricas extracelulares que servem como uma matriz adesiva e captam nutrientes a partir do ambiente ainda são produzidas. Arquiteturas complexas semelhante a estruturas em forma de pedestais, canais de água e poros são formados, nos quais a bactéria desenvolve modos específicos de crescimento, com fisiologia e metabolismo distintos do observado em células planctônicas. Por fim, ocorre a dispersão de células (individuais ou em grupos) a partir do biofilme para o ambiente circundante e retorno ao estado planctônico (VAN HOUTT & MICHELS, 2005).

Vários fatores ambientais regulam a formação do biofilme, tais como as variações no pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio e concentração de metabólitos, os quais causam diferenças no biofilme formado (SINGH *et al.*, 2006).

O desenvolvimento do biofilme e liberação das células pode ser regulado pela expressão de genes dependente da densidade populacional controlado por moléculas sinalizadoras célula-célula. *Quorum sensing* é o termo usado para descrever os sistemas de sinalização célula a célula. Ele é definido como a regulação da expressão de genes em resposta à acumulação local de bactérias (SPOERING & GILMORE, 2006). Como resultado do *quorum sensing*, uma população de organismos unicelulares pode coordenar a produção de fatores de virulência para defesa mútua, ou de fatores de colonização para interação simbiótica com o hospedeiro, usando pequenas moléculas sinalizadoras que se acumulam no meio durante o crescimento da célula (PARSEK & GREENBERG, 2000). As moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular liberadas são freqüentemente chamadas de auto-indutores ou quormon, cuja concentração celular está relacionada com a densidade populacional do organismo produtor (DANIELS *et al.*, 2004).

Bactérias gram-negativas e gram-positivas usam diferentes moléculas sinalizadoras para “sentir” sua densidade populacional. A maioria das bactérias gram-negativas utiliza um sistema de sinalização baseado em acil homoserina lactonas (AHSL), enquanto que a maioria das gram-positivas utiliza peptídeos (PARSEK &

FUQUA, 2004). À medida que a população microbiana aumenta, aumenta a concentração das moléculas sinalizadoras no meio externo e, conseqüentemente, no interior da célula. As células possuem mecanismos moleculares para responder a essa mudança de concentração, permitindo que toda população inicie uma ação conjunta quando uma concentração crítica, correspondente a uma densidade populacional particular, tenha sido estabelecida (DANIELS *et al.*, 2004).

O *quorum sensing* regula mudanças no biofilme maduro por controlar a formação de canais e estruturas em forma de pilares, que garantem a liberação de nutrientes para as células (SINGH *et al.*, 2006). A observação de que mutantes de *P. Aeruginosa* incapazes de sintetizar AHL (mutantes *lasI*) formam biofilmes com arquitetura radicalmente alterada, demonstrou que essas moléculas regulam a formação da estrutura do biofilme desse microrganismo (DAVIES *et al.*, 1998). Os mutantes *lasI* não resistiram ao tratamento com 0,2 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), diferentemente do observado com a linhagem selvagem. A arquitetura típica do biofilme foi restaurada pela adição de AHL exógena, sugerindo que a comunicação célula-célula é essencial para essa bactéria estabelecer uma comunidade melhor ordenada sobre a superfície.

Poucas pesquisas têm sido realizadas para o estudo dos mecanismos responsáveis pela formação de biofilmes e dos processos de biocorrosão por bactérias redutoras de sulfato termófilas formadoras de esporos. A maioria delas está focada em bactérias mesófilas gram-negativas, não-formadoras de esporos, especialmente as do gênero *Desulfovibrio* (ILHAN-SUNGUR *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2006; SHENG *et al.*, 2007), relativamente o grupo mais abundante entre as BRS associadas a biofilmes em oleodutos (GONZÁLEZ, *et al.*, 2006). BRS do gênero *Desulfotomaculum* também têm sido isoladas em indústrias petroquímicas com sérios problemas de corrosão (CETIN & AKSU, 2009) e estudos utilizando esse gênero priorizam a morfologia e o potencial da corrosão causada por essas bactérias (SANCHEZ *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2008). Além disso, a taxa de corrosão causada por BRS do gênero *Desulfotomaculum* parece ser maior do que a causada por BRS do gênero *Desulfovibrio* (KUMAR *et al.*, 1999).

Dada a grande preocupação com a presença de BRS na indústria petroquímica, o presente trabalho focaliza a utilização de misturas contendo o biossurfactante ramnolípido, o biocida THPS e o inibidor metabólico molibdato de sódio para inibir a

atividade metabólica da BRS *Desulfotomaculum nigrificans*, bem como sua adesão em superfície de aço inoxidável AISI 304.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO, M. R.; KARET, G. B.; GUZOWSKI JR, J. P. Iron chemistry in petroleum production. **Fuel**, v. 79, p. 37–45, 2000.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BORDOLOI, N. K. & KONWAR, B. K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 63, p. 73–82, 2008.
- BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited **TRENDS in Microbiology**, v.13, p. 20-26, 2005.
- BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, R. M. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 441-445, 1966.
- CAMEOTRA, S. S. & SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 274–280, 2008.
- CAMPBELL, L. L. & POSTGATE, J. R. Classification of the Spore-Forming Sulfate-Reducing Bacteria **Bacteriological Reviews**, v. 29, p. 359-363, 1965.
- CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. MiniReview: Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 1-9, 2000.
- CETIN, D. & AKSU, M. L. Corrosion behavior of low-alloy steel in the presence of *Desulfotomaculum* sp. **Corrosion Science**, 1-21, 2009.
- COOPER, K. G.; TALBOT, R. E.; TURVEY, M. J. Biocidal mixture of tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium salt and a surfactant. **Patente Number 5741757**, 1998.

- DANIELS, S. R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 261–289, 2004.
- DAVEY, M. E. & O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847–867, 2000.
- 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, p. 80-86, 2001.
- DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295–298, 1998.
- DESAI, J. D. & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- DOLLA, A.; FOURNIER, M.; DERMOUN, Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 87–100, 2006.
- DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. Reviews Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167–193, 2002.
- FANG, H. H. P.; XU, L. C.; CHAN, K. Y. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. **Water Research**, v. 36, p. 4709-4716, 2002.
- GIBSON, G. R. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 769-797, 1990.
- GONZÁLEZ, I. N.; WANG, E. T.; REZ, F. R.; ROMERO, J. M.; RODRIGUEZ, C. H. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. **Anaerobe**, v. 12, p. 122–133, 2006.
- GREENE, E. A.; BRUNELLE, V.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7897-7901, 2006.

- GREENE, E. A.; HUBERT, C.; NEMATİ, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphideoxidizing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 607–617, 2003.
- HUBERT, C. & VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate-reducing *sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2644–2652, 2007.
- HUBERT, C.; NEMATİ, M.; JENNEMAN, G.; VOORDOUW, G. Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 338–345, 2003.
- HUBERT, C.; NEMATİ, M.; JENNEMAN, G.; VOORDOUW, G. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 272–282, 2005.
- ILHAN-SUNGUR, E.; CANSEVER, N.; COTUK, A. Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp.). **Corrosion Science**, v. 49, p. 1097–1109, 2006.
- IRIE, Y.; O'TOOLE, G. A.; YUK, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p. 237–243, 2005.
- ISA, M. H. & ANDERSON, G. K. Molybdate inhibition of sulphate reduction in two-phase anaerobic digestion. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2079–2089, 2005.
- JEFFERSON, K. K. MiniReview: What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 163–173, 2004.
- KAKSONEN, A. H.; SPRING, S.; SCHUMANN, P.; KROPPESTEDT, R. M.; PUHAKKA, J. A. *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from an underground mine located in a geothermally active area. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2603–2608, 2006.

- KJELDEN, K. U.; JOULIAN, C.; INGVORSEN, K. Effects of oxygen exposure on respiratory activities of *Desulfovibrio desulfuricans* strain DvO1 isolated from activated sludge. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 275–284, 2005.
- KJELDEN, K. U.; JOULIAN, C.; INGVORSEN, K. Oxygen tolerance of sulfate- reducing bacteria in activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 38–43, 2004.
- KJELLERUP, B. V.; VEEH, R. H.; SUMITHRARATNE, P.; THOMSEN, T. R.; MEYER, K. B.; FROLUND, B.; STURMAN, P. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p.163-170, 2005.
- KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N.; BLEHERT, D. S.; EGLAND, P. G.; FOSTER, J. S.; PALMER J R., Communication among oral bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 486–505, 2002.
- KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 295–304, 2001.
- KUMAR, A. V. R.; SINGH, R.; NIGAM, R. K. Mössbauer spectroscopy of corrosion products of mild steel due to microbiologically influenced corrosion. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 242, p. 131-137, 1999.
- LAMBERT, T. W.; GOODWIN, V. M.; STEFANI, D.; STROSHER, L. Review Hydrogen sulfide (H₂S) and sour gas effects on the eye. A historical perspective. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 1–22, 2006.
- LARSEN, J.; SANDERS, P. F.; TALBOT, R. E. Experience with the use of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) for the control of downhole hydrogen sulfide. Paper n°00123. Corrosion 2000.
- LASA, I. & PENADÉS, J. R. Mini-review: Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99–107, 2006.
- LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. Biofilm-associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 849–857, 2006.

- LEU, J. Y.; MCGOVERN-TRAA, C. P.; PORTER, A. J. R.; HARRIS, W. J.; HAMILTON, W. A. Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing. **Anaerobe**, v. 4, p. 165-174, 1998.
- LIU, T.; LIU, H.; HU, Y.; ZHOU, L.; ZHENG, B. Growth characteristics of thermophile sulfate-reducing bacteria and its effect on carbon steel. **Materials and Corrosion**, v. 59, p. 1-7, 2008.
- LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A. R.; ADELZADEH, M. R.; NOGHABI, K. A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Ira. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p.183–193, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10º Edição. Pearson. 2002, 624 p.
- MAIER, R. M. & CHÁVEZ, G. S. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.
- MIRANDA, E.; BETHENCOURT, M.; BOTANA, F. J.; CANO, M. J., SÁNCHEZ-AMAYA, J. M.; CORZO, A.; LOMAS, J. G.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B. Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexican oil field separator. **Corrosion Science**, v. 48, p. 2417-2431, 2006.
- MOUGIN, P.; LAMOUREUX-VAR, V.; BARITEAU, A.; HUC, A. Y. Thermodynamic of thermochemical sulphate reduction. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 58, p. 413–427, 2007.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, K. T.; SIVACHIDAMBARAM, P. Review: Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008.

- MUYZER, G. & STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews**, v. 6, p. 441-454, 2008.
- NEMATİ, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 852-859, 2001.
- O'TOOLE, G. A. To build a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2687–2689, 2003.
- OLLIVIER, B. & MAGOT, M. Petroleum Microbiology. ASM PRESS Washington, D.C. 2005, 365p.
- PADO, R. & PAWŁOWSKA-ĆWIEK, L. The Uptake and Accumulation of Iron by the Intestinal Bacterium *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771. **Folia Biologica (Kraków)**, v. 53, p. 79-81, 2005.
- PALLUD, C. & VAN CAPPELLEN, P. Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. **Geochimic**, v. 70, p. 1148-1162, 2006.
- PARSEK, M. R & GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **PNAS**, v. 97, p. 8789-8793, 2000.
- PARSEK, M. R. & FUQUA, C. Meeting review biofilms emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial Life. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4427–4440, 2004.
- PATIDAR, S. K. & TARE, V. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1215-1222, 2005.
- PENNA, M. O.; ANDRADE, C. A.; NASCIMENTO, J. R.; SILVA, E. D.; SOUZA, L. S. Avaliação da ação biocida de produtos para o controle de microrganismos associados a processos corrosivos em oleodutos da Bacia de Campos. Boletim Técnico Petrobrás, Rio de Janeiro, v. 44, p. 17-28, 2001.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude

- biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Technology**, v. 99, p. 1589–1595, 2008.
- PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, p. 1781–1785, 2008.
- QUEIROZ, J. C.; COELHO, M. V.; GÓES, F. J. T.; MENEZES, M. A. Control of sulfate reducing bacteria through the application of sodium molybdate. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems engineering. 2005.
- REMPEL, C. L.; EVITTS, R. W.; NEMATİ, M. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 878-886, 2006.
- ROSNES, J. T.; TORSVIK, T.; LIEN, T. Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2302-2307, 1991.
- SANCHEZ, R. T.; VARGAS, J. G.; ALONSO, A. A.; GÓMEZ, L. M. Corrosion of AISI 304 stainless steel induced by thermophilic sulfate reducing bacteria (SRB) from a geothermal power unit. **Materials and Corrosion**, v. 52, p. 614-618, 2001.
- SCHEID, D. & STUBNER, S. Structure and diversity of gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 175-183, 2001.
- SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 714-724, 2008.
- SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. **Corrosion Science**, v. 49, p. 2159-2176, 2007.
- SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Review: Molecular interactions in biofilms. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 859–871, 2002.

- SINGH, P. & CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, p. 142-146, 2004.
- SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 299-397, 2006.
- SPOERING, A. L. & GILMORE, M. S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p.133–137, 2006.
- STOODLEY, L. H.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Review: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p.187–209, 2002.
- STUBNER, S. & MEUSER, K. Detection of *Desulfotomaculum* in an italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, p. 73-80, 2000.
- TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATİ, M. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 73–94, 2009.
- TARDY-JACQUENOD C.; MAGOT, M.; PATEL, B. K. C.; MATHERON, R.; CAUMETTE, P. *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov, a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 333-338, 1998.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.
- VAN HOUTT, R. & MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 626–633, 2005.

- VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, p. 259 – 270, 2002.
- WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 15, p. 155–163, 2008.
- WHANG, S. & MULLIGAN, C. N. Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 296–301, 2009.
- WIDDEL, F. The genus *Desulfotomaculum*. The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York. 1992.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO BIOSSURFACTANTE RAMNOLIPÍDEO, DO BIOCIDA THPS E DO INIBIDOR METABÓLICO MOLIBDATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE METABÓLICA DE *Desulfotomaculum nigrificans*

2.1. INTRODUÇÃO

O processo de extração do petróleo inicia-se com a fase em que ele jorra na superfície por pressão natural no interior da jazida, a denominada fase primária. A esta, segue-se a fase secundária, na qual água é injetada no reservatório para restaurar a pressão interna e aumentar a vazão do petróleo (HUBERT & VOORDOUW, 2007). A injeção de água do mar, rica em sulfato, pode estimular o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, que causam prejuízos à indústria petroquímica, decorrentes da formação de biofilmes na superfície metálica e conseqüente corrosão de oleodutos e tanques-reservatório de petróleo, bem como da diminuição da qualidade do óleo extraído pela produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) (NEMATİ *et al.*, 2001; GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

As BRS constituem um grupo de microrganismos que apresentam ampla variação morfológica e metabólica e são geralmente reconhecidas como anaeróbias estritas. Elas são capazes de oxidar vários compostos orgânicos de baixo peso molecular, incluindo ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos, álcoois, hidrocarbonetos e compostos aromáticos, utilizando o íon sulfato como aceptor de elétrons (FANG *et al.*, 2002; PALLUD & VAN CAPPELLEN, 2006).

A produção de H_2S biogênico freqüentemente indica a atividade e a presença das bactérias redutoras de sulfato em ambientes naturais, sendo esse composto considerado o principal fator na atividade corrosiva desses microrganismos. A corrosão do aço nos tanques de armazenamento e o azedamento do óleo são os principais prejuízos decorrentes do aumento da concentração de H_2S na indústria petroquímica (ANTONIO *et al.*, 2000). Além disso, esse gás é tóxico ao homem (LAMBERT *et al.*, 2006).

Em decorrência dos numerosos prejuízos econômicos relacionados com a atividade metabólica de BRS na indústria petroquímica, muitas pesquisas têm sido direcionadas à prevenção e ao controle do crescimento dessas bactérias. Os

tratamentos químicos aplicados para esse fim envolvem principalmente o uso de agentes biocidas e inibidores metabólicos (GUIAMET & SARAIVA, 2005).

Dentre os agentes biocidas empregados na água de injeção para conter a atividade das BRS, destaca-se o sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) (NEMATİ *et al.*, 2001; GREENE *et al.*, 2006), um composto iônico solúvel em água e de amplo espectro.

O inibidor metabólico específico de BRS também utilizado com o mesmo propósito é o íon molibdato (MoO_4^{2-}), um análogo que inibe a redução do sulfato. O molibdato entra na célula pelo sistema de transporte de sulfato e interfere com a formação de adenosina fosfosulfato, intermediário essencial nas reações de redução de sulfato (PATIDAR & TARE, 2005; GREENE *et al.*, 2006).

Outras substâncias promissoras no controle da atividade metabólica de BRS incluem os surfactantes biológicos ou biossurfactantes. Trabalhos com esses compostos têm demonstrado seu potencial como agentes antimicrobianos (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004), bem como no controle da formação de biofilmes bacterianos (DAVEY *et al.*, 2003; SCHOOLING *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de misturas contendo THPS, molibdato de sódio e o biossurfactante ramnolípideo, no controle da atividade metabólica da bactéria redutora de sulfato *Desulfotomaculum nigrificans*.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios (LMA), localizado no Edifício Chotaro Shimoya, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

2.2.1. Microrganismo

A bactéria redutora de sulfato *D. nigrificans* DSM 574, foi fornecida pela Fundação André Tosello, Coleção de Culturas Tropical (CCT 902), Campinas-SP. Esse isolado foi cultivado em meio Baars modificado (meio ATCC 1249), contendo (g L⁻¹): MgSO₄ 2,0; citrato de sódio 5,0; CaSO₄ 1,0; NH₄Cl 1,0; K₂HPO₄ 0,5; extrato de levedura 1,0; lactato de sódio 3,5; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 0,004.

2.2.2. Condições de Cultivo

O meio Baars anaeróbio foi obtido por meio de fervura durante 20 minutos, seguida por borbulhamento de gás nitrogênio durante 15 minutos. Sob constante injeção de N₂, ele foi distribuído em frascos de penicilina com capacidade para 100 mL, nos quais também ocorria borbulhamento de N₂. Em seguida, os frascos foram lacrados com anel de alumínio e esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Após resfriamento, o meio Baars foi suplementado com soluções anaeróbias de MgSO₄ 120,48 g L⁻¹ e Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 0,5 g L⁻¹, preparadas e esterilizadas separadamente do restante do meio, em quantidade suficiente para se obter as concentrações finais descritas acima. A solução de MgSO₄ foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos; a de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ foi esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro, em câmara anaeróbia (Anaerobic System Thermoforma), sob atmosfera de 5 % de CO₂, 10 % de H₂ e 85 % de N₂.

Os frascos de penicilina contendo 40 mL de meio Baars anaeróbio foram inoculados, utilizando-se seringas esterilizadas, com a cultura de *D. nigrificans*, de modo a se obter uma D.O._{600nm} inicial de 0,05. Os frascos foram incubados em banho-maria a

55 °C. O pré-inóculo foi obtido por crescimento da bactéria no mesmo meio de cultivo por 48 horas, nas mesmas condições.

Alíquotas da cultura foram retiradas com seringa esterilizada logo após a inoculação e nos tempos de 12, 18, 24 e 36 horas de incubação, para determinação da concentração de sulfato no meio de cultura e estimativa do número de células viáveis. Os compostos (ramnolípido, THPS e molibdato de sódio) foram adicionados ao meio após coleta de amostra no tempo correspondente a 18 horas de incubação. A adição dos inibidores foi realizada em câmara anaeróbia.

2.2.3. Compostos Inibidores

Solução-estoque de molibdato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada anaerobicamente. O molibdato de sódio foi dissolvido em água Milli-Q anaeróbia e filtrado em membrana com poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro. O procedimento foi realizado em câmara anaeróbia.

O biosurfactante, constituído de mono e diramnolípido, foi obtido da Jeneil Biosurfactant Co (Saukuile, Wi, USA). A solução-estoque de uso nos experimentos foi obtida a partir de sua diluição em água Milli-Q anaeróbia, seguida por filtração em membrana com poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro. O procedimento foi realizado em câmara anaeróbia. Diluições da solução estoque foram utilizadas para se estimar a Diluição Micelar Crítica (DMC). As leituras de tensão superficial foram realizadas pelo método do anel de du Nouy (COOPER *et al.*, 1979), utilizando-se um tensiômetro (Fisher Surface Tensiomat, Modelo 21, Pittsburgh, EUA).

O reagente sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio 75 % em água (SIGMA 15175) foi mantido em câmara anaeróbia até o momento da sua utilização.

2.2.4. Determinação da Concentração de Sulfato

Alíquotas de $1,0 \text{ mL}$ foram retiradas com seringa esterilizada nos tempos descritos no item 2.2.2. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 1 minuto e o sobrenadante foi armazenado a 0 °C até a determinação da concentração de sulfato residual.

A concentração de sulfato no meio de cultivo foi determinada por método turbidimétrico proposto por KOLMERT *et al.*, (2000). Amostras foram diluídas 10 vezes em água Milli-Q e o volume de 1,0 mL foi misturado a 1 mL do reagente condicionante (NaCl 150 g L⁻¹, glicerol 100 mL L⁻¹, HCl 60 mL L⁻¹ e etanol 95 % 200 mL L⁻¹). A amostra foi misturada a 70 mg de BaCl₂.2H₂O e agitada em agitador de tubos (2500 rpm) durante 30 segundos. Imediatamente foi medida a absorvância a 420 nm. Foi construída uma curva-padrão, utilizando-se K₂SO₄ na concentração estoque de 50 mmol L⁻¹.

2.2.5. Estimativa do Número de Células Viáveis

A estimativa da concentração de células viáveis de *D. nigrificans* no meio de cultivo foi obtida por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP), proposta pela American Society of Testing and Material (ASTM) D4412-84 (2002).

Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas com seringa esterilizada nos tempos descritos no item 2.2.2 e inoculadas em frascos de penicilina contendo 4,5 mL de meio Baars anaeróbio. A concentração de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ utilizada no meio foi 0,5 g L⁻¹. Diluições seriadas foram realizadas por meio da transferência sucessiva de alíquotas de 0,5 mL em frascos de penicilina contendo 4,5 mL do mesmo meio anaeróbio. Três séries de diluições em cada tempo avaliado foram utilizadas para se estimar o número de células viáveis. As diluições foram realizadas em capela de fluxo laminar com auxílio de seringa esterilizada.

Os frascos inoculados foram incubados a 55 °C durante 5 dias. Resultado positivo do crescimento de *D. nigrificans* foi indicado pela turvação do meio e pela formação de precipitado negro, resultante da formação de FeS. Resultados duvidosos foram confirmados pela adição de 0,25 mL de solução de cloreto férrico (FeCl₃.6H₂O 27 g L⁻¹ em HCl 6 mol L⁻¹) e de 0,25 mL do reagente *p*-aminodimetilanilina (C₈H₁₂N₂.2HCl a 2 g L⁻¹ em HCl 6 mol L⁻¹) ao frasco. Após 10 minutos, reação de cor azul foi considerada como resultado positivo para a presença de H₂S e, portanto, do crescimento bacteriano na amostra.

Resultados positivos das diluições foram comparados aos da tabela para estimativa do número mais provável de células baseada em três séries de tubos, com intervalo de confiança em nível de 95 % de probabilidade (BLODGETT, 2003).

2.2.6. Planejamento Estatístico

O experimento foi conduzido segundo o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com cinco níveis para cada composto (Ramnolípídeo, THPS e Molibdato de sódio). Os limites inferiores e superiores foram respectivamente: 0 e duas vezes o valor da CMC do ramnolípídeo; 0 e 3 mmol L⁻¹ para o molibdato de sódio; 0 e 150 µL L⁻¹ do THPS 75 % em água (SIGMA 15175). Foram utilizadas quatro repetições no ponto central. O planejamento resultou em 18 unidades experimentais. A variável-resposta foi definida como número mais provável de células por mL ($\hat{y}$).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para analisar o delineamento experimental. A variável-resposta foi ajustada a um modelo de segunda ordem para correlacionar a variável resposta às variáveis independentes. O modelo de segunda ordem pode ser descrito da seguinte maneira:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

onde y é a variável-resposta predita, β_0 é o coeficiente de interceptação, β_i é o coeficiente dos efeitos lineares, β_{ii} é o coeficiente dos efeitos quadráticos, β_{ij} é o coeficiente dos efeitos de interação e x_i e x_j são as variáveis independentes codificadas (NETO *et al.*, 2003).

A Análise de Variância (ANOVA) foi a análise estatística usada para avaliar a significância estatística do modelo com os dados experimentais. Essa análise incluiu o teste de Fisher (teste F), bem como sua probabilidade associada (P-Valor). O teste de Student (teste t) foi utilizado para determinar os coeficientes da equação, bem como as probabilidades associadas aos mesmos (P-Valor), permitindo, portanto, estimar a significância estatística dos coeficientes da regressão. As análises de regressão foram realizadas utilizando-se o software estatístico MINITAB® (versão demo 15, Minitab Inc.).

Tabela 2.1. Matriz do planejamento estatístico segundo o DCCR para avaliação do efeito dos compostos na atividade metabólica de *D. nigrificans*. As variáveis independentes estudadas foram concentração de ramnolípideo, concentração de THPS e concentração de molibdato de sódio

Tratamentos	Ramnolípideo (xCMC)	THPS 75% ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Molibdato de Sódio (mmol L^{-1})
1	1,6	119,6	2,4
2	1,0	150,0	1,5
3	0,4	119,6	0,6
4	1,0	75,0	1,5
5	1,0	75,0	1,5
6	0,4	30,4	2,4
7	0,4	119,6	2,4
8	1,6	119,6	0,6
9	1,0	75,0	0,0
10	0,0	75,0	1,5
11	1,0	75,0	1,5
12	2,0	75,0	1,5
13	1,0	75,0	3,0
14	1,0	0,0	1,5
15	0,4	30,4	0,6
16	1,0	75,0	1,5
17	1,6	30,4	2,4
18	1,6	30,4	0,6

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Curva de Crescimento de *D. nigrificans*

A curva de crescimento de *D. nigrificans* em meio Baars anaeróbio a 55 °C (Figura 2.1) demonstra que a fase log de crescimento inicia-se após cerca de 13 horas e dura em torno de 11 horas. Durante esta fase, foi detectada intensa produção de H₂S, verificada pela liberação de gás e forte odor característico. Tem sido observado que, durante essa fase, a produção de H₂S aumenta com o aumento do número de células de BRS no meio de cultivo, atingindo valor máximo no final dessa fase (KUANG *et al.*, 2007), na qual o número de bactérias atinge valores próximos de 1x10⁹ células mL⁻¹ (LIU, *et al.*, 2008). A fase estacionária foi caracterizada por um curto período, menor que 3 horas, seguida pela fase de morte celular ou de esporulação.

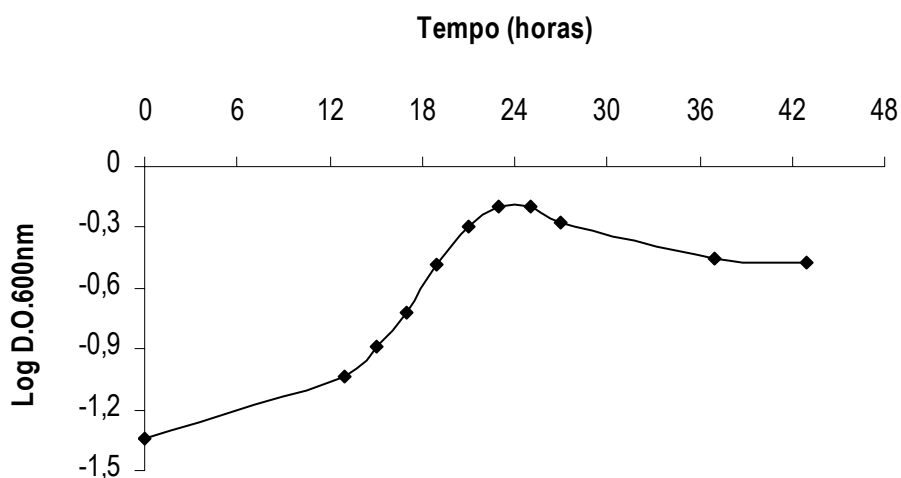


Figura 2.1. Curva de crescimento da bactéria *D. nigrificans* em meio Baars anaeróbio, incubada a 55 °C. Os dados representam as médias de três repetições.

Os dados de crescimento de *D. nigrificans* a 55 °C em meio Baars anaeróbio foram utilizados para se definir os tempos para avaliação do efeito dos compostos inibidores sobre a atividade metabólica dessa bactéria. Os tempos definidos foram de 0, 12, 18, 24 e 36 horas após a inoculação. A adição dos compostos foi efetuada 18 horas

após a inoculação, tempo coincidente com o meio da fase logarítmica de crescimento de *D. nigrificans*.

2.3.2. Efeito dos Compostos Sobre a Concentração de Células Viáveis de *D. nigrificans*

A tabela 2.2 apresenta o resultado da estimativa de células viáveis de *D. nigrificans* em resposta à adição dos compostos ramnolipídeo, THPS e molibdato de sódio nas 18 unidades experimentais avaliadas, bem como do controle sem adição dos compostos.

A análise de regressão entre a concentração dos compostos e a concentração de células viáveis de *D. nigrificans*, avaliada nos tempos 24 e 36 horas (correspondentes a 6 e 18 horas após a adição dos compostos ao meio de cultivo), não foi significativa ($P > 0,05$) (Tabela 2.3). Os resultados demonstram que não há diferença estatisticamente significativa entre os efeitos causados por cada composto nesses tempos, nas condições experimentais avaliadas. Entretanto, é possível observar (Tabela 2.2) que, em todos os tratamentos avaliados, houve efeito inibidor no crescimento celular, quando comparados ao tratamento sem adição de qualquer dos compostos avaliados (tratamento SI). A diferença na estimativa de células viáveis em relação ao tratamento-controle foi de pelo menos um ciclo log em todos os tratamentos, nos tempos de 24 e 36 horas de avaliação (Figura 2.2).

Tabela 2.2. Estimativa do número mais provável de células viáveis de *D. nigrificans*. Os resultados são mostrados para cada tratamento analisado segundo o planejamento no DCCR. Os compostos ramnolípideo, THPS e molibdato de sódio foram adicionados ao meio de cultivo no tempo referente a 18 horas de incubação em meio Baars a 55 °C. Os tempos avaliados foram 0, 12, 18, 24 e 36 horas de incubação. SI corresponde ao tratamento sem adição dos compostos

Tratamentos	Ramnolípideo (xCMC)	THPS 75 % ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Molibdato de Sódio (mmol L^{-1})	0 hora (10^6 mL^{-1})	12 horas (10^6 mL^{-1})	18 horas (10^6 mL^{-1})	24 horas (10^6 mL^{-1})	36horas (10^6 mL^{-1})
1	1,6	119,6	2,4	0,93	15	1100	7,5	7,5
2	1,0	150,0	1,5	4,6	15	93	4,3	1,5
3	0,4	119,6	0,6	0,75	110	460	4,3	4,3
4	1,0	75,0	1,5	11	9,3	93	15	110
5	1,0	75,0	1,5	4,6	12	240	7,5	2
6	0,4	30,4	2,4	2,4	2,8	460	4,3	9,3
7	0,4	119,6	2,4	0,93	46	110	9,3	15
8	1,6	119,6	0,6	0,93	46	1100	4,3	2,3
9	1,0	75,0	0,0	2,1	2,8	150	0,93	0,75
10	0,0	75,0	1,5	2,4	9,3	240	4,3	4,3
11	1,0	75,0	1,5	0,21	46	460	9,3	4,3
12	2,0	75,0	1,5	0,93	24	1100	46	4,3
13	1,0	75,0	3,0	11	2,3	150	0,93	3,8
14	1,0	0,0	1,5	0,93	15	120	0,75	2,1
15	0,4	30,4	0,6	11	15	290	24	9,3
16	1,0	75,0	1,5	0,75	46	1100	2,3	2,3
17	1,6	30,4	2,4	0,93	46	110	7,5	7,5
18	1,6	30,4	0,6	2,4	9,3	460	4,3	0,93
Sem Inibidor (SI)	0,0	0,0	0,0	2,4	7,5	1100	1500	290

Tabela 2.3. Análise de variância para o efeito dos compostos ramnolípido, THPS e molibdato de sódio sobre a concentração de células viáveis de *D. nigrificans* cultivada em meio Baars anaeróbio a 55 °C. A avaliação foi realizada nos tempos de 6 e 18 horas após adição dos compostos ao meio de cultivo

Tempo	Fonte de Variação	Grau de Liberdade (G.L)	Soma Quadrática	Média da Soma Quadrática	Valor F	P-Valor
6 h	Regressão	9	36,383	4,043	0,31	0,945 ^{n.s.}
	Linear	3	5,384	2,042	0,16	0,921 ^{n.s.}
	Quadrática	3	9,888	3,296	0,26	0,855 ^{n.s.}
	Interação	3	21,112	7,037	0,55	0,666 ^{n.s.}
	Resíduo	7	90,034	12,862		
	Falta de Ajuste	5	85,698	17,140	7,91	0,116 ^{n.s.}
	Erro Puro	2	4,335	2,168		
18 h	Regressão	9	102,096	11,3440	1,03	0,497 ^{n.s.}
	Linear	3	51,028	1,2358	0,11	0,950 ^{n.s.}
	Quadrática	3	11,20	3,7332	0,34	0,799 ^{n.s.}
	Interação	3	39,868	13,2895	1,20	0,376 ^{n.s.}
	Resíduo	7	77,304	11,0434		
	Falta de Ajuste	5	76,995	15,3990	99,71	0,010*
	Erro Puro	2	0,309	0,1544		

^{n.s.} Não-Significativo ao nível de 5% ($P \geq 0,05$)

* Significativo ao nível de 5% ($P < 0,05$)

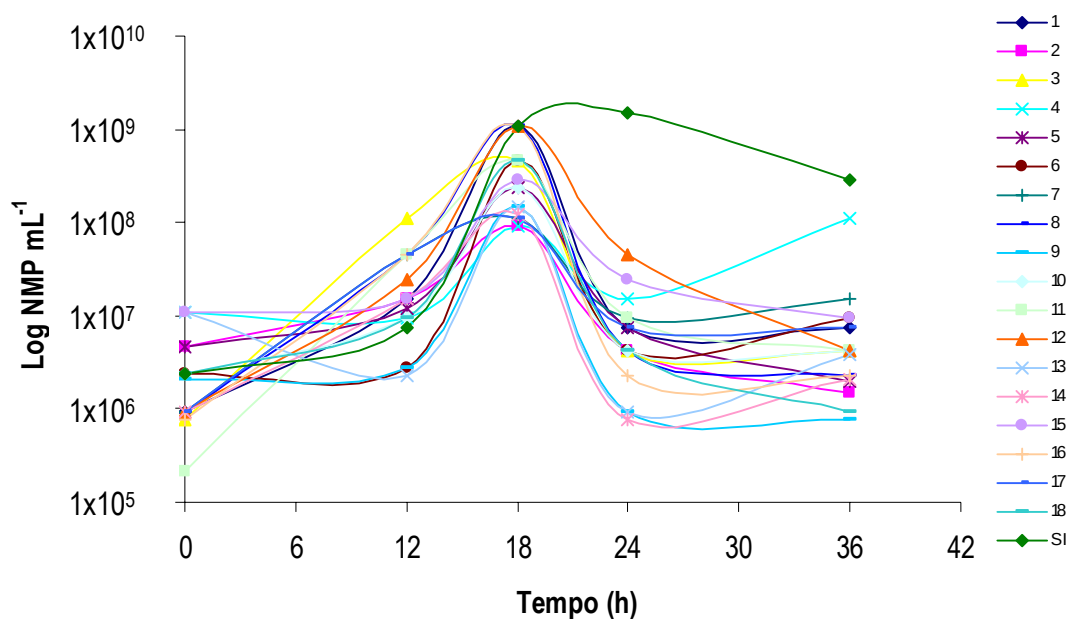


Figura 2.2. Efeito dos compostos ramnolípídeo, THPS e molibdato de sódio sobre a população de *D. nigrificans* cultivada em meio Baars anaeróbico a 55 °C. Os tratamentos de 1 a 18 correspondem às concentrações dos compostos no meio de cultivo apresentadas na Tabela 2.2. A adição dos compostos foi feita no tempo de 18 horas após a inoculação do meio de cultivo. SI corresponde ao tratamento sem adição dos compostos.

Não é descartada a possibilidade de que haja efeito significativo de algum composto nos tempos avaliados. No entanto, não foi possível estimá-lo, especialmente em razão da dificuldade de padronização do pré-inóculo, o que gerou diferenças de crescimento celular entre os tratamentos. Conseqüentemente, o número de células viáveis no tempo referente a 18 horas de crescimento foi muito variável entre os mesmos (Figura 2.2), o que dificultou o ajuste de um modelo de regressão que melhor descrevesse a variação dos dados experimentais.

2.3.3. Efeito dos Compostos Sobre a Atividade de Redução do Sulfato por *D. nigrificans*

Os dados de concentração de sulfato residual apresentados na Tabela 2.4 confirmam o efeito inibidor dos compostos avaliados na atividade metabólica de *D. nigrificans* nos tempos de 6 e 18 horas após sua adição ao meio de cultivo. Houve

inibição da redução do sulfato em todos os tratamentos, quando comparados ao tratamento sem adição dos compostos avaliados (tratamento SI).

Pouca variação foi verificada nas concentrações de sulfato residual entre os tempos 18, 24 e 36 horas de cultivo nos tratamentos com inibidores (Tabela 2.4 e Figura 2.3), o que demonstra efeito rápido e duradouro dos compostos utilizados sobre a atividade de redução de sulfato por essa bactéria. Esses resultados são contrastantes com os obtidos no tratamento-controle. Nesse tratamento, a concentração de sulfato no meio diminuiu de quase 20 mmol L⁻¹, no tempo de 18 horas, para aproximadamente 9 mmol L⁻¹ (tempo 24 horas), indicando que *D. nigrificans* permaneceu metabolicamente ativa após o tempo de 18 horas de cultivo. Nos tratamentos submetidos à ação dos inibidores, a média de concentração de sulfato residual, após a adição dos compostos inibidores (18 horas após a inoculação) manteve-se praticamente inalterada, próxima de 17 mmol L⁻¹.

Tabela 2.4. Concentração de sulfato residual no meio Baars. Os resultados são mostrados para cada tratamento analisado segundo o planejamento no DCCR. Os compostos ramnolípideo, THPS e molibdato de sódio foram adicionados ao meio de cultivo no tempo referente a 18 horas de incubação de *D. nigrificans* em meio Baars a 55 °C. Os tempos avaliados foram 0, 12, 18, 24 e 36 horas de incubação. SI corresponde ao tratamento sem adição dos compostos

Tratamentos	Ramnolípideo (CMC)	THPS 75 % ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Molibdato de Sódio (mmol L^{-1})	0 horas (mmol L^{-1})	12 horas (mmol L^{-1})	18 horas (mmol L^{-1})	24 horas (mmol L^{-1})	36horas (mmol L^{-1})
1	1,6	119,6	2,4	25,5	23,6	15,1	14,0	13,4
2	1,0	150,0	1,5	25,5	22,7	20,2	18,4	18,4
3	0,4	119,6	0,6	25,5	22,5	19,7	19,2	18,5
4	1,0	75,0	1,5	25,5	22,9	18,5	17,9	17,9
5	1,0	75,0	1,5	25,5	23,8	18,5	18,0	17,9
6	0,4	30,4	2,4	25,5	22,7	15,4	15,3	14,6
7	0,4	119,6	2,4	25,5	23,5	18,4	17,8	17,6
8	1,6	119,6	0,6	25,5	22,3	19,8	19,5	19,4
9	1,0	75,0	0,0	25,5	22,1	19,0	18,1	17,6
10	0,0	75,0	1,5	25,5	22,5	19,2	18,7	18,0
11	1,0	75,0	1,5	25,5	23,6	16,1	15,5	15,4
12	2,0	75,0	1,5	25,5	23,1	19,3	18,7	18,5
13	1,0	75,0	3,0	25,5	22,6	19,5	16,9	16,4
14	1,0	0,0	1,5	25,5	23,4	19,1	17,5	17,3
15	0,4	30,4	0,6	25,5	23,2	16,0	15,0	14,8
16	1,0	75,0	1,5	25,5	22,8	20,0	18,8	17,6
17	1,6	30,4	2,4	25,5	23,2	19,1	17,5	17,5
18	1,6	30,4	0,6	25,5	23,9	20,2	18,0	17,7
Sem Inibidor (SI)	0,0	0,0	0,0	25,5	21,6	19,6	9,1	9,0

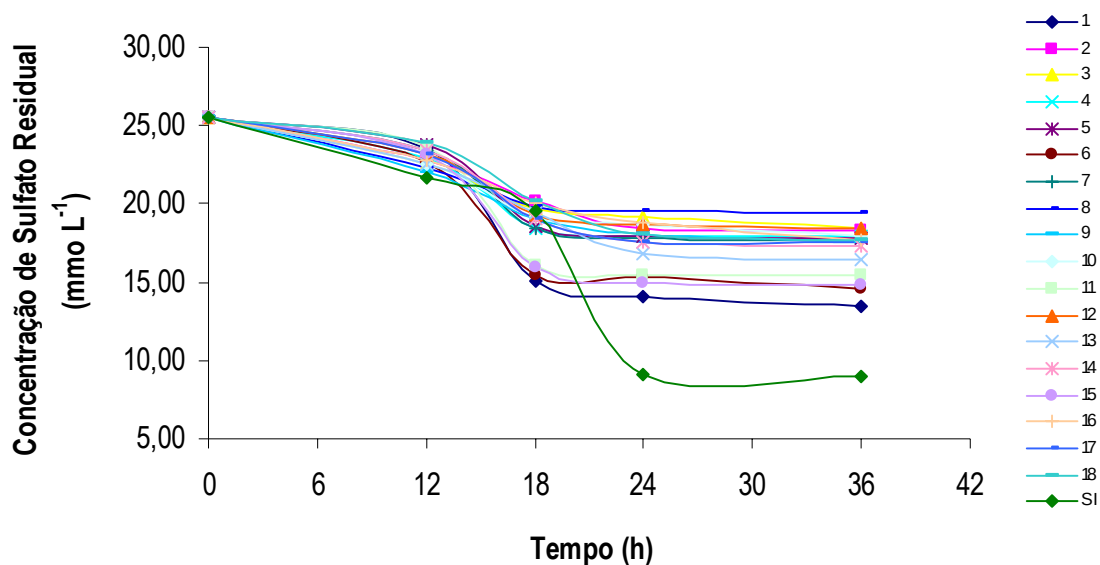


Figura 2.3. Efeito dos compostos ramnolípido, THPS e molibdato de sódio sobre a atividade de redução de sulfato por *D. nigrificans* cultivada em meio Baars anaeróbico a 55 °C. Os compostos foram adicionados ao meio de cultivo no tempo correspondente a 18 horas de incubação. Os tratamentos de 1 a 18 correspondem às concentrações dos compostos no meio de cultivo, apresentadas na Tabela 2.2. A adição dos compostos foi feita no tempo de 18 horas após a inoculação do meio de cultivo. SI corresponde ao tratamento sem adição dos compostos.

2.4. CONCLUSÕES

Os compostos ramnolípídeo, sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) e molibdato de sódio, adicionados ao meio de cultivo no meio da fase logarítmica, inibem o crescimento de *D. nigrificans* e a atividade de redução de sulfato por essa bactéria.

Os efeitos de inibição do crescimento celular e atividade de redução do sulfato por *D. nigrificans* foram independentes das concentrações avaliadas.

Não foi observada diferença ou interação entre os agentes inibidores testados quanto ao efeito sobre o crescimento celular e atividade de redução do sulfato por *D. nigrificans*.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIAL, Standard test methods for sulfate-reducing bacteria in water and water-formed deposits. 2002. Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.01. Designation: D4412-84.
- ANTONIO, M. R., KARET, G. B.; GUZOWSKI JR, J. P. Iron chemistry in petroleum production. **Fuel**, v. 79, p. 37–45, 2000.
- BLODGETT, R. Most probable number from serial dilutions. U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2003. Bacteriological Analytical Manual Online: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm
- CAMEOTRA, S. S. & MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262–266, 2004.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 4-10, 1979.
- DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 1027–1036, 2003.
- FANG, H. H. P.; XU, L. C.; CHAN, K. Y. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. **Water Research**, v. 36, p. 4709-4716, 2002.
- GONZÁLEZ, I. N.; WANG, E. T.; REZ, F. R.; ROMERO, J. M.; RODRIGUEZ, C. H. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. **Anaerobe**, v. 12, p. 122–133, 2006.
- GREENE, E. A.; BRUNELLE, V.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor

- nitrite and biocides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7897-7901, 2006.
- GUIAMET, P. S. & SARAIVA, G. G. Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. **Latin American Applied Research**, v. 35, p. 295-300, 2005.
- HUBERT, C. & VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2644–2652, 2007.
- KOLMERT, A.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K. B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p. 179-184, 2000.
- KUANG, F.; WANG, J.; YAN, L.; ZHANG, D. Effects of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of carbon steel. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 6084-6088, 2007.
- LAMBERT, T. W.; GOODWIN, V. M.; STEFANI, D.; STROSHER, L. Review hydrogen sulfide (H₂S) and sour gas effects on the eye. A historical perspective. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 1–22, 2006.
- LIU, T.; LIU, H.; HU, Y.; ZHOU, L.; ZHENG, B. Growth characteristics of thermophile sulfate-reducing bacteria and its effect on carbon steel. **Materials and Corrosion**, v. 59, p. 1-7, 2008.
- NEMATİ, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 852-859, 2001.
- NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Editora Unicamp. 2003, 401p.
- PALLUD, C. & VAN CAPPELLEN, P. Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. **Geochimica**, v. 70, p. 1148-1162, 2006.

PATIDAR, S. K. & TARE, V. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. **Bioresource Technology**, v. **96**, p. 1215-1222, 2005.

SCHOOLING, S. R.; CHARAF, U. K.; ALLISON, D. G; GILBERT, P. A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. **Biofilms**, v. **1**, p. 91–99, 2004.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO BIOSSURFACTANTE RAMNOLIPÍDEO, DO BIOCIDA THPS E DO INIBIDOR METABÓLICO MOLIBDATO DE SÓDIO SOBRE A ADESÃO DE *Desulfotomaculum nigrificans* A CUPONS DE AÇO INOXIDÁVEL

3.1. INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes é um processo multi-fásico, em que os microrganismos crescem aderidos a uma superfície inerte e produzem uma matriz de polímeros extracelulares. Uma das fases determinantes da formação de biofilmes é a de adesão celular à superfície. A adesão bacteriana às superfícies inertes é atribuída às interações atrativas entre as mesmas e as bactérias no meio circundante, as quais incluem forças de van der Waals, interações ácido-base e eletrostáticas (CHAMBERS *et al.*, 2006). Fímbrias, flagelos e polissacarídeos ou proteínas presentes na superfície celular são importantes na adesão e podem prover vantagem para o microrganismo numa comunidade mista. Fatores ambientais também regulam a formação de biofilmes bacterianos, como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e de aceptores de elétrons e concentração de metabólitos bacterianos (SINGH *et al.*, 2006).

Dentre os microrganismos envolvidos na formação de biofilmes e na biocorrosão de oleodutos, destacam-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Além de contribuírem para a ocorrência de corrosão, os biofilmes formados por essas bactérias causam diminuição do fluxo de óleo nos dutos, elevando com isso os gastos de energia para bombeamento e o desgaste prematuro de equipamentos (NEMATİ *et al.*, 2001a; REMPEL *et al.*, 2006). As BRS constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos em muitos ambientes anaeróbios, sendo geralmente reconhecidas como anaeróbias estritas. Elas apresentam ampla variação morfológica e metabólica, sendo capazes de oxidar vários compostos orgânicos utilizando o íon sulfato comoceptor de elétrons (FANG *et al.*, 2002; PALLUD & VAN CAPPELLEN, 2006).

Os tratamentos químicos aplicados para prevenir e controlar a corrosão causada por BRS na indústria petroquímica envolvem principalmente o uso de agentes biocidas e inibidores metabólicos (GUIAMET & SARAVIA, 2005).

Dentre os agentes biocidas empregados na indústria petroquímica, destaca-se o sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônio (THPS) (NEMATİ *et al.*, 2001b; GREENE *et al.*, 2006). O THPS é um composto iônico solúvel em água, que apresenta ação antimicrobiana rápida e de amplo espectro. Apresenta como vantagens, ainda, a fácil manipulação e baixa toxicidade ambiental (VIDELA, 2002).

Um inibidor metabólico específico de BRS, também utilizado com o mesmo propósito, é o íon molibdato (MoO_4^{2-}), um análogo que inibe a redução do sulfato. O molibdato entra na célula pelo mesmo sistema de transporte de sulfato e interfere com a formação da adenosina fosfosulfato, intermediário nas vias de redução do sulfato (PATIDAR & TARE, 2005; GREENE *et al.*, 2006).

Outras substâncias promissoras no controle de biofilmes bacterianos e com potencial aplicação no controle da adesão por BRS incluem os surfactantes biológicos ou biossurfactantes. Eles são compostos de origem biológica, constituídos de um grupo hidrofílico e outro hidrofóbico (VAN HAMME *et al.*, 2006) e são capazes de agir na interface entre duas fases fluidas com diferentes polaridades como óleo/água ou ar/água. Essa propriedade permite a tais moléculas reduzirem a tensão superficial em misturas óleo/água, tornando as moléculas hidrofóbicas mais solúveis no meio aquoso. Além disso, confere aos surfactantes excelentes propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes e dispersantes (DESAI & BANAT, 1997; VAN HAMME *et al.*, 2006), o que possibilita sua aplicação em vários setores industriais. Dada a grande preocupação atual com o lançamento de produtos químicos no ambiente, os biossurfactantes têm se tornado uma estratégia vantajosa em relação aos surfactantes sintéticos, principalmente por apresentarem baixa toxicidade e maior biodegradabilidade (LIMA, 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de misturas contendo THPS, molibdato de sódio e o biossurfactante ramnolipídeo sobre a adesão da bactéria redutora de sulfato *Desulfotomaculum nigrificans* em cupons de aço inoxidável AISI 304.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios (LMA) do Departamento de Microbiologia, localizado no Edifício Chotaro Shimoya.

3.2.1. Condições de Cultivo

Frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de meio Baars anaeróbio (Item 2.2.1), os compostos específicos de cada tratamento (Tabela 3.1) e cupons de aço inoxidável AISI 304 foram inoculados com a cultura de *D. nigrificans*. O procedimento foi realizado em câmara anaeróbia (Anaerobic System Thermoforma), sob atmosfera de 5 % de CO₂, 10 % de H₂ e 85 % de N₂. A D.O._{600nm} inicial foi ajustada para 0,05.

Cupons de aço inoxidável (10,0 x 10,0 x 0,50 mm) foram utilizados como suporte inerte para os ensaios de adesão celular de *D. nigrificans*. O aço inoxidável AISI 304 utilizado nesse experimento foi produzido pela Arcelor Mittal Inox Brasil. Cada cupom foi furado em um dos vértices, onde foi atravessado por fio de níquel-cromo de 0,50 mm para mantê-lo suspenso e imerso no meio de cultura. Cada haste de níquel-cromo continha três cupons, espaçados entre si pela moldura de um separador na haste. Em uma das extremidades de cada fio foi emoldurado um gancho adequado à sua fixação na boca de frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos contendo apenas os cupons foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121 °C. O meio de cultivo foi esterilizado separadamente como descrito no item 2.2.2 e adicionado (75 mL) aos frascos Erlenmeyer em câmara anaeróbia. Após a inoculação (DO_{600nm} inicial de 0,05), os frascos foram incubados a 55 °C em câmara anaeróbia. Os cupons foram retirados nos tempos 8, 16, 24, 48 e 96 horas após a inoculação para contagem de células aderidas por microscopia de epifluorescência.

3.2.2. Preparo dos Cupons de Aço Inoxidável

Anteriormente à sua utilização, os cupons e as hastes foram limpos com esfregação branda em detergente neutro, enxaguados em água de torneira, rinsados em etanol 95 % e em seguida rinsados em água destilada (LOPES *et al.*, 2005). Para reutilização dos mesmos, os cupons foram submetidos a ultra-som (Ultrasonic Cleaners – Modelo 1510; 40 kHz) durante 15 minutos para remoção de células aderidas. Em seguida, foram imersos em solução de ácido nítrico (HNO_3) a 10 % durante 20 minutos a 60 °C para remoção de eventuais produtos de corrosão, como sugerido pela American Society of Testing and Material (ASTM) G1-03 (2003). Após esse procedimento, eles foram limpos com esfregação branda em detergente neutro, enxaguados em água de torneira, rinsados em etanol 95 % e em seguida rinsados em água destilada.

3.2.3. Processamento de Amostras para Contagem de Células

Os cupons foram retirados dos frascos de cultura e rinsados em água destilada esterilizada para remoção de células não-aderidas. Em seguida, eles foram fixados em lâminas de microscopia usando fita adesiva de dupla face. Solução de KirK Patrick (álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído, 6:3:1) foi adicionada para fixar o material durante 10 minutos. Posteriormente, os cupons foram recobertos com solução de alaranjado de acridina a 0,04 % (PARIZZI, 1999), durante 5 minutos. O excesso de corante foi retirado por enxágüe brando do cupom em água destilada estéril. Os cupons corados foram examinados em microscópio de epifluorescência (Olympus) sob filtro IB2 e WG.

3.2.4. Quantificação de Células Aderidas

As células com fluorescência alaranjada observadas sob filtro IB2 e WG foram contadas em dois a quinze campos de cada cupom, dependendo da densidade de células aderidas por campo (DOWNES & ITO, 2001). O resultado foi expresso em contagem direta ao microscópio por cm^2 (CDM cm^{-2}).

3.2.5. Planejamento Estatístico

O experimento foi conduzido segundo o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com cinco níveis para cada composto (ramnolípídeo, THPS e molibdato de sódio). Os limites inferiores e superiores foram respectivamente: 0 e duas vezes o valor da CMC do ramnolípídeo; 0 e 3 mmol L⁻¹ para o molibdato de sódio; 0 e 150 µL L⁻¹ de THPS (SIGMA 15175). Foram utilizadas quatro repetições no ponto central. O planejamento resultou em 18 unidades experimentais (Tabela 3.1). As variáveis independentes estudadas - concentração de ramnolípídeo, concentração de THPS e concentração de molibdato de sódio - foram designadas respectivamente A, B, e C no planejamento. A variável-resposta foi definida como concentração de células aderidas por cm² ($\hat{y}$).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para analisar o delineamento experimental. A variável-resposta foi ajustada a um modelo de segunda ordem para se analisar sua correlação com as variáveis independentes, sendo o modelo dado por:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

onde y é a variável-resposta predita, β_0 é o coeficiente de interceptação, β_i é o coeficiente dos efeitos lineares, β_{ii} é o coeficiente dos efeitos quadráticos, β_{ij} é o coeficiente dos efeitos de interação e x_i e x_j são as variáveis independentes codificadas (NETO *et al.*, 2003).

A Análise de Variância (ANOVA) foi a análise estatística usada para avaliar a significância estatística do modelo aplicado aos dados experimentais. Essa análise incluiu o teste de Fisher (teste F), sua probabilidade associada (P-Valor), o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de variação (CV). O teste de Student (teste t) foi utilizado para determinar os coeficientes da equação, bem como as probabilidades associadas aos mesmos (P-Valor), permitindo, portanto, estimar a significância estatística dos coeficientes da regressão. As análises de regressão e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando-se o software estatístico MINITAB® (versão demo 15, Minitab Inc.).

Tabela 3.1. Matriz do planejamento estatístico segundo o DCCR para avaliação do efeito dos compostos na adesão de *D. nigrificans* a cupons de aço inoxidável AISI 304. As variáveis independentes estudadas foram concentração de ramnolípido, concentração de THPS e concentração de molibdato de sódio

Tratamentos	Ramnolípido (xCMC)	THPS 75% ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Molibdato de Sódio (mmol L^{-1})
1	1,6	119,6	2,4
2	1,0	150,0	1,5
3	0,4	119,6	0,6
4	1,0	75,0	1,5
5	1,0	75,0	1,5
6	0,4	30,4	2,4
7	0,4	119,6	2,4
8	1,6	119,6	0,6
9	1,0	75,0	0,0
10	0,0	75,0	1,5
11	1,0	75,0	1,5
12	2,0	75,0	1,5
13	1,0	75,0	3,0
14	1,0	0,0	1,5
15	0,4	30,4	0,6
16	1,0	75,0	1,5
17	1,6	30,4	2,4
18	1,6	30,4	0,6

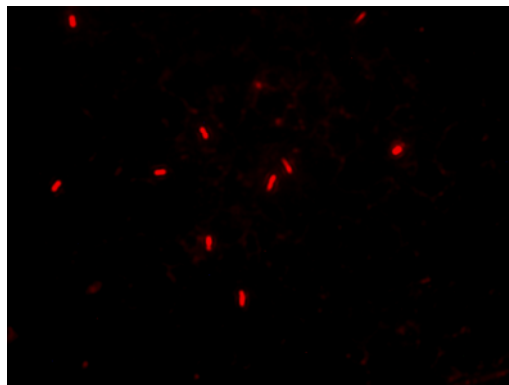
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Observações Microscópicas da Adesão de *D. nigrificans* em Cupons de Aço Inoxidável

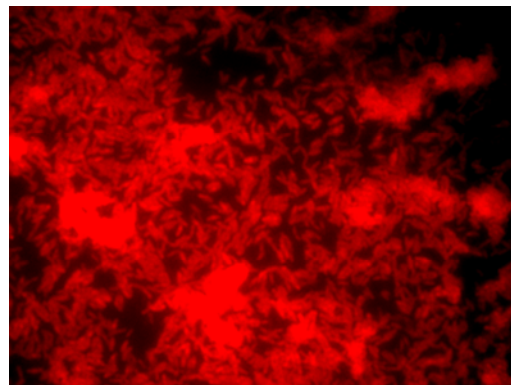
D. nigrificans foi capaz de formar biofilme em cupons de aço inoxidável AISI 304 quando cultivada em meio Baars modificado, a 55 °C em câmara anaeróbia sob atmosfera de 5 % de CO₂, 10 % de H₂ e 85 % de N₂. Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência evidenciaram adesão de discreto número de células aos cupons após 8 horas de cultivo (Figura 3.1). A concentração de células aderidas 16 horas após a inoculação foi a maior observada entre os tempos avaliados, ocasião em que foi observada a presença de microcolônias na superfície do aço. No entanto, foi observada desagregação do biofilme após 16 horas de incubação (tempos de 24 e 48 horas após a inoculação). Tem sido sugerido que o estado de inanição da célula possa ser um dos mecanismos responsáveis pela desagregação do biofilme e retorno da célula bacteriana ao estado planctônico, em busca de regiões com maior concentração de nutrientes (O'TOOLE *et al.*, 2000). Aumento na concentração de moléculas indutoras pode ser ainda responsável pela liberação de enzimas degradadoras dos polímeros da matriz, o que resulta em desprendimento das células do biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002). Após 96 horas de cultivo, verificou-se novo aumento do número de células de *D. nigrificans* aderidas à superfície dos cupons de aço inoxidável. Células mais alongadas e algumas vezes formando cadeias foram observadas nesse tempo de avaliação.

As etapas do processo de formação de biofilme por *D. nigrificans* em meio Baars, nas condições utilizadas nesse trabalho, podem ser descritas como – adsorção inicial das células de *D. nigrificans* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (8 h), desenvolvimento da estrutura do biofilme (16h), dispersão das células do biofilme (24 e 48 h) e recolonização da superfície (96 h).

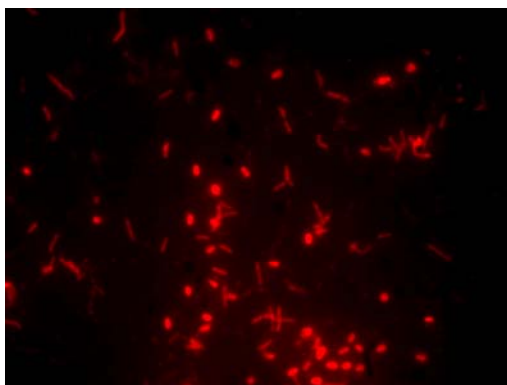
8 h



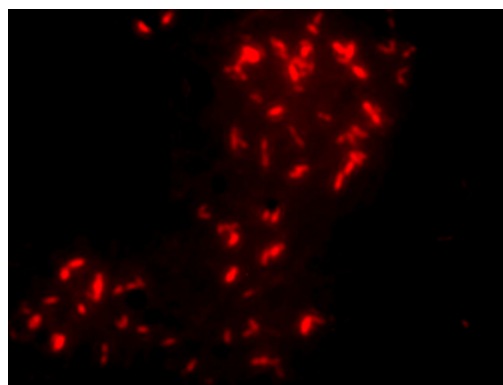
16 h



24 h



48 h



96 h

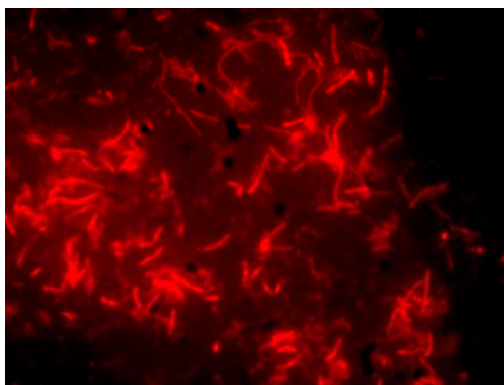


Figura 3.1. Microfotografias da formação de biofilme por *D. nigrificans* em cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico no período de 8 a 96 horas de incubação a 55 °C em câmara anaeróbia (D.O._{600nm} inicial de 0,05). Os cupons foram corados com alaranjado de acridina 0,4 % e observados em microscópio de epifluorescência em aumento de 1000 vezes sob filtro IB2.

3.3.2. Efeito dos Compostos Sobre a Adesão de *D. nigrificans* a Cupons de Aço Inoxidável

A tabela 3.2 apresenta o resultado da concentração de células de *D. nigrificans* aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304 em resposta à adição dos compostos ramnolípídeo, THPS e molibdato de sódio nas 18 unidades experimentais avaliadas, nos tempos de 8, 16, 24, 48 e 96 horas após inoculação dos meios de cultivo.

Entre os compostos avaliados, o molibdato de sódio foi o único que apresentou efeito significativo sobre a adesão de *D. nigrificans* aos cupons de aço inoxidável 304, 8 horas após a inoculação dos meios de cultivo (Tabela 3.3). No modelo de regressão obtido entre a concentração de células aderidas aos cupons de aço inoxidável e a concentração de molibdato de sódio, o coeficiente do termo linear apresentou valor negativo, o que significa que a concentração de células aderidas diminui com o aumento da concentração de molibdato de sódio. Por outro lado, como o coeficiente do termo quadrático é positivo, o aumento da concentração desse composto também tenderá a aumentar a concentração de células aderidas (Figura 3.1). Isso sugere que a região ótima de inibição da adesão de *D. nigrificans*, ou seja, menor concentração de molibdato de sódio com maior efeito inibidor em 8 horas de tratamento, encontra-se entre os limites mínimo e máximo utilizados neste estudo.

Tabela 3.2. Número de células de *D. nigrificans* aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304. Os resultados mostrados são de cada tratamento analisado segundo o planejamento no DCCR. Os compostos ramnolípideo, THPS e molibdato de sódio foram adicionados ao meio de cultivo logo após a inoculação de *D. nigrificans*. Os tempos avaliados foram 8, 16, 24, 48 e 96 horas de incubação em meio Baars a 55 °C em câmara anaeróbia

Tratamentos	Ramnolípideo (xCMC)	THPS 75 % ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Molibdato de Sódio (mmol L^{-1})	8 horas (10^3 cm^{-2})	16 horas (10^3 cm^{-2})	24 horas (10^3 cm^{-2})	48 horas (10^3 cm^{-2})	96horas (10^3 cm^{-2})
1	1,6	119,6	2,4	4,5	3,5	2,1	8,8	3,0
2	1,0	150,0	1,5	4,3	3,0	2,4	8,6	2,4
3	0,4	119,6	0,6	3,3	3,7	4,9	5,1	4,3
4	1,0	75,0	1,5	3,7	5,3	5,0	4,4	2,8
5	1,0	75,0	1,5	3,2	4,5	4,3	2,6	2,5
6	0,4	30,4	2,4	4,5	3,2	2,5	7,6	2,7
7	0,4	119,6	2,4	2,0	4,0	7,8	4,0	8,3
8	1,6	119,6	0,6	3,2	4,5	5,2	3,2	2,8
9	1,0	75,0	0,0	6,5	4,5	5,5	2,3	2,8
10	0,0	75,0	1,5	4,2	5,6	144,2	594,1	135,0
11	1,0	75,0	1,5	4,5	3,7	2,6	2,2	2,3
12	2,0	75,0	1,5	4,1	4,2	6,0	3,7	2,8
13	1,0	75,0	3,0	17,3	2,9	5,4	2,8	3,7
14	1,0	0,0	1,5	4,5	3,7	2,5	46,4	5,4
15	0,4	30,4	0,6	3,1	2,8	2,8	3,6	3,9
16	1,0	75,0	1,5	2,9	3,2	2,5	5,1	3,5
17	1,6	30,4	2,4	3,0	3,9	5,4	3,6	2,0
18	1,6	30,4	0,6	4,5	3,8	3,3	3,8	3,1

Tabela 3.3. Coeficientes da regressão entre a concentração de células de *D. nigrificans* aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbio a 55 °C e a concentração de molibdato de sódio, 8 horas após a inoculação do meio de cultivo (D.O._{600nm} inicial de 0,05)

Termo	Coeficiente	Valor t	P-Valor
Constante	7,239	3,958	0,001*
Molibdato de sódio (C)	-7,357	-2,868	0,012*
Molibdato de sódio x Molibdato de sódio (C ²)	2,948	3,596	0,003*

* Significativo ao nível de 5% (P<0,05)

Equação da regressão: $\hat{y} = 7,239^* - 7,357C^* + 2,948C^{2*}$

O CV obtido para os dados experimentais foi de 14,58 % (Tabela 3.4), sugerindo considerável precisão na avaliação. No entanto, o modelo ajustado para explicar a variação da concentração de células de *D. nigrificans* aderidas a cupons de aço inoxidável em função da concentração de molibdato de sódio, no tempo de 8 horas após a inoculação, apresentou falta de ajuste significativa (P-valor de 0,000), indicando que esse modelo não é o mais adequado para estimar a variável-resposta. Isso pode ser devido à alta influência de fatores aleatórios não-controláveis, ou ainda à falta de ajuste da própria metodologia aos dados experimentais. Apesar de ser aplicada em muitos processos químicos e biológicos, a metodologia de superfície de resposta pode não ser adequada em alguns tipos de processos, uma vez que ela é baseada no uso de equações de segundo grau, e muitos processos são melhor definidos por equações de ordens superiores. Embora seja possível predizer um modelo de equação utilizando ordens superiores, a maioria dos pacotes de programas estatísticos para aplicação da MSR usa equações de segunda ordem. Isso pode resultar em modelos ajustados que não são capazes de descrever com precisão o processo de interesse (BAS & BOYACI, 2007).

Tabela 3.4. Análise de variância do efeito dos compostos na adesão de *D. nigrificans* a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C, 8 horas após inoculação do meio de cultivo (D.O._{600nm} inicial de 0,05)

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (G.L)	Soma Quadrática	Média da Soma Quadrática	Valor F	P- Valor
Regressão	2	99,004	49,5021	8,54	0,003*
Linear	1	24,004	47,6971	8,22	0,012*
Quadrática	1	75,000	75,0004	12,93	0,003*
Resíduo	15	86,990	5,7993		
Falta de Ajuste	2	78,892	39,4460	63,32	0,000*
Erro Puro	13	8,098	0,6229		
Total	17	185,995			

* Significativo ao nível de 5% (P<0,05)

O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi 0,5323, o que significa que 53,23 % da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo ajustado. No entanto, os valores obtidos de R^2 não podem ser comparados com o valor máximo 1,0, uma vez que deve ser considerada a contribuição do erro puro. Já que não existe qualquer modelo que possa reproduzir a soma quadrática do erro puro, o valor máximo de variação explicável é a diferença entre a soma quadrática total e a soma quadrática devida ao erro puro (NETO *et al.*, 2003). Dessa maneira, a porcentagem máxima de variação explicável pela regressão é de 99,27 %. Isso significa que o modelo ajustado poderá explicar até 99,27 % dos dados observados se a interferência dos fatores aleatórios for mínima.

A superfície de resposta descrita pelo modelo de regressão ajustado é apresentada na figura 3.2. É possível observar que o molibdato de sódio apresenta efeito inibitório na adesão celular no intervalo entre 0 a 1,5 mmol L⁻¹. Nesse intervalo, nota-se diminuição na adesão celular à medida que a concentração desse composto aumenta, atingindo-se o ponto de menor número de células aderidas na presença de 1,5 mmol L⁻¹ de molibdato de sódio. Entretanto, a adesão celular apresenta tendência ao aumento sob concentrações superiores a essa. Portanto, a concentração de molibdato de sódio mais eficiente na inibição da adesão de *D. nigrificans* a cupons de aço inoxidável 304 em 8 horas, nas condições utilizadas nesse experimento, é de 1,5 mmol L⁻¹.

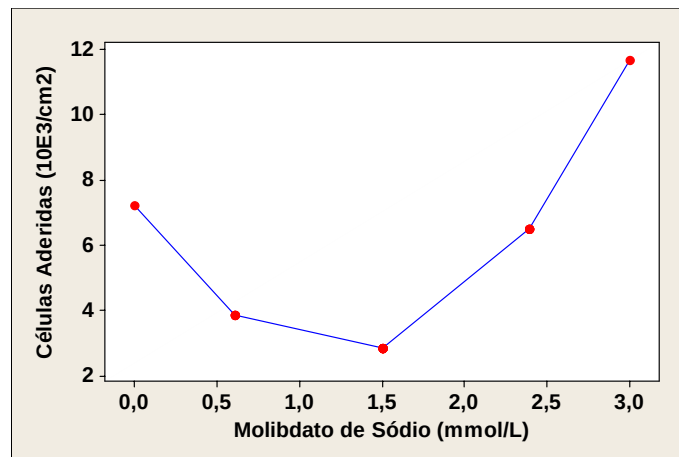


Figura 3.2. Variação da concentração de células de *D. nigrificans* aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304 em função da concentração de molibdato de sódio, no tempo de 8 horas após a inoculação. A bactéria foi cultivada em frascos Erlenmeyer contendo meio Baars anaeróbio a 55 °C em câmara anaeróbia com D.O._{600nm} inicial de 0,05.

Não há relatos na literatura sobre o efeito do molibdato na adesão de BRS em superfícies de aço inoxidável. No entanto, concentrações próximas à obtida nesse estudo foram reportadas por ISA & ANDERSON (2004) - 2,5 mmol L⁻¹ – como sendo capazes de inibir completa e imediatamente a redução de sulfato por uma cultura mista de BRS planctônicas. A ação do molibdato foi bacteriostática, uma vez que as células permaneceram viáveis após o tratamento. Além de diminuir as reservas de ATP na célula (TAYLOR & OREMLAND, 1979), o molibdato é ainda capaz de inibir imediatamente o transporte de sulfato para o interior das células de BRS (NEWPORT & NEDWELL, 1988). Apesar de interferir nas vias de redução dissimilativa e assimilativa de sulfato, BRS são muito mais sensíveis ao efeito do molibdato que outras bactérias não-redutoras de sulfato (TAYLOR & OREMLAND, 1979). O mesmo é observado em culturas de BRS em fase log de crescimento quando comparadas com culturas em fase estacionária, quando são necessárias concentrações mais elevadas de molibdato para inibir a redução do sulfato (NEMATİ *et al.*, 2001b). A concentração de molibdato de sódio mais eficaz para inibir a atividade metabólica de BRS é diretamente proporcional à concentração de biomassa de BRS (PATIDAR & TARE, 2005).

Nenhum dos compostos avaliados apresentou efeito significativo sobre a adesão da bactéria *D. nigrificans* aos cupons de aço inoxidável AISI 304 no tempo referente a 16 horas após a inoculação. A regressão foi não-significativa (P-valor = 0,670), indicando

que não há diferença significativa entre os efeitos causados pelos três compostos avaliados na adesão de *D. nigrificans*, 16 horas após a inoculação. Considerável precisão experimental foi indicada pelo valor de CV igual a 23,98 % (dados não-apresentados).

Nos tempos de 24, 48 e 96 horas após a inoculação dos meios de cultivo, verificou-se efeito significativo apenas do ramnolipídeo sobre a adesão de *D. nigrificans* aos cupons de aço inoxidável AISI 304. Segundo os modelos de regressão obtidos, a concentração de células aderidas aos cupons de aço inoxidável em 24, 48 e 96 horas após a inoculação, é explicada somente pela concentração de ramnolipídeo (Tabela 3.5), uma vez que as concentrações dos demais inibidores não tiveram efeito significativo sobre a variável-resposta analisada nesses tempos.

Os P-valores indicaram a significância dos coeficientes lineares e quadráticos da regressão para os três últimos tempos de avaliação (Tabela 3.5). O coeficiente do termo linear dos modelos de regressão entre a concentração de células aderidas e a concentração de ramnolipídeo apresentou valor negativo, o que significa que o aumento da concentração de ramnolipídeo resulta em menor concentração de células aderidas à superfície de aço inoxidável. Por outro lado, o coeficiente do termo quadrático é positivo, indicando que a elevação da concentração desse composto também tenderá a aumentar o número de células aderidas. Isto sugere que a região ótima de concentração do ramnolipídeo que inibe ao máximo a adesão celular de *D. nigrificans* em 24, 48 e 96 horas após a inoculação dos meios de cultivo, encontra-se entre os limites mínimo e máximo utilizados neste estudo.

Tabela 3.5. Coeficientes da regressão entre a concentração de células de *D. nigrificans* aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C e a concentração de ramnolipídeo em 24, 48 e 96 horas após a inoculação do meio de cultivo (D.O._{600nm} inicial de 0,05)

Tempo	Termo	Coeficiente	Valor t	P-Valor
24 h ^a	Constante	85,72	4,852	0,000*
	Ramnolipídeo (A)	-151,69	-4,081	0,001*
	Ramnolipídeo x Ramnolipídeo (A ²)	61,42	3,447	0,004*
48 h ^b	Constante	342,6	4,494	0,000*
	Ramnolipídeo (A)	-616,2	-3,842	0,002*
	Ramnolipídeo x Ramnolipídeo (A ²)	246,9	3,212	0,006*
96 h ^c	Constante	80,60	4,909	0,000*
	Ramnolipídeo (A)	-141,74	-4,103	0,001*
	Ramnolipídeo x Ramnolipídeo (A ²)	56,67	3,423	0,004*

* Significativo ao nível de 5% (P<0,05)

^a Equação da regressão: $\hat{y} = 85,72^* - 151,69A^* + 61,42A^{2*}$

^b Equação da regressão: $\hat{y} = 342,6^* - 616,2A^* + 246,9A^{2*}$

^c Equação da regressão: $\hat{y} = 80,60^* - 141,74A^* + 56,67A^{2*}$

O experimento apresentou CV de 10,34 %, 3,4 % e 4,93 % nos tempos de 24, 48 e 96 horas respectivamente, (Tabela 3.6), sugerindo satisfatória precisão dos dados experimentais obtidos nesses tempos. No entanto, as equações de regressão apresentaram falta de ajuste significativa (P-valor de 0,000), indicando que os modelos ajustados não são os mais adequados para estimar a variável-resposta, à semelhança do observado no tempo de 8 horas, quando molibdato de sódio foi o único composto capaz de causar efeito significativo sobre a concentração de células aderidas.

Tabela 3.6. Análise de variância do efeito dos compostos na adesão de *D. nigrificans* a cupons de aço inoxidável AISI 304 imersos em meio Baars anaeróbico a 55 °C em 24, 48 e 96 horas após inoculação do meio de cultivo (D.O._{600nm} inicial de 0,05)

Tempo	Fonte de Variação	Grau de Liberdade (G.L)	Soma Quadrática	Média da Soma Quadrática	Valor F	P-Valor
24 h	Regressão	2	10452,2	5226,10	9,66	0,002*
	Linear	1	4021,8	9011,74	16,65	0,001*
	Quadrática	1	6430,4	6430,43	11,88	0,004*
	Resíduo	15	8118,1	541,21		
	Falta de Ajuste	2	8078,9	4039,43	1337,44	0,000*
	Erro Puro	13	39,3	3,02		
	Total	17	18570,3			
48 h	Regressão	2	176241	88121	8,75	0,003*
	Linear	1	72324	148689	14,76	0,002*
	Quadrática	1	103917	103917	10,31	0,006*
	Resíduo	15	151121	10075		
	Falta de Ajuste	2	149487	74743	594,50	0,000*
	Erro Puro	13	1634	126		
	Total	17	327362			
96 h	Regressão	2	8804,7	4402,33	8,72	0,003*
	Linear	1	3387,8	2913,28	5,77	0,030*
	Quadrática	1	5416,9	5416,85	10,73	0,005*
	Resíduo	15	7572,8	504,85		
	Falta de Ajuste	2	7543,7	3771,87	1689,80	0,000*
	Erro Puro	13	29,0	2,23		
	Total	17	16377,4			

* Significativo ao nível de 5% (P<0,05)

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram, respectivamente 0,5628, 0,5384 e 0,5720, o que significa que os modelos ajustados explicam 56,28 %, 53,84 % e 57,20 % da variação observada nos dados obtidos nos tempos de 24, 48 e 96 horas após inoculação do meio de cultivo. No entanto, considerando a contribuição do erro puro, o valor máximo de variação explicável é de 99,97 %, 99,99 % e 99,99 %, respectivamente.

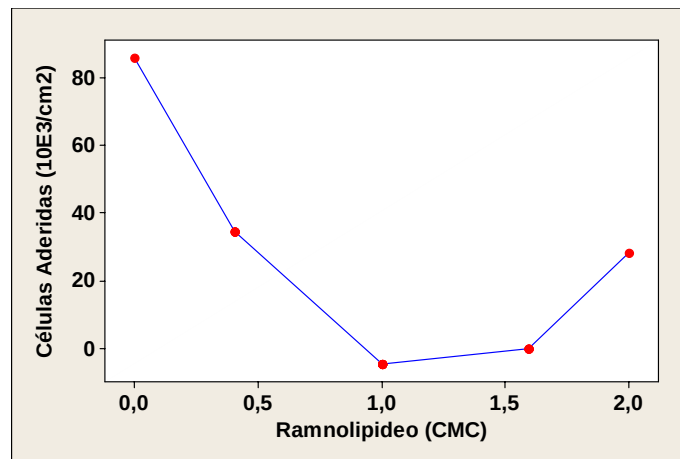
Observa-se, nas três superfícies de resposta descritas pelos modelos de regressão ajustados para os tempos de 24, 48 e 96 horas (Figura 3.3), que o

ramnolípídeo apresenta efeito inibitório na adesão celular de *D. nigrificans* no intervalo compreendido entre 0 e 1,6 vezes o valor da sua concentração micelar crítica (CMC). Nesse intervalo, nota-se diminuição na adesão celular à medida que a concentração desse composto aumenta, atingindo-se o ponto de mínima concentração de células aderidas no intervalo entre 1,0 e 1,6 vezes o valor da CMC do ramnolípídeo. Entretanto, a adesão celular apresenta tendência ao aumento quando concentrações superiores a esse intervalo são utilizadas. Portanto, concentrações de ramnolípídeo mais eficientes na inibição da adesão de *D. nigrificans* a cupons de aço inoxidável AISI 304, em 24, 48 e 96 horas após a inoculação do meio de cultivo e nas condições utilizadas nesse experimento, correspondem às concentrações compreendidas entre 1,0 e 1,6 vezes o valor da sua CMC, ou seja, entre 50 e 80 mg L⁻¹.

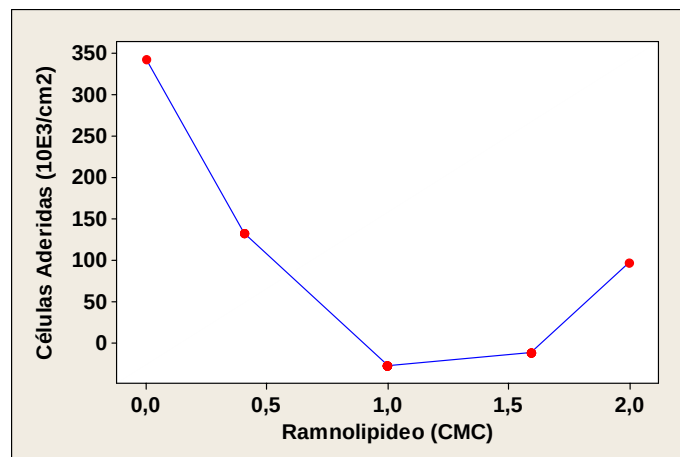
De acordo com os valores estimados dos coeficientes lineares e quadráticos para esses tempos, verifica-se que o efeito do ramnolípídeo na inibição da adesão de *D. nigrificans* é semelhante nos tempos de 24 e 96 horas após inoculação. Entretanto, esse efeito é aproximadamente quatro vezes maior no tempo de 48 horas após inoculação do meio de cultivo, quando comparado ao obtido em 24 e 96 horas.

Apesar de o mecanismo de ação do ramnolípídeo em processos de inibição da adesão bacteriana ser desconhecido, é sugerido que ele altere as propriedades de carga, interferindo nas interações célula-célula e célula substrato, promovendo a dispersão de células e prevenindo a colonização de superfícies (DAVEY *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; SCHOOLING *et al.*, 2004). Os surfactantes produzidos por microrganismos são capazes ainda de modificar a hidrofobicidade da superfície bacteriana e, conseqüentemente, alteram os processos de adesão bacteriana em superfícies (AHIMOU *et al.*, 2000). Além disso, tem sido proposto que a afinidade dos grupos hidrofóbicos dos surfactantes pelas membranas possa romper ligações entre lipídeos e proteínas, desestruturando a membrana das células bacterianas (SZYMAŃSKA, *et al.*, 2001) e impedindo a formação de biofilmes.

a) 24 h



b) 48 h



c) 96 h

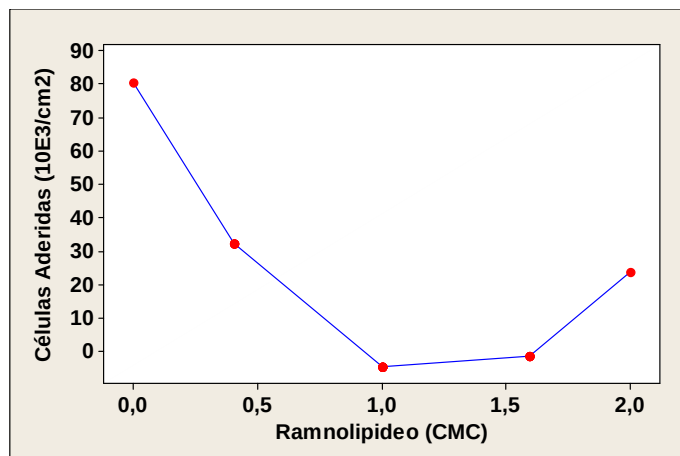


Figura 3.3. Variação do número de células de *D. nigrificans* aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304 em função da concentração de ramnolipideo, nos tempos de 24 (a), 48 (b) e 96 horas (c) após a inoculação. A bactéria foi cultivada em frascos Erlenmeyer contendo meio Baars anaeróbio a 55 °C em câmara anaeróbia (D.O._{600nm} inicial de 0,05). CMC representa a concentração micelar crítica.

O envolvimento do biossurfactante ramnolípídeo em eventos de dispersão e inibição da formação de biofilmes bacterianos tem sido reportado em outros trabalhos. SCHOOLING *et al.* (2004) verificaram que a adição de diramnolípídeo (200 mg L^{-1}) ao meio de cultura inibiu a formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* PAO01 em superfície de vidro, incubada a 37°C e a 100 rpm. No entanto, a transferência do biofilme formado por um período de 20 horas de cultivo ao meio suplementado com ramnolípídeo (200 mg L^{-1}) praticamente não afetou a sua estrutura, indicando que esse biossurfactante apresenta maior efeito sobre a adesão bacteriana do que na dispersão de biofilmes formados por *P. aeruginosa* PAO01, nas condições avaliadas. Observações similares foram reportadas por DAVEY *et al.*, (2003), utilizando a mesma linhagem bacteriana, porém meio de cultura e condições de cultivo diferentes. Eles verificaram que a adição de diramnolípídeo ($162,5 \text{ mg L}^{-1}$) inibiu a formação de biofilme por *P. aeruginosa* PAO01 em superfície de polivinilcloreto.

Ramnolípídeo produzido por *P. aeruginosa* também desagregou, em 24 horas, biofilme formado pelo patógeno *Bordetella bronchiseptica* em superfícies de poliestireno (microplacas) (IRIE *et al.*, 2005). A desagregação do biofilme não foi aparentemente causada por atividade bactericida, uma vez que a maioria das células liberadas permaneceu viável. A capacidade desse biossurfactante em romper biofilmes formados por bactérias patogênicas é crítico para estratégias de tratamento de doenças, uma vez que pode facilitar o acesso de antibióticos às células bacterianas liberadas do biofilme.

No presente trabalho, concentrações crescentes da mistura de mono e diramnolípídeo (0 a 80 mg L^{-1}) diminuíram significativamente a adesão de *D. nigrificans* à superfície de aço inoxidável. A formação de micelas parece ser um fator importante nesse processo, uma vez que a inibição da adesão foi máxima quando a concentração de ramnolípídeo atingiu valores entre 1,0 e 1,6 vezes a sua CMC. Esses resultados corroboram os de CHEN *et al.* (2004), que utilizaram concentrações crescentes de ramnolípídeo (100, 200, 400 e 800 mg L^{-1}) para desagregar biofilmes formados pelas bactérias gram positivas *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mitis* em sistema poroso de areia. O aumento das concentrações do ramnolípídeo injetado nos sistemas favoreceu a diminuição das interações entre célula e areia, e menos células permaneceram retidas na matriz porosa.

3.4. CONCLUSÕES

Molibdato de sódio foi o composto com ação mais rápida na inibição da adesão celular, uma vez que foi o único com efeito estatisticamente significativo no tempo referente a 8 horas de tratamento.

A concentração de molibdato de sódio na qual ocorre máxima inibição da adesão de *D. nigrificans*, 8 horas após a inoculação do meio de cultivo, foi de 1,5 mmol L⁻¹.

O biossurfactante constituído de mono e diramnilipídeo foi o agente inibidor que apresentou efeito mais satisfatório na inibição da adesão celular, sendo eficaz nos tempos de 24, 48 e 96 horas após a inoculação dos meios de cultivo.

A concentração de ramnilipídeo na qual ocorre máxima inibição da adesão de *D. nigrificans*, no período entre 24 e 96 horas após a inoculação do meio de cultivo, situa-se no intervalo entre 1,0 e 1,6 vezes o valor da sua CMC, ou seja, entre 50 e 80 mg L⁻¹ de ramnilipídeo.

Os resultados obtidos no presente trabalho incentivam pesquisas direcionadas à utilização do biossurfactante ramnilipídeo na inibição da formação de biofilmes por bactérias redutoras de sulfato gram positivas, termofílicas e formadoras de esporos, potencialmente prevenindo a biocorrosão causada por esse grupo bacteriano.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 749-754, 2000.
- AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIAL, Standard practice for preparing, cleaning and evaluating corrosion test specimens. 2003. Annual Book of ASTM Standards, Vol 03.02. Designation: G1-03.
- BAS, D. & BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836–845, 2007.
- CHAMBERS, L.D.; STOKES, K. R.; WALSH, F. C.; WOOD, R. J. K. Modern approaches to marine antifouling coatings. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 642–3652, 2006.
- CHEN, G.; QIAO, M.; ZHANG, H.; ZHU, H. Bacterial desorption in water-saturated porous media in the presence of rhamnolipid biosurfactant. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 655-661, 2004.
- DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v.185, p. 1027–1036, 2003.
- DESAI, J. D. & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- DOWNES, F. P. & ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. 4TH Edition. 2001, 676p.
- FANG, H. H. P.; XU, L. C.; CHAN, K. Y. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. **Water Research**, v. 36, p. 4709-4716, 2002.
- GREENE, E. A.; BRUNELLE, V.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7897-7901, 2006.

- GUIAMET, P. S. & SARAVIA, G. G. Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. **Latin American Applied Research**, v. 35, p. 295-300, 2005.
- IRIE, Y.; O'TOOLE, G. A.; YUK, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p. 237-243, 2005.
- ISA, M. H. & ANDERSON, G. K. Molybdate inhibition of sulphate reduction in two-phase anaerobic digestion. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2079–2089, 2005.
- LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. 2008. 169p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- LOPES, F. A.; MORIN, P.; OLIVEIRA, R.; MELO, L. F. The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. **Colloids and Surfaces**, v. 46, p. 127-133, 2005.
- NEMATI, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 852-859, 2001a.
- NEMATI, M.; MAZUTINEC, T. J.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Control of biogenic H₂S production with nitrite and molybdate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 350-355, 2001b.
- NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Editora Unicamp. 2003, 401p.
- NEWPORT, P. J. & NEDWELL, D. B. The mechanisms of inhibition of *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species by selenate and molybdate. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p. 419-423, 1988.
- O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

- PALLUD, C. & VAN CAPPELLEN, P. Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. **Geochimic**, v. 70, p. 1148-1162, 2006.
- PARIZZI, S. Q. F. Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas. 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PATIDAR, S. K. & TARE, V. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1215-1222, 2005.
- REMPEL, C. L.; EVITTS, R. W.; NEMATİ, M. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 878-886, 2006.
- SCHOOLING, S. R.; CHARAF, U. K.; ALLISON, D. G; GILBERT, P. A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. **Biofilms**, v. 1, p. 91–99, 2004.
- SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Review: Biofilms: implications in bioremediation **TRENDS in Microbiology**, v. 14, p. 388-397, 2006.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p.187–209, 2002.
- SZYMAŃSKA, K.; DOMKA, F.; WAWRZYNIAK, E. The effect of certain anionic detergents on the process of desulfurication. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 10, p. 11-14, 2001.
- TAYLOR, B. F. & OREMLAND, R. S. Depletion of adenosine triphosphate in *Desulfovibrio* by oxyanions of group VI elements. **Current Microbiology**, v. 3, p. 101-103, 1979.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.
- VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, p. 259 – 270, 2002.