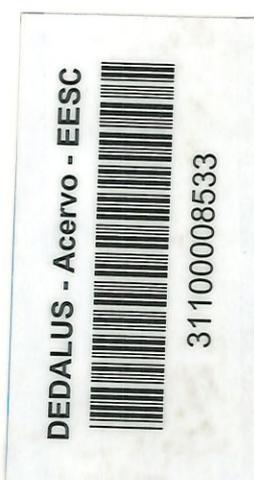


**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DO
ÍON SULFATO (BRS) ORIUNDAS DE CAMPOS DE EXPLORAÇÃO E
CONDUÇÃO DE PETRÓLEO**



SILVANA DE QUEIROZ SILVA

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Civil, Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento.

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller

São Carlos

Dezembro, 1999

Class.	TESE-EESC
Cutt.	5393
Tombo	016/00

31100008533

S/S 1070446

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

S586i Silva, Silvana de Queiroz
Isolamento e identificação de bactérias redutoras
do íon sulfato (BRS) oriundas de campos de exploração
e condução de petróleo / Silvana de Queiroz Silva. --
São Carlos, 1999.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos-Universidade de São Paulo, 1999.

Área: Hidráulica e Sanemaneto.

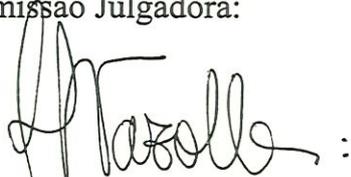
Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller.

1. BRS. 2. Redução desassimilativa do sulfato.
3. Sulfeto. 4. Cinética de crescimento. 5. Corrosão
microbiologicamente induzida. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Bacharela **SILVANA DE QUEIROZ SILVA**

Dissertação defendida e aprovada em 15-10-1999
pela Comissão Julgadora:



Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello")



Doutor **GILSON PAULO MANFIO**
(Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello")



Doutora **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE**
(Pesquisadora - FAPESP)



Prof. Associado **EDUARDO CLETO PIRES**
Coordenador da Área de Hidráulica e Saneamento



JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

FOURTH PAGE

Continued from page 3

Officially furnished to the public in 1950
per FOIA request

[Handwritten signature]

DO NOT WRITE IN THESE SPACES

[Handwritten signature]

DO NOT WRITE IN THESE SPACES

[Handwritten signature]
DO NOT WRITE IN THESE SPACES

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

*Dedico este trabalho aos meus pais, José e Joselina,
e aos meus irmãos Roberto e Milton,
por tudo, sempre ...*



"...é na inspiração do trabalho científico, na escolha dessa ou daquela linha de pesquisa por parte do cientista, no seu estilo de trabalho, que iremos encontrar o indivíduo; a necessidade de aprendermos sempre mais, de fazermos parte do constante processo de descoberta, de iluminarmos através da razão os escuros corredores da ignorância e do medo, de transcendermos as limitações da nossa percepção tão restrita desse vasto Universo."

Marcelo Gleiser

"A palavra oscila no espaço um momento. Eis que, sibilino, entre as aparências sem rumo, responde o poeta: Ao meu destino"

Carlos Drummond de Andrade

... a
... ..
... ..
... ..
... ..

...

... ..
... ..
... ..

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Eugênio Foresti, por ter permitido a minha aproximação do Laboratório de Processos Biológicos e o meu envolvimento em um projeto que originou a presente pesquisa;
- À Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller, meus agradecimentos não apenas pela orientação dispendida neste trabalho, sugestões e discussões, mas também pelo grande estímulo e orientação ao caminho da ciência;
- À Dr^a. Maria Bernadete Varesche, “responsável” pelos meus primeiros passos no “mundo anaeróbio”; pela confiança e amizade; pelo apoio e sugestões durante a realização dos experimentos;
- À Bióloga Juliana Calabria, pelo precioso apoio na fase inicial deste trabalho e pela amizade;
- Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva, pelo auxílio no tratamento matemático dos dados;
- À Prof^a. Elizabeth de Matos Moraes pelas constantes e preciosas ajudas, principalmente nas análises cromatográficas;
- À Kátia Prates, Suzy Sarzi, Regiane Correa, Beth Baraldi, Izabel Sakamoto, Neyson Mendonça, Eloísa Pozzi e Sérgio Larizatti, com quem tive o prazer de dividir o Laboratório de Microbiologia;
- Ao querido Sérgio F. Aquino, mais que pela ajuda técnica, pelo exemplo, pelo carinho, pela companhia, e principalmente por ter tornado meus dias muito mais agradáveis;
- Aos professores e à turma de mestrado de 1997, em especial aos amigos: Ajadir Fazolo, Giovana Tommaso, Marcus Vallero, Marina Marchioretto, Luciana Nalin, Flávia Talarico, Márcia Telh, Ricardo Constanzi, Alexandre Silveira, Patricia Souza, e Guilherme Marques, por tudo que aprendemos juntos;
- Aos amigos do Laboratório de Processos Biológicos;

- *A todos do Departamento de Hidráulica e Saneamento que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Técnico Júlio Trofini pelo auxílio na metodologia de dosagem de sulfato; ao Valdecir Arruda pela colaboração na impressão dos pôsters de apresentação; ao Aparecido Arruda pelas constantes ajudas computacionais, à Pavi e Sá pela acessoria nos processos burocráticos;*
- *À Capes, pela bolsa de fomento;*
- *Ao Cenpes/Petrobrás pelas amostras e pela permissão em publicar os resultados;*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS.....	5
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
3.1 Ecologia e distribuição das bactérias redutoras do íon sulfato.....	7
3.2 O papel das bactérias redutoras do íon sulfato nos processos naturais e tecnológicos.	14
3.2.1 Relação com outras bactérias no ciclo do enxofre.....	14
3.2.2 Degradação anaeróbia da matéria orgânica.....	17
3.2.3 A participação das BRS no processo de biocorrosão anaeróbia.....	18
3.2.4 Biocorrosão em indústrias petrolíferas.....	24
3.3 Taxonomia e caracterização das bactérias redutoras do íon sulfato.....	28
3.4 Diversidade nutricional das bactérias redutoras do íon sulfato com relação à	
oxidação dos substratos orgânicos e redução dos compostos inorgânicos.....	34
3.4.1 Substratos utilizados como fonte de carbono e energia para a redução	
do sulfato.....	34
3.4.2 Compostos inorgânicos utilizados como aceptores finais de elétrons.....	45
3.4.3 Taxas de crescimento e tempo de geração de culturas de BRS.....	48

3.4.4 Inibição da redução do sulfato e toxicidade do sulfeto.....	50
3.5 Bioquímica da redução desassimilativa do íon sulfato.....	52
3.6 Métodos de estudos aplicados para BRS.....	57
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Origem das amostras e relação das atividades experimentais.....	61
4.2 Caracterização morfológica I.....	64
4.3 Cultivo controlado das amostras.....	64
4.4 Isolamento das culturas de BRS.....	67
4.5 Caracterização morfológica II - Culturas isoladas	69
4.6 Ensaio de resposta fisiológica das culturas isoladas.....	70
4.6.1. Análise fisiológica I – Avaliação da resposta fisiológica das culturas isoladas cultivadas em diferentes fontes de carbono.....	70
4.6.2 Análise fisiológica II – Avaliação da resposta fisiológica das culturas FW2 e SW1 cultivadas em diferentes fontes de carbono e aceptores de elétrons	71
4.6.2.1 Quantificação de proteína celular.....	74
4.7 Avaliação da cinética de crescimento da cultura SW1.....	76
4.7.1 Método para dosagem de sulfato.....	76
4.7.2 Método para dosagem de sulfeto total.....	77
4.7.3 Método para dosagem de ácidos orgânicos.....	78
4.7.4 Avaliação dos valores obtidos.....	79
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 Caracterização morfológica I.....	82
5.2 Cultivo controlado.....	85
5.3 Isolamento das culturas redutoras do íon sulfato.....	86
5.3.1 Amostra SW1.....	86

5.3.2 Amostra FW2.....	89
5.3.3 Amostra SW2.....	91
5.3.4 Amostra FW1.....	92
5.4 Caracterização morfológica e fisiológica das culturas isoladas.....	94
5.4.1 Cultura FW1.....	94
5.4.2 Cultura SW2.....	98
5.4.3 Cultura FW2.....	101
5.4.4 Cultura SW1.....	112
5.5 Avaliação da cinética de crescimento da cultura SW1 sob	
condições salinas.....	119
5.5.1 Valores de velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração	
da cultura SW1.....	120
5.5.2 Avaliação do consumo de sulfato e produção de sulfeto pela cultura SW1.....	123
5.5.3 Avaliação do consumo do ácido láctico e produção de ácido acético pela cultura	
SW1.....	130
5.5.4 Avaliação geral do metabolismo da cultura SW1.....	135
6 – CONCLUSÕES.....	139
7 – RECOMENDAÇÕES.....	143
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
ANEXO A.....	157
ANEXO B.....	161
APÊNDICE.....	165

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Esquema das transformações biológicas envolvidas no ciclo do enxofre.....	15
FIGURA 3.2	Processo de formação de um biofilme sobre uma superfície inerte (VIDELA, 1995).....	19
FIGURA 3.3	Distribuição dos diferentes grupos metabólicos no interior de um biofilme segundo a concentração de oxigênio (HAMILTON e MAXWELL; 1986).....	20
FIGURA 3.4	Processo corrosivo envolvendo BRS hidrogenase positiva e negativa (FONSECA <i>et al.</i> , 1994; CORD-RUWISH e WIDDEL, 1986).....	24
FIGURA 3.5	Diagrama esquemático da diversidade de estruturas e sistemas afetados por biocorrosão e “biofouling” na indústria de petróleo <i>offshore</i> (SANDERS e HAMILTON, 1986; VIDELA, 1995).....	26
FIGURA 3.6	Interação entre bactérias aeróbias, anaeróbias e facultativas presentes em fluidos de campos de petróleo (WESTLAKE <i>et al.</i> , 1986; SEMPLE e OBUEKWE, 1986).....	27
FIGURA 3.7	Árvore filogenética baseada no RNAr 16S de algumas espécies de BRS (KNOBLAUCH <i>et al.</i> , 1999).....	29
FIGURA 3.8	Caminhos propostos da redução da adenosina fosfosulfato (APS) e do bissulfito (HSO_3^-) em escala de oxi-redução; (a) caminho da redução sequencial do bissulfito via tritionato ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$) e tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$); (b) caminho da redução direta do bissulfito a sulfeto (H_2S).....	54
FIGURA 3.9	Esquema geral do processo metabólico envolvido na redução do sulfato em presença de lactato como fonte de energia em <i>Desulfovibrio</i> sp (modificado de BROCK <i>et al.</i> , 1994).....	55

FIGURA 4.1	Relação das atividades realizadas; (a) relação das atividades experimentais e os procedimentos aplicados; (b) atividades experimentais realizadas para cada amostra.....	63
FIGURA 4.2	Esquema da coleta da colônia em “Roll-Tube”; (a) retirada de um volume do meio de cultura previamente reduzido; (b) coleta da colônia sob fluxo de nitrogênio (100%); (c) introdução do volume com a colônia coletada no interior do frasco de cultivo.....	69
FIGURA 4.3	Esquema da preparação dos inóculos utilizados no ensaio fisiológico II.....	72
FIGURA 5.1	Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra SW1, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).....	83
FIGURA 5.2	Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra FW1, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).....	83
FIGURA 5.3	Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra FW2, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).....	84
FIGURA 5.4	Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra SW2, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).....	84
FIGURA 5.5	Morfologias encontradas no cultivo controlado, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto) (a) amostra SW1; (b) amostra FW1; (c) amostra FW2; (d) amostra SW2.....	87
FIGURA 5.6	Esquema do isolamento da cultura SW1 através de diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados sse referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS, as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes.....	89
FIGURA 5.7	Esquema do isolamento da cultura FW2, pelo método do “Roll-Tube” e das diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados sse referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS, as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes	90

- FIGURA 5.8 Microfotografia da colônia isolada da asmotra FW2 em “Roll-Tube”(microscopia comum; ocular 10; objetiva 4; zoom, de 1,25 e ampliação da foto)..... 91
- FIGURA 5.9 Esquema do isolamento da cultura SW2 através de diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados sse referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS, as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes..... 92
- FIGURA 5.10 Esquema do isolamento da cultura FW1 através do método do “Roll-Tube”e de diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados sse referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS, as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes..... 93
- FIGURA 5.11 Bacilos curvos presentes na cultura FW1 (a) sob condições não salinas; (b) e (c) sob condições salinas; (a,b observados sob microscopia de contraste de fase, ocular10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto; c observados sob MEV)..... 100
- FIGURA 5.12 Bacilos curvos presentes na cultura SW2, observados sob microscopia de contraste de fase (ocular10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto). 100
- FIGURA 5.13 Diferenças morfológicas apresentadas pela cultura FW2, (a) cultivo sob condições não salinas em lactato, (b) cultivos sob condições não salinas em malato, (c) cultivo sob condições salinas em lactato, (d) cultivo sob condições salinas em sulfito, (e) cultivo sob condições salinas em tiosulfato, (f) cultivo sob condições salinas em 27mM de sulfato. Microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)..... 103
- FIGURA 5.14 Diferença na morfologia celular verificada na cultura FW2 durante os cultivos na presença de sulfato e lactato; (a) cultivo em condições não salinas; (b) cultivo em condições salinas; (MEV)..... 104
- FIGURA 5.15 Bacilos curvos presentes na cultura SW1, observados sob (a) microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto) e (b) MEV..... 114
- FIGURA 5.16 Diferença morfológica apresentada pela cultura SW1; (a) tiosulfato e (b) sulfito, ambos na presença de 27 mM de sulfato (c) e (d) formação de um filamento na ausência de ferro; todas observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)..... 114

- FIGURA 5.17 Curva de crescimento em escala logarítmica da cultura SW1, pertencente ao gênero *Desulfovibrio*, cultivada sem agitação, (a) curvas obtidas para cada réplica; (b) curva média das réplicas; a fase exponencial da qual foi obtido o coeficiente linear da reta situou-se entre $t=4$ e $t=18$ dias..... 121
- FIGURA 5.18 Curva de crescimento em escala logarítmica da cultura SW1, pertencente ao gênero *Desulfovibrio*, cultivada sob agitação, (a) curvas obtidas para cada réplica; (b) curva média das réplicas; a fase exponencial da qual foi obtido o coeficiente linear da reta situou-se entre $t=2$ e $t=8$ dias..... 122
- FIGURA 5.19 Distribuição dos valores médios de sulfato e sulfeto nos cultivos sem agitação da cultura SW1. No início do experimento a concentração de sulfato e sulfeto foram 3,12 g/L e 1,05 mg/L, respectivamente, e após 23 dias de incubação a concentração de sulfato diminuiu para 2,72 g/L e de sulfeto aumentou para 121,6 mg/L..... 125
- FIGURA 5.20 Distribuição dos valores médios de sulfato e sulfeto nos cultivos com agitação da cultura SW1. No início do experimento a concentração de sulfato e sulfeto foram 3,24 g/L e 1,53 mg/L, respectivamente, e após 23 dias de incubação a concentração de sulfato diminuiu para 2,38 g/L e de sulfeto aumentou para 275 mg/L..... 126
- FIGURA 5.21 Gráficos da velocidade de consumo de sulfato, produção de sulfeto e de proteína celular pela cultura SW1; (a) cultivos sem agitação (b) cultivos com agitação. As velocidades indicadas como negativas, por se tratar de consumo, devem ser analisadas em valor absoluto..... 129
- FIGURA 5.22 Distribuição dos valores médios dos ácidos láctico e acético nos cultivos sem agitação da cultura SW1. No início do experimento as concentrações de ácido láctico foi 3389 mg/L; após 23 dias de incubação a concentração de ácido láctico diminuiu para 1493 mg/L e a de ácido acético aumentou para 273,86 mg/L..... 131
- FIGURA 5.23 Distribuição dos valores médios dos ácidos láctico e acético nos cultivos com agitação. No início do experimento as concentrações de ácido láctico foi 2927 mg/L; após 23 dias de incubação a concentração de ácido láctico diminuiu para

	418 mg/L	mg/L	e a de ácido acético aumentou para	552 mg/L.....	132	
FIGURA 5.24	Gráficos da velocidade de consumo de ácido láctico, produção de ácido acético e proteína celular da cultura SW1; (a) cultivos sem agitação (b) cultivos com agitação. As velocidades indicadas como negativas, por se tratar de consumo, devem ser analisadas em valor absoluto.....					134
FIGURA 5.26	Cromatogramas obtidos durante as análises dos ácidos voláteis em uma das réplicas cultivada sob agitação constante; (a) no tempo inicial (t=0d) (b) no tempo final (t=23 d).....					137
FIGURA A.1	Curva padrão de proteína				158	
FIGURA A.2	Curva padrão de sulfato.....				158	
FIGURA A.3	Curva padrão de sulfeto.....				159	
FIGURA A.4	Curva padrão de ácido acético.....				159	
FIGURA A.5	Curva padrão de ácido láctico.....				160	
FIGURA B.1	Cromatograma obtido pela injeção do meio de cultura P.E.m, esterilizado e acrescido das soluções estoque. O tempo de retenção 5,970 corresponde ao sulfato presente tanto no meio de cultura quanto na fase móvel; o tempo de retenção 11,826 corresponde ao ácido láctico; o tempo de retenção 15,126 pode estar relacionado ao tioglicolato; os demais são desconhecidos.....					162
FIGURA B.2	Cromatograma obtido pela injeção de uma solução de ácido fórmico e acético. O tempo de retenção 13,710 corresponde ao ácido acético e o tempo de retenção 12,833 pode estar relacionado ao ácido fórmico.....					163
FIGURA B.3	Cromatograma obtido pela injeção de uma solução de ácido pirúvico. O tempo de retenção 6,193 corresponde ao sulfato presente na fase móvel e o tempo de retenção 7,700 pode estar relacionado ao ácido pirúvico.....					164
FIGURA C.1	Trecho da carta do Cenpes/Petrobrás autorizando a publicação dos dados...				165	
FIGURA C.2	Origem da amostra SW1 (CENPES, 1996).....				167	

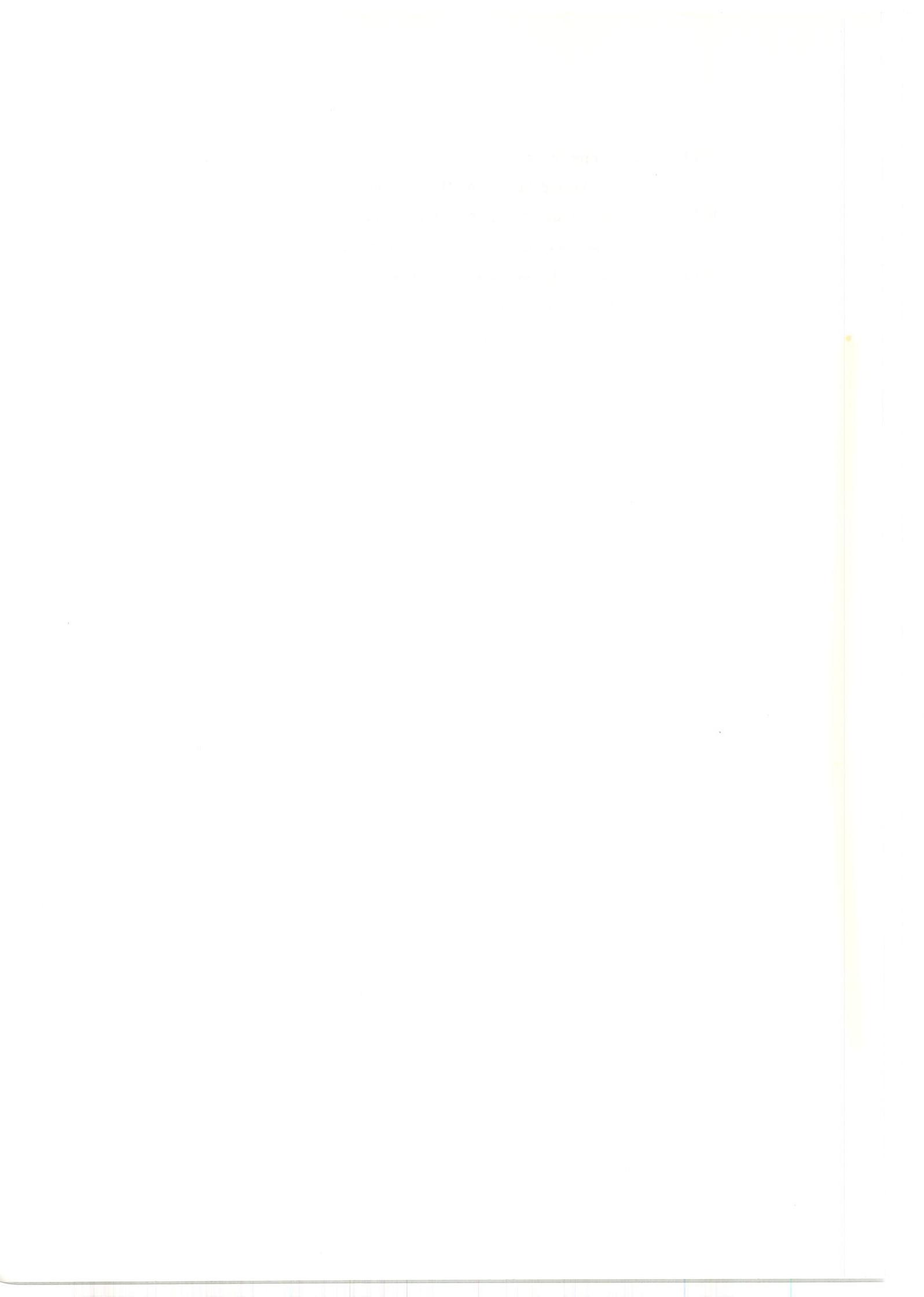
Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Algumas características de gêneros de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato.....	8
TABELA 3.2	Classificação das espécies de BRS segundo a salinidade ótima. (OLLIVIER <i>et al.</i> , 1994; TARDY-JACQUENOD <i>et al.</i> , 1998).....	13
TABELA 3.3	Reações envolvidas no processo de biocorrosão anaeróbia em uma superfície metálica submersa em água (HAMILTON, 1985; CORD-RUWISCH e WIDDEL, 1986; FONSECA <i>et al.</i> 1996).....	22
TABELA 3.4	Transportadores de elétrons encontrados em bactérias redutoras de sulfato e suas possíveis funções (HANSEN, 1994).....	33
TABELA 3.5	Substratos orgânicos e inorgânicos utilizados por espécies de BRS.....	38
TABELA 3.6	Substratos orgânicos utilizados por BRS e os respectivos valores da variação de energia livre padrão.....	44
TABELA 3.7	Variações de energia livre da redução de alguns compostos utilizados por <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> .(POSTGATE, 1979).....	48
TABELA 3.8	Parâmetros cinéticos μ_{max} e Tg para algumas espécies de BRS	51
TABELA 3.9	Reações envolvidas na redução desassimilativa do íon sulfato em <i>Desulfovibrio</i> sp (BADZIONG e THAUER, 1978).....	55
TABELA 4.1	Origens das amostras, segundo Laboratório do Cenpes/Petrobrás (CENPES, 1996).....	62
TABELA 4.2	Composição do meio basal Postgate E modificado (P.E..m) (CENPES, 1996; POSTGATE, 1979).....	66
TABELA 4.3	Composição da água do mar sintética (CENPES, 1996; STANDARD METHODS; 1992).....	66
TABELA 4.4	– Soluções estoque adicionadas e suas concentrações no meio P.E.m.....	66
TABELA 4.5	– Técnicas utilizadas para o isolamento das amostras.....	67

TABELA 4.6	Condições nutricionais estudadas para culturas cultivadas em meio P.E..m, preparado com água do mar sintética.....	73
TABELA 4.7	Condições nutricionais estudadas para culturas cultivadas em meio P.E..m, preparado com água Milli-Q.....	74
TABELA 4.8	Soluções utilizadas para a dosagem de proteína celular. (PETERSON, 1977; BHADURI e DEMCHICK, 1982).....	75
TABELA 4.9	Solução Tampão A para dosagem de sulfato (STANDARD METHODS, 1992).....	77
TABELA 4.10	Soluções para dosagem de sulfeto total (PLAS <i>et al.</i> apud VARESCHE, 1997).....	78
TABELA 5.1	Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura FW1.....	96
TABELA 5.2	Características gerais e classificação da cultura FW1.....	98
TABELA 5.3	Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura SW2.....	99
TABELA 5.4	Características gerais e classificação da cultura SW2.....	101
TABELA 5.5	Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura FW2.....	102
TABELA 5.6	Respostas de crescimento da cultura FW2 sob condições não salinas. Conteúdo inicial de proteína igual a 10,12 mgSAB/L.....	106
TABELA 5.7	Respostas de crescimento da cultura FW2 sob condições salinas. Conteúdo inicial de proteína igual a 21,81 mgSAB/L.....	109
TABELA 5.8	Características gerais e classificação da cultura FW2.....	112
TABELA 5.9	Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura SW1.....	115
TABELA 5.10	Respostas de crescimento da cultura SW1, cultivada na condição de isolamento (sob condições salinas). Conteúdo inicial de proteína igual a 12,15 mgSAB/L.....	117
TABELA 5.11	Características gerais e classificação da cultura SW1.....	118
TABELA 5.12	Valores da concentração de proteína total (mgSAB/L) em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sem agitação.....	121
TABELA 5.13	Valores da concentração de proteína total (mgSAB/L) em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sob agitação.....	122
TABELA 5.14	Valores das concentrações de sulfato e sulfeto em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sem agitação.....	125

TABELA 5.15	Valores das concentrações de sulfato e sulfeto em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sob agitação.....	126
TABELA 5.16	Valores das concentrações de ácidos láctico e acético em função do tempo durante o crescimento de <i>Desulfovibrio</i> sp cultivada sem agitação.....	131
TABELA 5.17	Valores das concentrações de ácidos láctico e acético em função do tempo durante o crescimento de <i>Desulfovibrio</i> sp cultivada com agitação.....	132



LISTA DE SÍMBOLOS

- μ_{\max} – Taxa máxima de crescimento (d^{-1} ; h^{-1})
- $\mu_p = dP/dtX$ – Velocidade específica de formação de produto (P)
- $\mu_s = -dS/dtX$ – Velocidade específica de consumo do substrato (S)
- $\mu_x = dX/dtX$ – Velocidade específica de crescimento do microrganismo (X)
- AMP – Adenosina monofosfato
- APS – Adenosina fosfosulfato
- ATP – Adenosina trifosfato
- BRS – Bactérias redutoras do íon sulfato
- $dAc.dt$ – Velocidade de produção de ácido acético (mg/Lt)
- $dLat.dt$ – Velocidade de consumo de ácido láctico (mg/Lt)
- $dProt.dt$ – Velocidade de formação de proteína celular (mgSAB/Lt)
- DQO/SO₄²⁻ - Relação DQO sulfato
- $dS_2.dt$ – Velocidade de produção de sulfeto (mg/Lt)
- $dSO_4^{2-}.dt$ – Velocidade de consumo de sulfato (mg/Lt)
- FW1 – Amostra 1 de origem de água doce
- FW2 - Amostra 2 de origem de água doce
- H₂ase - Hidrogenase
- LDH – Lactato desidrogenase
- MIC – Microbiological Induction Corrosion
- P - Atividade de elétrons
- P.E.m – Meio Postgate E modificado
- PCE – Percloroetileno
- PCP – Pentaclorofenol
- PP_i – Pirofosfato
- SAB – Soro albumina bovina
- SRB – Sulfate-reducing bacteria
- SW1 – Amostra 1 de origem marinha

SW2 – Amostra 2 de origem marinha

TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

TCAm – Ciclo modificado dos ácidos tricarboxílicos

TDC – Teoria da despolarização catódica

Tg – Tempo de geração (d; h)

Y – coeficiente de produção celular

RESUMO

SILVA, S.Q. (1999). *Isolamento e Identificação de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato (BRS) Oriundas de Campos de Exploração e Condução de Petróleo*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. 169p.

Foram estudadas quatro amostras provenientes de locais com ocorrência de corrosão microbiana. As amostras denominadas FW1, FW2, SW1 e SW2 foram fornecidas pelo Cenpes/Petrobrás e previamente enriquecidas pelo referido centro de pesquisa em meio de cultura específico. Estas amostras foram cultivadas e isoladas pelos métodos específicos aplicados a microrganismos anaeróbios estritos. Foi possível isolar uma cultura pura de cada amostra estudada, todas pertencentes ao grupo das Bactérias Redutoras do Íon Sulfato (BRS). Com as culturas puras foram realizados ensaios sobre a caracterização morfo-fisiológica das células, cujos resultados possibilitaram a classificação das mesmas, levando-se em conta as informações levantadas na literatura. As características encontradas para a BRS FW1 foram similares às da espécie *Desulfotomaculum halophilum*; assim como, a BRS FW2 foi semelhante à espécie *Desulfovibrio desulfuricans*; a BRS SW2, ao gênero *Desulfobacterium*, e a BRS SW1 apresentou características próximas às espécies *Desulfovibrio salexigens* e *Desulfovibrio desulfuricans*. O estudo da cinética de crescimento da BRS SW1, cultivada em 40mM de lactato e 37 mM de sulfato sob agitação constante, resultou na determinação dos valores de $\mu_{\max}=0,28 \text{ d}^{-1}$ e $T_g=2,47 \text{ d}$. Os consumos de sulfato e de lactato pela SW1 foram de, respectivamente, 27% e 85%, com a produção de, aproximadamente, 275 mg/L de sulfeto e 552 mg/L de acetato. Cultivada sob as mesmas condições, porém sem agitação, a SW1 apresentou $\mu_{\max}=0,13 \text{ d}^{-1}$ e $T_g=5,33 \text{ d}$. O consumo do lactato foi de 55% e o de sulfato de 13%. As concentrações de sulfeto e acetato produzidas foram de, aproximadamente, 121 mg/L e 274 mg/L, respectivamente. As possíveis reações metabólicas realizadas pela cultura SW1 foram:

3 ácido láctico + 1 sulfato \rightarrow 1 ácido acético + 1 sulfeto (com agitação)

2 ácido láctico + 1 sulfato \rightarrow 1 ácido acético + 1 sulfeto (sem agitação)

Palavras chave: 1. BRS. 2. Redução desassimilativa do sulfato. 3. Sulfeto. 4. Cinética de crescimento.

5. Corrosão microbiologicamente induzida

1870

...

...

...

...

...

...

...

...

...

ABSTRACT

SILVA, S.Q. (1999). *Isolation and Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) from Brazilian Oil Field*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. 169p

Four bacterial samples involved in MIC (microbiological induced corrosion) were studied. These samples, FW1, FW2, SW1 and SW2, were supplied by the Petrobrás (Brazilian Petroleum Industry) and they were previously enriched in a specific culture medium by the research center (Cenpes/Petrobrás). These samples were cultivated and isolated under anaerobic conditions. Pure cultures were isolated, all of them belonging to the Sulfate Reducing Bacteria group (SRB). Morphological and physiological assays were carried out, allowing the bacteria's identification by comparison with the literature. It was concluded that FW1 belongs to *Desulfotomaculum halophilum*; FW2 to *Desulfovibrio desulfuricans*; SW2 to *Desulfobacterium* sp and SW1 to *Desulfovibrio salexigens* or *Desulfovibrio desulfuricans*. Growth kinetic studies of the SW1 strain were carried out with and without shaking. During growth in lactate (40 mM) and sulfate (37mM), under shaking, the maximum specific growth rate (μ_{max}) and the generation time (Tg) were 0,28 d⁻¹ and 2,47 d, respectively. In this condition, the rates of sulfate and lactate utilization were 27% and 83%, respectively, while the production rates of sulfide and acetic acid were 275 mg/L and 552 mg/L, respectively. When the kinetic study was carried out without shaking, the values of the kinetic parameters μ_{max} and Tg were 0,13 d⁻¹ and 5,33 d. In this latter condition the utilization rates of sulfate and lactate were 13% and 55%, respectively and the production rates of sulfide and acetic acid were 121 mg/L and 274 mg/L, respectively. The possible metabolic reactions carried out by SW1 were:



Keywords: 1. SRB. 2. Dissimilatory sulfate reduction. 3. Sulfide. 4. Kinetic parameters. 5. MIC



1 - INTRODUÇÃO

A redução microbiológica do íon sulfato tem se tornado alvo de muitos estudos, não apenas devido à sua importância ambiental na mineralização da matéria orgânica, e por isso de grande interesse tecnológico na aplicação desses microorganismos no tratamento de águas residuárias, mas principalmente por seu envolvimento em processos corrosivos, denominados biocorrosão ou corrosão microbiologicamente induzida (microbiological induction corrosion – MIC), responsáveis por severos danos em uma série de atividades industriais.

A biocorrosão é reconhecida atualmente como uma das maiores fontes de problemas e falhas operacionais de indústrias (VIDELA, 1995). Entre elas podem ser destacadas a indústria naval e de construção de estruturas em mar aberto, especialmente cascos de embarcações e motores; indústria química, siderúrgica, de papel e petrolífera; refinaria de álcool; sistemas de distribuição de gás natural e de armazenamento de água potável; tanques de aviões; centrais de geração de energia térmica, hidroelétrica e nuclear (VIDELA, 1995). Materiais como concreto, cantaria, plástico, madeira e materiais de revestimento (GAYLARDE e MORTON, 1997), vidros (DREWELLO e WEISMANN, 1997) e materiais utilizados na construção de biorreatores anaeróbios para tratamento de águas residuárias (ENGLERT e MULLER, 1996) também são suscetíveis à biocorrosão.

Especificamente relacionada à indústria petrolífera, a participação das Bactérias Redutoras do Íon Sulfato (BRS) está associada tanto ao processo corrosivo direto, atuando e promovendo a corrosão pontual, quanto à contaminação do óleo por sulfeto de hidrogênio, produto do seu metabolismo, e responsável por problemas na separação das fases óleo/água. As BRS presentes em reservatórios de petróleo reduzem o sulfato (proveniente da injeção de água, principalmente de origem marinha) a sulfeto, aumentando o conteúdo de enxofre no

óleo bruto, diminuindo sua qualidade e aumentando o custo da sua refinação (SANDERS e HAMILTON; 1986).

Mais de 60% do petróleo produzido no Brasil é proveniente de sistemas *offshore*. Parte desses sistemas usam injeção de água do mar como método de recuperação do petróleo secundário. Um dos mais significantes problemas encontrados nas plataformas brasileiras *offshore* tem sido a ocorrência de corrosão relatado ao crescimento microbiano e sua instalação na superfície dos metais (VIDELA, 1996).

Um método preventivo utilizado para evitar estes transtornos econômicos tem sido pela aplicação de biocidas, contudo, sua eficiência tem sido questionada. Além disso, a sua característica deletéria, inibindo ou evitando a atividade dos microrganismos, apresenta impactos negativos do ponto de vista ambiental, pois pode agir não apenas nos indutores da biocorrosão, mas em muitas outras formas de vida, interferindo nas atividades naturais de ecossistemas. O tratamento com biocidas pode não ser a única forma de controle da atividade das BRS em campos de petróleo. A redução ou mesmo a inibição da atividade desses microrganismos pode ser conseguida pelo controle da concentração de sulfato, do substrato orgânico e dos nutrientes essenciais como fósforo e nitrogênio, tornando-os limitantes ao seu crescimento (OKABE *et al.*, 1992). Segundo HAMILTON (1985) e TILLER (1986), é necessário conhecer mais sobre a ecologia, fisiologia e requerimentos nutricionais das BRS, a fim de controlar ou prevenir a sua atuação no processo corrosivo.

A Indústria Petrolífera Brasileira (Petrobrás), não diferente das demais, tem enfrentado problemas envolvendo corrosão em sistemas de produção de petróleo, gerando preocupações relevantes. Por esse motivo, foram iniciadas pesquisas em seu Centro de Pesquisas (Cenpes/Petrobrás) com o objetivo de identificar as causas prováveis da corrosão. Com a avaliação dos resultados obtidos pela equipe foi levantada a hipótese de que BRS poderiam atuar sobre as incrustações de sulfato de bário, produzindo elevada concentração de sulfeto e gerando o processo de corrosão localizada (CENPES, 1995).

O Cenpes/Petrobrás e o Departamento de Hidráulica e Saneamento, em parceria, propuseram o projeto "*Isolamento e Identificação de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato Relacionadas a Processos Corrosivos da Indústria de Petróleo*", com a finalidade de conhecer os agentes bióticos da corrosão, ou seja, de identificar culturas de BRS existentes

em seus sistemas e estruturas de exploração de petróleo [contrato Cenpes/Fipai nº 650.2.028-96-7]

Nesse contexto, com o apoio e a permissão do Cenpes/Petrobrás (autorização apresentada na Figura C1 do Apêndice), foi realizada a presente Dissertação de Mestrado, com a intenção de fornecer informações sobre a fisiologia e as condições nutricionais de quatro culturas de BRS de interesse ao grupo da indústria, para o controle da biocorrosão. Além disso, as análises das características morfológicas e fisiológicas das culturas de BRS obtidas neste trabalho, contribuíram para a classificação de gêneros anaeróbios presentes em ecossistemas tropicais, através de alguns métodos tradicionais empregados nos estudos de sistemática e taxonomia microbiana.

2 - OBJETIVOS

- Isolar culturas de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato presentes em amostras fornecidas pelo Cenpes/Petrobrás, envolvidas no processo de biocorrosão;
- Caracterizar, identificar e classificar as culturas de acordo com as características morfo-fisiológicas das células isoladas;
- Avaliar a resposta de crescimento de duas culturas isoladas, cultivadas em diferentes fontes de carbono e aceptores de elétrons;
- Estudar a cinética de crescimento de uma cultura classificada, determinando os parâmetros cinéticos μ_{\max} (taxa máxima de crescimento), Tg (tempo de geração) e velocidades de consumo e de produção de substratos.

QUESTION

- *Faint, illegible text, possibly a bullet point.*

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ECOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DO ÍON SULFATO

Alguns organismos como plantas, fungos e muitas bactérias podem usar sulfato como fonte de enxofre, incorporando-o como sulfeto em várias moléculas orgânicas, tal como aminoácidos, em um processo denominado redução assimilativa do íon sulfato (MANAHAN, 1994; WIDDEL, 1988; WHITE, 1995). A característica comum às bactérias redutoras do íon sulfato é a capacidade única, deste grupo, de utilizar o sulfato como aceptor final de elétrons na oxidação da matéria orgânica, reduzindo-o a sulfeto de hidrogênio, no processo denominado redução desassimilativa do íon sulfato, pois neste caso, grande parte do enxofre não é assimilada pelo microrganismo. Esse processo é também conhecido como respiração do sulfato (WIDDEL e HANSEN, 1992; BROCK *et al.*, 1994; FONSECA *et al.*, 1996).

A redução biológica do sulfato ocorre em ambientes anaeróbios estritos nos quais substratos orgânicos e sulfato dissolvido estejam disponíveis, como em solos, lodos de esgoto, sedimentos marinho e de água doce, além do rúmex e intestinos de animais (BROCK *et al.*, 1994). Porém, os gêneros de BRS apresentam especificidade no que se refere ao seu habitat, como pode ser visto na Tabela 3.1

O nicho anaeróbio é caracterizado por apresentar baixos valores de potencial de oxi-redução devido à predominância de compostos reduzidos. Segundo ZEHNDER e STUM (1988), a redução do sulfato a sulfeto em pH 7, a 25 °C e com 1mM de enxofre requer um *pe* (atividade de elétrons) menor que -3, indicando que a solução tem tendência a doar elétrons,

TABELA 3.1 – Algumas características de gêneros de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato

GÊNERO	HABITAT	TEMP (°C)	MORFOLOGIA	TAMANHO (µm)	REAÇÃO DE GRAM	DESULFOVIRIDINA	ESPOROS
DOMÍNIO BACTÉRIA							
<i>Desulfovibrio</i>	sedimentos anaeróbios de água doce e salobra; ambientes marinhos, intestino e rúmem de animais	25 - 35	bacilos curvos, ocasionalmente retos, sigmóides ou espiralados; apresenta pleomorfismo; móveis	0,5 - 1,5 x 2,5 - 10	negativa	presente ¹	ausente
<i>Desulfomonas</i>	fezes humanas	30 - 40	bacilos retos; não móveis; podem ocorrer aos pares	0,8 - 1,0 x 2,5 - 10	negativa	presente	ausente
<i>Desulfococcus</i>	sedimentos anaeróbios de água doce e ambientes marinhos; lodos anaeróbios de digestores de esgoto	30 - 36	cocos; não móveis, únicos ou aos pares	1,5 - 2,2	negativa	ausente ²	ausente
<i>Thermodesulfobacterium</i>		65 - 70	bacilos	0,3 x 0,9	negativa	ausente	
<i>Desulfomicrobium</i>		28 - 37	bacilos ovais			ausente	
<i>Desulfohalobium</i>	ambientes hipersalinos	37-40	bacilos móveis	0,7-0,9 x 1,0 - 3,0	negativa	ausente	ausente
<i>Desulfomonile</i>		37	bacilos			presente	
<i>Desulfobotulus</i>		34	vírios			ausente	
<i>Desulfobulbus</i>	regiões anaeróbias de água doce e salobra, ambiente marinho, rúmem, esterco de animais e esgotos	28 - 39	células elípticas, frequente/e com as extremidades pontuadas, podem ocorrer aos pares	1,0 - 1,3 x 1,5 - 2,0	negativa	ausente	ausente
<i>Desulfobacter</i>	regiões aeróbias de água salobra e ambiente marinho	28 - 32	bacilos com extremidades arredondadas; podem apresentar-se aos pares ou aglomerados móveis ou não bacilos	1,0-2,0 x 1,7 - 3,5	negativa	ausente	ausente

TABELA 3.1 (cont.) – Algumas características de gêneros de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato

GÊNERO	HABITAT	TEMP (°C)	MORFOLOGIA	TAMANHO (µm)	REAÇÃO DE GRAM	DESULFOVIRIDINA	ESPOROS
<i>Desulfonema</i>		30 - 32	filamentos deslizantes	3,0 - 8,0 x 2,5-13	negativa	presente ³	ausente
<i>Desulfosarcina</i>	regiões anaeróbias de água salobra e ambientes marinhos	28 - 33	células elípticas agregadas semelhantes a sarcinas; não móveis	1,0 - 1,5 x 1,5 - 2,5	negativa	ausente	ausente
<i>Desulfotomaculum</i>	solos, água doce, regiões geotermas, intestinos de insetos, rúmen; água produzida em campos de petróleo	20 - 55	bacilos curvos e retos; móveis, com extremidades pontuadas; isolados ou em cadeia	0,3 - 1,5 x 3,0 - 9,0	positiva ⁴	ausente	presente
<i>Desulfospira</i>	sedimentos marinhos	26 - 30	cocos ou espirilos, não móveis, isolados ou aos pares	0,7 - 0,8 x 1,0 - 2,0	negativa	ausente	nd
<i>Desulfoarculus</i>		35 - 39	vírios			ausente	
<i>Desulforhabdus</i>	digestor anaeróbio	37	bacilos elípticos, às vezes aos pares, não móveis	1,4-1,9 x 2,4-3,4	negativa	nd	ausente
<i>Desulfobacca</i>	digestor anaeróbio	37	bacilos elípticos, às vezes aos pares, não móveis	1,3 x 1,9-2,2	negativa	nd	ausente
<i>Desulfobacula</i>							
<i>Desulfobacterium</i>	sedimentos marinhos	20-28	bacilos ovais	0,7 - 1,8 x 1,5 -3,0	negativa	ausente	ausente
DOMÍNIO ARCHAEA <i>Archaeoglobus</i>		80 - 83	esferas			ausente	

Legenda: ¹ exceto *D. bacuolatus* e *D. thermophilus* ² exceto *D. multivorans* ³ exceto *D. magnum* ⁴ Manual de Bergey classifica como Gram negativa nd não determinado

FONTE: CAMPBELL e POSTGATE (1965); WIDDEL e PFENNIG (1984); WIDDEL (1988); WIDDEL e HANSEN (1992); HANSEN (1994); OLLIVIER *et al.* (1994); OUDE ELFERINK *et al.* (1995); FINSTER *et al.* (1997); OUDE ELFERINK *et al.* (1998)

e que, portanto, as enzimas biológicas envolvidas nesse metabolismo operam em valor igual ou menor que -3 . Nessa situação, o potencial de oxi-redução fica em torno de -200 mV.

Em ambientes naturais, a distribuição de BRS não é determinada apenas por suas propriedades nutricionais e cinéticas, a capacidade de adaptação às mudanças físicas, químicas e biológicas pode ser decisiva para a atividade e o crescimento da bactéria (WIDDEL, 1988).

3a Em relação à temperatura de crescimento, a maioria das BRS são classificadas como mesófilas, apresentando uma faixa ótima de temperatura entre 25 e 40°C (Tabela 3.1). No entanto, alguns gêneros têm sido encontrados desde ambientes psicrófilos até hipertermofílicos (HANSEN, 1994).

No fundo do mar, a temperatura é geralmente menor que 5°C e a maior parte da matéria orgânica é oxidada por bactérias anaeróbias, tanto no sedimento, quanto na coluna d'água (HERBERT¹ *apud* ISAKSEN e JØRGENSEN, 1996). ISAKSEN e JØRGENSEN (1996) isolaram BRS de sedimentos em "Weddell Sea" na Antártida, sob temperatura abaixo de 0°C e na "Mariager Fjord", na Dinamarca, sob temperatura entre 3 e 6°C, a fim de examinar o grau de adaptação do metabolismo dessas bactérias a temperaturas baixas. Observaram, contudo, que a maior taxa de redução de sulfato para as culturas oriundas da Dinamarca ocorreu em temperaturas mesofílicas, e para as culturas da Antártida, entre 12-18°C.

São conhecidas duas espécies de células procarióticas redutoras do íon sulfato pertencentes ao Domínio Archaea, cuja temperatura ótima de crescimento encontra-se em torno de 82°C, denominadas *Archaeoglobus fulgidus* (STETTER² *apud* HANSEN, 1994) e *A. profundus* (BURGGRAF³ *et al.* *apud* HANSEN, 1994). Um aspecto interessante é que a primeira espécie contém tetraidrometanopterin, metanofurano e o fator enzimático F₄₂₀, compostos chaves para o processo de metanogênese. No entanto, outras características típicas dos organismos metanogênicos como a coenzima M, o componente B e o fator F₄₃₀ não foram encontrados. O metabolismo da redução do sulfato e as enzimas a ele associadas

¹ HERBERT, R.A. (1986). The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms. In: *Microbes in extreme environments*. R.A. Herbert and G.A. Codd (Eds). Academic Press, Inc., NY, p.1-23.

² STETTER, K.O. (1988). *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov. sp. nov.; a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* v.10, p. 172-173.

³ BURGGRAF, S.; JANNASCH, H.W., NICOLAUS, B.; STETTER, K.O. (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* v. 13, p. 14-28

em *Archaeoglobus* sp são similares ao das outras BRS (THAUER⁴ *apud* HANSEN, 1994). Outras espécies termófilas podem ser encontradas nos gêneros *Thermodesulfobacterium* (65-70°C) e no gênero *Desulfotomaculum* (20-55°C) (LEU *et al.*, 1996). VAZOLLER (1993) isolou uma cultura termófila de BRS em amostra proveniente de um reator para tratamento de vinhaça, provavelmente pertencente ao gênero *Desulfotomaculum*, cultivada sob temperatura de 55°C.

3a Reconhecidamente, o pH exerce um forte controle na atividade enzimática celular, podendo afetar a permeabilidade da membrana e outras atividades fisiológicas da célula (MOAT e FOSTER, 1988). As BRS preferem ambientes com pH em torno de 7 e não são encontradas em pH menor que 6 ou maior que 9 (WIDDEL, 1988; WIDDEL e BAK, 1992). Além disso, o pH pode estar diretamente envolvido com a toxicidade do sulfeto produzido pelas BRS, como será mencionado no item 3.4.4 deste capítulo.)

No ambiente aquático, a redução do íon sulfato ocorre principalmente no sedimento anóxico ou em zonas anóxicas de lagoas estratificadas (OLLIVIER *et al.*, 1994). Dentre os ambientes aquáticos, seu habitat principal é o marinho, onde sulfato encontra-se aproximadamente na concentração de 29 mM (3 g/L) (WIDDEL, 1988; HANSEN, 1994; OLLIVIER *et al.*, 1994), não sendo, portanto, um fator limitante para o metabolismo dessas bactérias (OLLIVIER *et al.*, 1994; WIDDEL e BAK, 1992). No ambiente de água doce, a concentração de sulfato é usualmente menor e varia, aproximadamente, de 0,2 a 1,0 g/L (JØRGENSEN, 1982).

Em águas marinhas profundas, o efeito da pressão atmosférica poderia ser uma desvantagem para o desenvolvimento de microrganismos, entre eles BRS, no entanto, BALE *et al.* (1997) isolaram uma cultura redutora de sulfato, proveniente de amostras de sedimentos em “Japan Sea”, cuja pressão ótima situou-se entre 100 e 150 atm, indicando que esses microrganismos estão bem adaptados a sedimentos profundos. Essa cultura apresentou características muito próximas às encontradas em *Desulfovibrio salexigens* e *Desulfovibrio desulfuricans*.

A salinidade (concentração de cloreto de sódio) nas águas naturais apresentam valores de 0, como em ambientes de água doce, a 32% (concentração de saturação)

⁴ THAUER, R.K. (1988). Citric-acid cycle, 50 years on. Modification and alternative pathway in anaerobic bacteria. *Eur. J. Biochem.* v. 176, p. 497-508.

correspondente a ambientes altamente salinos. A água do mar contém, aproximadamente, 2,75% de cloreto de sódio e 3,3 – 3,7% contando com os demais sais existentes no ambiente, tais como carbonatos de sódio e de potássio, além do cálcio e magnésio (PELCZAR *et al.*, 1993).

A classificação das bactérias segundo sua resposta à concentração de NaCl é apresentada por OLLIVIER *et al.* (1994): - bactérias halotolerantes, são aquelas que não necessitam de NaCl mas podem crescer sob condições salinas; bactérias halófilas, que requerem NaCl para o seu crescimento. Os organismos halófilos podem ser classificados em três grupos de acordo com sua preferência pelo NaCl: (a) levemente halófilos, de 2 a 5% de NaCl (0,34 a 0,85M); (b) moderadamente halófilos, de 5 a 20% de NaCl (0,85 a 3,4M); (c) extremamente halófilos, de 20 a 30% de NaCl (3,4 a 5,1M).

Em geral, os organismos halófilos apresentam duas estratégias para sobreviverem em ambientes com altas concentrações de NaCl: - a concentração interna de sais pode ser mantida, acumulando-os em níveis comparados ao do ambiente; - o organismo pode excretar ativamente NaCl e produzir um composto osmorregulante orgânico compatível, como a betaina e a prolina (OREN, 1999). Entre os compostos osmoprotetores estão os cátions inorgânicos, aminoácidos ou aminoácidos derivados, álcoois polihídricos e carboidratos (MOAT e FOSTER, 1988; OREN, 1999).

Como pode ser visto na Tabela 3.2, as BRS de ambiente marinho são classificadas como halotolerantes a moderadamente halófilas (OLLIVIER *et al.*, 1994). Duas espécies moderadamente halófilas, *Desulfovibrio halophilus* e *Desulfohalobium retbaense*, desenvolvem-se em ambientes cuja salinidade está entre 18-20%, apresentando maior taxa de crescimento entre 6-10% (OLLIVIER *et al.*, 1994). *Desulfotomaculum halophilum*, recentemente isolado por TARDY-JACQUENOD *et al.* (1998), desenvolve-se em salinidade entre 1-14% com melhor atividade em 6% de NaCl.

TRUPER⁵ *apud* OLLIVIER *et al.* (1994) isolou uma bactéria redutora de sulfato de ambiente altamente salino (Mar Vermelho), tolerando cerca de 17% de NaCl, muito similar a *Desulfovibrio halophilus* (OLLIVIER *et al.*, 1994).

⁵ TRUPER, H.G. (1969). Bacterial sulfate reduction in the Red Sea hot brines. In: *Hot brines and heavy metal deposits in the Red Sea*. E.T.Degens and D. A. Ross (Eds). Springer-Verlag, NY. p. 263-271.

A osmorregulação dessas bactérias não está bem explicada. Experimentos demonstraram que a espécie *D. halophilus* não pode sintetizar solutos compatíveis, porém é capaz de crescer em meio mineral concentrando sais no citoplasma (OLLIVIER *et al.*, 1994).

3ca TABELA 3.2 Classificação das espécies de BRS segundo a salinidade ótima

Espécies levemente halófilas	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>aestuarii</i>	<i>Desulfococcus niacini</i>
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	<i>Desulfosarcina variabilis</i>
<i>Desulfovibrio giganteus</i>	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>
<i>Desulfobacter postgatei</i>	<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>
<i>Desulfobacter latus</i>	<i>Desulfobacterium phenolicum</i>
<i>Desulfobacter curvatus</i>	<i>Desulfobacterium indolicum</i>
<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	<i>Desulfonema limicola</i>
<i>Desulfococcus multivorans</i>	<i>Desulfonema magnum</i>
Espécies moderadamente halófilas	
<i>Desulfovibrio halophilus</i>	
<i>Desulfohalobium retbaense</i>	
<i>Desulfotomaculum halophilum</i>	

Fonte: OLLIVIER *et al.* (1994); TARDY-JACQUENOD *et al.* (1998)

CYPIONKA⁶ *apud* HANSEN (1994) determinou algumas diferenças básicas entre culturas de BRS marinhas e de água doce, entre elas: a) maior afinidade pelo sulfato é apresentada pelas espécies de água doce; b) espécies marinhas realizam a importação do sulfato com uso de Na⁺, enquanto que espécies de água doce, com prótons.

⁶ CYPIONKA, H. (1989). Characterization of sulfate transport in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Arch. Microbiol.* v. 152, p. 237-243.

3.2 O PAPEL DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DO ÍON SULFATO NOS PROCESSOS NATURAIS E TECNOLÓGICOS

3.2.1 Relação com outras bactérias no ciclo do enxofre

O ciclo do enxofre, como o do nitrogênio e o do carbono, diferem-se dos ciclos de outros minerais por envolverem transformações de gases para formas iônicas (dissolvidas ou associadas), diretamente relacionadas ao ambiente e principalmente às condições de óxi-redução do meio (MANAHAN, 1994). Nos ambientes aquáticos, a existência de consórcios bacterianos nos sedimentos faz com que os processos dos ciclos biogeoquímicos sejam otimizados, principalmente devido às interações entre os microrganismos (PAERL e PINCKNEY, 1996).

Os depósitos terrestres de enxofre são encontrados em sedimentos e rochas na forma de sulfato (CaSO_4) e de sulfeto (FeS), mas são os oceanos que constituem o mais significativo reservatório de enxofre na Biosfera, na forma de sulfato inorgânico (MANAHAN, 1994). No entanto, o sulfato é termodinamicamente estável, e sendo assim, a atividade das BRS tem fundamental importância geoquímica, já que a redução biológica do íon sulfato é a base do ciclo do enxofre em ambientes aquáticos (WIDDEL, 1988).

Na Figura 3.1 está apresentado um esquema geral do ciclo do enxofre, onde podem ser vistas as principais rotas biológicas envolvidas nas transformações dos compostos.

Organicamente, o enxofre reduzido é um constituinte indispensável de muitos organismos. O conteúdo de enxofre nos organismos vivos está em torno de 1% (m/m) da sua massa seca, e variações de quantidade e formas químicas dependem do tipo de vegetal e animal (WIDDEL, 1988). O sulfato pode ser assimilado como fonte de enxofre pelos organismos vivos através da redução assimilativa, como anteriormente mencionado, sendo o sulfeto produzido incorporado a moléculas orgânicas (rota 1).

O sulfeto de hidrogênio na região de hipolímnio anóxico e nos sedimentos de muitos ambientes aquáticos tem duas origens, pela redução de compostos inorgânicos de enxofre como o sulfato, tiosulfato e o enxofre elementar; ou pela

biodegradação/desulfurilação relacionadas ao enxofre orgânico (SMITH e KLUG, 1981a; 1981b).

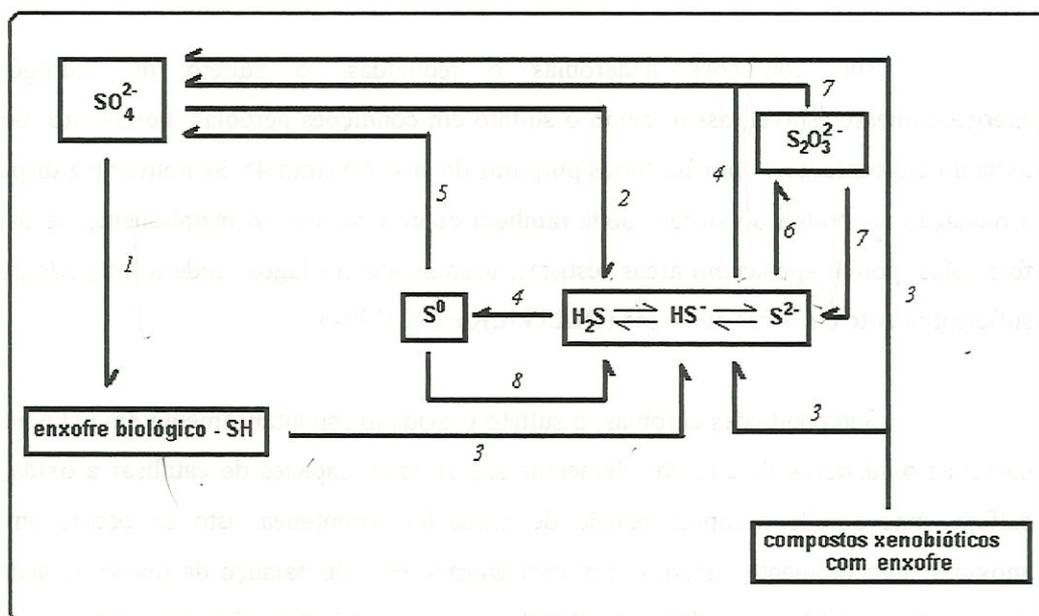


FIGURA 3.1 Esquema das transformações biológicas envolvidas no ciclo do enxofre

Rotas:

- 1 – redução assimilativa do sulfato
- 2 – redução desassimilativa do sulfato (BRS)
- 3 – biodegradação /desulfurilação de compostos orgânicos
- 4 – oxidação do sulfeto (anaerobiose: bactérias fotótrofas *Chromatium* sp, *Clorobium* sp e bactérias púrpuras; aerobiose: *Beggiatoa* sp, *Thiothrix* sp, *Thiobacillus* sp)
- 5 – oxidação do enxofre (anaerobiose: bactérias fotótrofas *Chromatium* sp, *Clorobium* sp; aerobiose: *Beggiatoa* sp, *Thiothrix* sp, *Thiobacillus* sp, *Sulfolobus* sp)
- 6 - oxidação do sulfeto a tiosulfato
- 7 – dismutação/transformação parcial do tiosulfato: produção de sulfato e sulfeto
- 8 – redução desassimilativa do enxofre (bactérias redutoras de enxofre)

Fonte: WIDDEL (1988); MANAHAN (1994); BROCK *et al.* (1994)

A redução desassimilativa do sulfato é realizada apenas pelo grupo das BRS, com produção e liberação de sulfeto (rota 2), principal fonte de enxofre para os organismos incapazes de realizar a via assimilativa do sulfato, principalmente em ambientes marinhos (MANAHAN, 1994). O sulfeto produzido pela biodegradação/desulfurilação do enxofre orgânico (rota 3) fica disponível no ambiente, e constitui a maior fonte de enxofre reduzido

no ambiente de água doce. O sulfeto produzido pelas BRS, excede a quantidade usada para a síntese celular das próprias BRS, que sendo anaeróbias, apresentam baixo coeficiente de produção celular (WIDDEL, 1988).

Sob condições anaeróbias e reduzidas, o sulfeto de hidrogênio é energeticamente estável, assim como o sulfato em condições aeróbias, no entanto, pode ser oxidado biologicamente por bactérias púrpuras do enxofre (rota 4). Se houver luz disponível, a oxidação anaeróbia do sulfeto pode também ocorrer devido ao metabolismo de bactérias fotótrofas, porém apenas em áreas restritas, usualmente em lagos, onde a luz pode penetrar suficientemente em áreas anóxicas (OLLIVIER *et al.*, 1994).

Sob condições aeróbias, o sulfeto é oxidado espontaneamente em pH neutro. As bactérias oxidadoras de enxofre elementar são também capazes de catalisar a oxidação do sulfeto, mas devido à rápida reação de oxidação espontânea, isto só ocorre em áreas anóxicas. Recentemente, estudos com radiotraçadores e de balanço de massa evidenciaram que cerca de 95% do sulfeto produzido nesses ambientes são reoxidados a sulfato, principalmente pelo oxigênio e pelos íons nitrato, Fe (III) e Mn (IV) (JØRGENSEN, 1990).

A oxidação do sulfeto pelo oxigênio pode levar à formação de tiosulfato (rota 6), que por sua vez, pode ser oxidado, reduzido ou, em parte, transformado (JØRGENSEN, 1990; JØRGENSEN e BAK, 1991). Nos últimos anos, foi demonstrado que a transformação parcial do tiosulfato a sulfeto e sulfato (rota 7), é derivada de um metabolismo importante para as rotas do enxofre nos sistemas aquáticos, e que os microrganismos capazes de executá-la, são numericamente abundantes (JØRGENSEN e BAK, 1991).

O enxofre elementar é quimicamente estável na maioria dos ambientes, e na presença de oxigênio é facilmente oxidado pelas bactérias oxidadoras do enxofre (rota 5), como os membros do gênero *Thiobacillus*. Os mais importantes redutores de enxofre elementar na natureza são as bactérias redutoras de enxofre, como o gênero *Desulfuromonas*, que realizam a redução desassimilativa do enxofre (rota 8) durante a oxidação da matéria orgânica (WIDDEL, 1988; MANAHAN, 1994).

O ciclo do enxofre inclui outras rotas não ilustradas na Figura 3.1. Compostos de enxofre sofrem outras interconversões devido a processos químicos e geológicos. Além disso, grande quantidade de enxofre orgânico acumula-se em ambientes marinhos, como por

exemplo, sabe-se que 45 toneladas de dimetila sulfeto são produzidas anualmente pela degradação do propionato dimetilsulfônico, um produto químico produzido por algas marinhas para a osmorregulação (TERRY, 1998).

3.2.2 Degradação anaeróbia da matéria orgânica

3c) As bactérias redutoras do íon sulfato ocupam uma posição chave na degradação da matéria orgânica, participando da etapa final da cadeia alimentar anaeróbia, como as Archaea metanogênicas, e utilizando os produtos finais da fermentação de outros microrganismos como fonte de carbono e doadores de elétrons (STANIER *et al.*, 1987; WIDDEL, 1988). Essa proximidade de nichos faz com que exista uma interação entre os dois grupos citados. De fato, na natureza observa-se competição entre esses grupos, pois ambos podem utilizar hidrogênio e acetato como substratos. No entanto, a redução do sulfato predomina apenas em ambientes marinhos ou nos ricos em sulfato; nos demais, a metanogênese prevalece, pois a concentração de sulfato torna-se limitante (SMITH e KLUG, 1981a; LAANBROEK *et al.*, 1984; WIDDEL, 1988; MORT e DEAN-ROSS, 1994).

3d) Teoricamente, a relação DQO/SO₄²⁻ para a redução total do sulfato é 0,67 (SPEECE, 1996; OMIL *et al.*, 1998). Isto indica que, em biorreatores anaeróbios empregados no tratamento de águas residuárias, a competição entre as BRS e os organismos metanogênicos aumenta com o decréscimo da relação DQO/SO₄²⁻, ou seja, quando esta taxa é de 0,67, teoricamente, há sulfato disponível suficiente para a completa remoção da matéria orgânica apenas por BRS; para taxas menores que 0,67, a quantidade de matéria orgânica é insuficiente para a completa redução do sulfato e substrato extra deve ser adicionado, se a remoção de sulfato for objetivo do tratamento. Se a taxa exceder 0,67 a remoção completa da matéria orgânica pode ocorrer, não apenas pela atividade das BRS, mas também dos organismos metanogênicos (OMIL *et al.*, 1998).

3d) As BRS apresentam uma notável aplicação ao tratamento de águas residuárias, pois além de participarem da mineralização da matéria orgânica, com conseqüente remoção de sulfato, também participam da remoção de metais pesados devido a complexação destes com o seu produto metabólico (sulfeto), formando compostos muito insolúveis (HAMILTON, 1985).

3d) Além da remoção de metais pela complexação, sabe-se que alguns gêneros são capazes de reduzir formas solúveis de urânio e cromo (LOVLEY *et al.*, 1993). Espécies de *Desulfovibrio* participam da redução enzimática do Fe(III) em ambientes marinhos e sedimentos profundos (COLEMAN⁷ *et al. apud* LOVLEY *et al.*, 1993). TEBO e OBRAZTSOVA (1998) isolaram recentemente uma espécie de BRS, *Desulfotomaculum reducens*, capaz de reduzir Mn(IV), Fe(III), U(IV) e Cr(VI). Espécies de *Desulfovibrio* podem reduzir formas solúveis de urânio U(VI) tornando-os insolúveis, auxiliando na sua remoção em águas contaminadas (LOVLEY *et al.*, 1993).

3d) Ainda, sob o ponto de vista ambiental, outra atividade importante realizada pelas BRS inclui a desalogenação redutiva de alguns compostos organoclorados como o 3-clorobenzoato (HANSEN, 1994), o percloroetileno (PCE) (SHELTON e TIEDJEI, 1984), o pentaclorofenol (PCP) (DAMIANOVIC, 1997), além da utilização de compostos heteroaromáticos como quinol e indol (JOHANSEN *et al.*, 1997).

3.2.3 A participação das BRS no processo de biocorrosão anaeróbia

Por muito tempo, o processo corrosivo esteve relacionado exclusivamente com a presença de oxigênio, até a descoberta da ocorrência de muitos casos de corrosão em solos anóxicos (PENG e PARK, 1994). Foram os estudos realizados em 1934 por VON WOLZOGEN KUHR e VAN DER VLUGT⁸ *apud* PENG e PARK (1994) que indicaram a participação das BRS no processo de corrosão anaeróbia e o conceito de corrosão induzida por microrganismos foi aceito, relacionando a importância dos microrganismos na aceleração dos processos eletroquímicos envolvidos na corrosão (VIDELA, 1996).

Dentre os mecanismos que explicam o processo de biocorrosão, é comum em todos a dependência do metabolismo das BRS (HAMILTON e MAXWELL, 1986). No entanto, há uma interdependência entre BRS e outros microrganismos responsáveis pela geração das condições reduzidas e da disponibilização de nutrientes para o desenvolvimento das células de BRS (SANDERS e HAMILTON, 1986), como será discutido a frente.

⁷ COLEMAN, M.L.; HEDRICK, D.B.; LOVLEY, D.R.; WHITE, D.C.; PYE, K. (1993). Reduction of Fe (III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature*. v. 361, p. 436-438.

⁸ VON WOLZOGEN KUHR; C.A.H.; VAN DER VLUGT, I.S. (1934). The graphitization of cast irons as na electrochemical process in anaerobic soils. *Water*. v. 18, p. 147-165.

Antes da colonização de uma superfície metálica por microrganismos, adsorve-se um filme de macromoléculas orgânicas e inorgânicas (“fouling”) onde as células se aderem e se reproduzem, formando colônias (Figura 3.2) (VIDELA, 1995). O material orgânico e inorgânico, juntamente com os microrganismos e seus produtos metabólicos, constituem o “biofouling”, cuja disposição na superfície metálica não ocorre como um filme contínuo, mas como aglomerados pontuais, promovendo a biocorrosão localizada, também conhecida como corrosão em “pitting” ou “PIT”. Além de influenciar na biocorrosão, o “biofouling” é visto como um depósito indesejável de matéria orgânica e inorgânica nas superfícies, que resultam em problemas no desempenho e tempo de vida dos equipamentos (EDYVEAN e VIDELA, 1994).

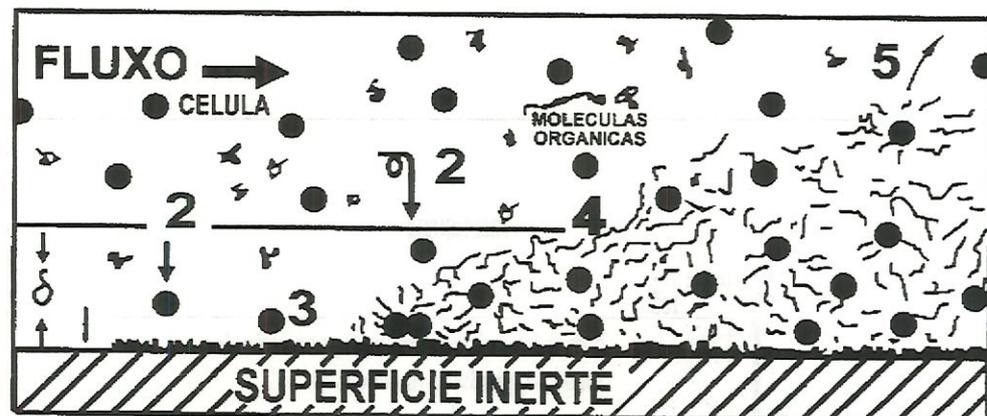


FIGURA 3.2 Processo de formação de um biofilme sobre uma superfície inerte

- 1 – Transporte e adsorção de moléculas orgânicas
- 2 – Transporte de células microbianas
- 3 – Aderência de células microbianas
- 4 – Crescimento no interior do biofilme
- 5 – Desprendimento do biofilme

Fonte: VIDELA, 1995

O biofilme formado durante esse processo, além de ligar as bactérias à superfície, também tem função de proteção, evitando a difusão do oxigênio e de eventuais biocidas. Além disso, tende a absorver moléculas orgânicas, permitindo um maior aproveitamento nutricional pelos microrganismos (FONSECA *et al.*, 1996).

A associação de distintas espécies de microrganismos, aeróbios e anaeróbios, origina com frequência a formação de zonas com aeração diferencial, promovidas pela atividade metabólica de microrganismos que consomem oxigênio, os quais propiciam condições adequadas ao desenvolvimento de espécies anaeróbias. As zonas sem oxigênio comportam-se anodicamente, se comparadas com as demais, e são centros potenciais de ataque ao metal (VIDELA, 1981; TILLER, 1986).

A Figura 3.3 ilustra um modelo de corrosão microbiana com a participação de grupos metabólicos distintos, sob condições aeróbias e anaeróbias no interior de um biofilme (HAMILTON e MAXWELL, 1986). Pela atividade inicial de espécies aeróbias e facultativas, a concentração de oxigênio diminui no interior do biofilme, concomitantemente com o crescimento da massa bacteriana.

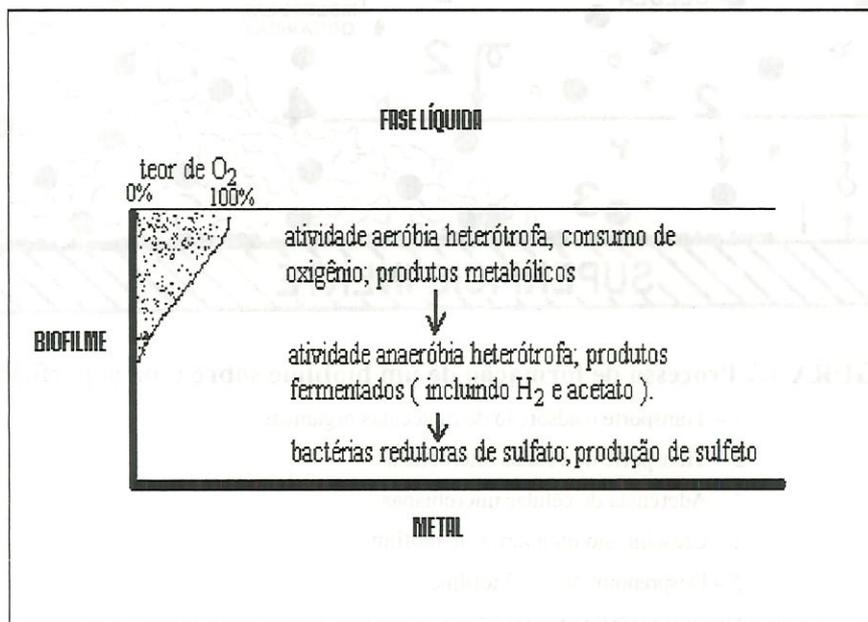


FIGURA 3.3 Distribuição dos diferentes grupos metabólicos no interior de um biofilme segundo a concentração de oxigênio.

Fonte: HAMILTON e MAXWELL (1986)

Esse consórcio microbiano no biofilme produz efeitos sinérgicos, incapazes de serem originados pelas espécies crescendo isoladamente. Por exemplo, a coexistência de

espécies aeróbias e anaeróbias sobre superfícies de aço-carbono permite que bactérias capazes de reduzir os compostos férricos (insolúveis) a ferrosos (solúveis), provoquem a dissolução de camadas passivantes do ferro constituídas, predominantemente, por óxidos e hidróxidos férricos. Dessa maneira, o acesso do sulfeto à superfície do metal é facilitado, bem como de outros produtos corrosivos gerados pelas BRS (VIDELA, 1995; 1996).

As chamadas bactérias aeróbias do ferro, pertencentes aos gêneros *Gallionella*, *Leptothrix* e *Crenothrix* que oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+} desempenham papel importante nesse processo de formação de zonas com aeração diferencial, pois consomem oxigênio e precipitam óxidos e hidróxidos de ferro na forma de pequenos tubérculos (BORZANI, 1975; VIDELA, 1981) impedindo o acesso de oxigênio em algumas regiões.

É comum este tipo de corrosão no interior de tubulações de redes de distribuição de água, onde, por ação bacteriana, formam-se incrustações compostas por um núcleo de sulfeto de ferro e camadas superficiais de hidróxido ferroso, carbonato de ferro e carbonato de cálcio (VIDELA, 1981). No interior dessas formações, encontram-se as BRS que criam condições propícias para a corrosão localizada na base do tubérculo, geralmente casos de corrosão por “pitting” (VIDELA, 1981; HAMILTON, 1985).

WESTLAKE *et al.* (1986) relataram que *Nitrosomonas* spp, bactéria do ciclo do nitrogênio, também pode estar relacionada com o processo corrosivo por fornecer nitrato, principalmente para espécies de *Pseudomonas*, encontradas muitas vezes associadas às BRS.

Na Tabela 3.3 são mostradas as reações que ocorrem durante o processo corrosivo em uma superfície metálica, entre elas a reação proveniente do metabolismo das BRS, responsável pela despolarização catódica (reação d). As reações anódicas da solubilização do metal e as reações catódicas realizadas pelas BRS devem ocorrer balanceadamente, a fim de preservar a neutralidade eletroquímica do meio (TILLER, 1986).

Segundo CORD-RUWISCH e WIDDEL (1986), quando ferro está imerso em água, há uma liberação de cátions Fe^{++} tomando a superfície do metal carregada negativamente pelos elétrons remanescentes da reação anódica (reação a). O processo de dissolução continuaria se os elétrons fossem removidos, por exemplo, pelo oxigênio, que age como acceptor destes elétrons resultando na formação de óxidos. Na ausência de oxigênio, estes elétrons reduzem os prótons provenientes da dissociação da água (reação b), formando

hidrogênio, que permanece na superfície do metal (reação c) protegendo o ferro da dissolução. Estabelece-se então um equilíbrio dinâmico, que mantém o ferro polarizado pela camada de hidrogênio (polarização catódica).

TABELA 3.3 Reações envolvidas no processo de biocorrosão anaeróbia em uma superfície metálica submersa em água

a) Reação anódica	$4\text{Fe} \rightarrow 4\text{Fe}^{2+} + 8\text{e}^-$
b) Dissociação da água	$8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\text{H}^+ + 8\text{OH}^-$
c) Reação catódica	$8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow 8\text{H} \rightarrow 4\text{H}_2$
d) Despolarização catódica (BRS)	$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{OH}^-$
e) Formação de produtos de corrosão (I)	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS} + 2\text{H}^+$
f) Formação de produtos de corrosão (II)	$3\text{Fe}^{2+} + 6(\text{OH})^- \rightarrow 3\text{Fe}(\text{OH})_2$
g) Reação global	$4\text{Fe} + \text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeS} + 3\text{Fe}(\text{OH})_2 + 2\text{OH}^-$

Fonte: HAMILTON (1985); CORD-RUWISCH e WIDDEL (1986); FONSECA *et al.* (1996)

A teoria da despolarização catódica (TDC), proposta por VON WOLZOGEN KUHR e VAN DER VLUGT⁸, sugere que em ambientes anaeróbios, o passo principal para a biocorrosão é a remoção do hidrogênio formado no cátodo, pelo sistema da enzima hidrogenase presente nas BRS (reação d) (FONSECA *et al.* 1996; VIDELA, 1981; STARKEY, 1986; DUQUETTE e RICKER, 1986). Essas bactérias apresentam grande habilidade em metabolizar hidrogênio molecular. No entanto, não são todas as BRS que apresentam hidrogenase, sendo responsáveis pela processo corrosivo, segundo a TDC, somente as espécies com hidrogenase positiva (TILLER, 1986).

Segundo a TDC, as BRS estão envolvidas com a corrosão por utilizarem o hidrogênio passivante como fonte de energia para a redução do sulfato, permitindo que a superfície do metal seja oxidada (WIDDEL, 1988). O sulfeto produzido pelo metabolismo dessas bactérias é combinado com o ferro oxidado, formando-se FeS

Alguns investigadores acreditam que esse mecanismo é fundamental na corrosão do ferro e aço, pois numerosos experimentos usando BRS em cultura pura confirmam essa teoria. BOOTH⁹ *et al. apud* TILLER (1986) mostraram que culturas puras

⁹ BOOTH, G.H.; ELFORD, L.; WAKERLEY, D. S. (1964). *Br. Corros. J.* v. 3, p. 242-245.

de BRS mesófilas, halófilas e termófilas, com hidrogenase positiva, foram capazes de despolarizar um catodo. CORD-RUWISCH e WIDDEL (1986) realizaram ensaios com *Desulfovibrio sapovorans* em que evidenciaram uma maior produção de sulfeto em meio de cultura com lactato e fios de aço, quando comparado ao cultivo apenas em meio com lactato.

Três gêneros de BRS, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfobacter postgatei* e *Desulfobulbus propionicus* foram testados a fim de determinar a sua participação no processo corrosivo. No entanto, os resultados indicaram que apenas a cultura *Desulfovibrio vulgaris* apresentou atividade corrosiva (GAYLARDE, 1992). Experimentos realizados por LEE e CHARACKLIS (1993) confirmaram a participação da espécie *Desulfovibrio desulfuricans* no processo corrosivo, aumentando proporcionalmente com o aumento da concentração de ferro. Estudando três espécies de *Desulfovibrio*, *D. salexigens*, *D. vulgaris* e *D. multispirans*, espécies conhecidamente hidrogenase positiva, CZECHOWSKI *et al.* (1990) determinaram que *D. salexigens* foi a espécie que utilizou mais eficientemente o hidrogênio proveniente de cupons de aço como única fonte de energia.

Contudo, alguns pesquisadores (MILLER e TILLER¹⁰ *apud* DUQUETTE e RICKER, 1986) têm reportado que outros fatores devem ser considerados na corrosão anaeróbia, incluindo a despolarização catódica pelo FeS. Este composto age como um catodo, assim como um metal nobre, e facilita a despolarização (CORD-RUWISCH e WIDDEL, 1986). Sendo assim, não apenas as BRS hidrogenase positiva estariam envolvidas na despolarização catódica, mas todos os gêneros poderiam causar corrosão devido à produção de sulfeto. A Figura 3.4 ilustra as atividades de BRS hidrogenase positiva e negativa no processo corrosivo.

Esse mecanismo foi confirmado por BOOTH⁹ *et al. apud* HAMILTON (1985), em experimentos com cupons de aço e BRS em crescimento na ausência de sulfato (substituído por fumarato), mas com adição gradual de FeS. Eles concluíram que a extensão da corrosão foi diretamente proporcional ao FeS adicionado, mas não excluíram a aceleração do processo corrosivo pela ação bacteriana direta. Experimentos realizados por LEE e CHARACKLIS (1993), suportaram a teoria de que o sulfeto produzido pelas BRS promove a corrosão de aço pela despolarização catódica, conforme a seguinte reação: $2\text{H}_2\text{S} + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{HS}^- + \text{H}_2$.

¹⁰ MILLER, J.D.A.; TILLER, A.K. (1979). *Microbial Aspects of Metallurgy*. Ed. J.D.A. Miller; Elsevier, England

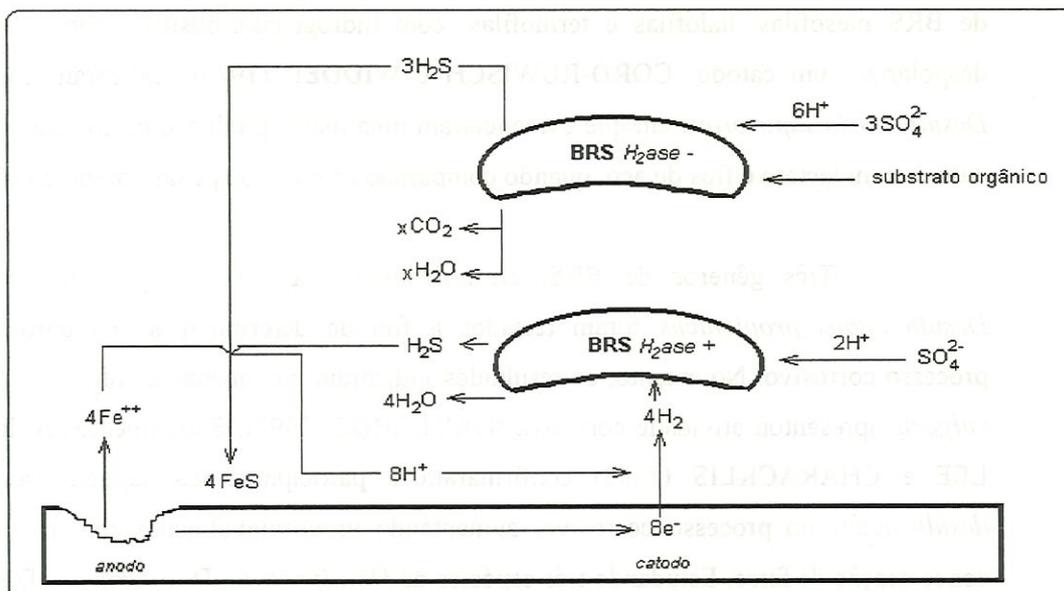


FIGURA 3.4 Processo corrosivo envolvendo BRS hidrogenase positiva e negativa

Fonte: CORD-RUWISH e WIDDEL (1986); FONSECA *et al.* (1994)

A corrosão devida à formação de metabólitos ácidos é usualmente associada aos microrganismos aeróbios, como as bactérias *Thiobacillus thiooxidans* e *T. ferrooxidans* e o fungo *Cladosporium resinae* (TILLER, 1986). Dentre os casos mais representativos, encontra-se o ácido sulfúrico produzido por bactérias aeróbias do gênero *Thiobacillus* (VIDELA, 1981; BORZANI, 1975). A produção de ácidos orgânicos, se bem que menos freqüente que a de ácidos minerais, tem sido detectada em condições de aerobiose parcial na indústria de açúcar, pela ação do *Lactobacillus delbrückii* (VIDELA, 1981).

Os mecanismos empregados para o controle da atividade de BRS têm sido através da aplicação de biocidas, e também pelo controle rigoroso dos nutrientes que permitem o desenvolvimento das BRS, como sulfato e fontes de carbono, além de nutrientes essenciais como fósforo e nitrogênio (OKABE *et al.*, 1992).

3.2.4 Biocorrosão em Indústrias Petrolíferas

Na indústria de Petróleo, em suas diferentes fases de extração, processamento, distribuição e armazenamento, apresentam sérios problemas de corrosão devido à presença de microrganismos e depósitos de "biofouling". A Figura 3.5 ilustra a diversidade de

sistemas suscetíveis à biocorrosão e “biofouling” em diversas estruturas de armazenagem metálicas e de concreto, ductos, trocadores de calor, etc., da indústria *offshore* de petróleo no Mar do Norte (SANDERS e HAMILTON, 1986; VIDELA, 1995), além da contaminação do petróleo com H₂S (OKABE *et al.*, 1992).

Uma simulação feita por LIGTHELM¹¹ *et al. apud* OKABE *et al.* (1992) indicou que a geração de H₂S, por BRS em sistemas de produção de petróleo, ocorre em uma zona entre água do mar injetada e água produzida, onde existe um gradiente espacial de fatores ambientais como temperatura e nutrientes. A temperatura varia amplamente durante a produção de petróleo, de -5 a -20°C correspondente à água do mar injetada, a 40–100°C como água produzida no final do processo (OKABE *et al.*, 1992). Em zonas cuja temperatura situa-se acima de 50°C, a redução de sulfato deve-se predominantemente à atividade de BRS termófilas, provavelmente pertencente aos gêneros *Desulfotomaculum* sp, *Thermodesulfobacterium* sp e *Archaeoglobus* sp (LEU *et al.*, 1996).

Em muitos casos o produto dos reservatórios *offshore* é uma mistura de óleo, água e gás. A água pode estar naturalmente presente no óleo ou pode ser injetada no sistema para manter a pressão adequada, e no caso do produto ser estocado em tanques de aço, estas condições podem gerar problemas corrosivos consideráveis (SANDERS e HAMILTON, 1986; EDYVEAN e VIDELA, 1994).

O óleo transportado pelos ductos, mesmo não contendo muita água, apresentam as condições mínimas para promover a atividade microbiana de bactérias facultativas e anaeróbias. Essas são encontradas em fluidos e tubérculos no interior dos ductos condutores de petróleo, especialmente os que usam água de injeção (EDYVEAN e VIDELA, 1994).

Esse ambiente rico em hidrocarbonetos e íons sulfato é propício para o crescimento bacteriano, especialmente BRS e bactérias aeróbias oxidadoras de hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos constituintes do óleo são oxidados pelas bactérias aeróbias na presença de oxigênio, promovendo as condições ideais para atividade das BRS. A água torna-se rapidamente estagnada e com significativa concentração de sulfeto de hidrogênio (EDYVEAN e VIDELA, 1994).

¹¹ LIGTHELM, D.J.; DE BOER, R.B.; GRINT, J.F. (1991). Reservoir souring: an analytical model for H₂S generation and transportation in an oil reservoir owing to bacterial activity. *Soc. Petrol. Eng. SPE* 19418. p. 369-378.

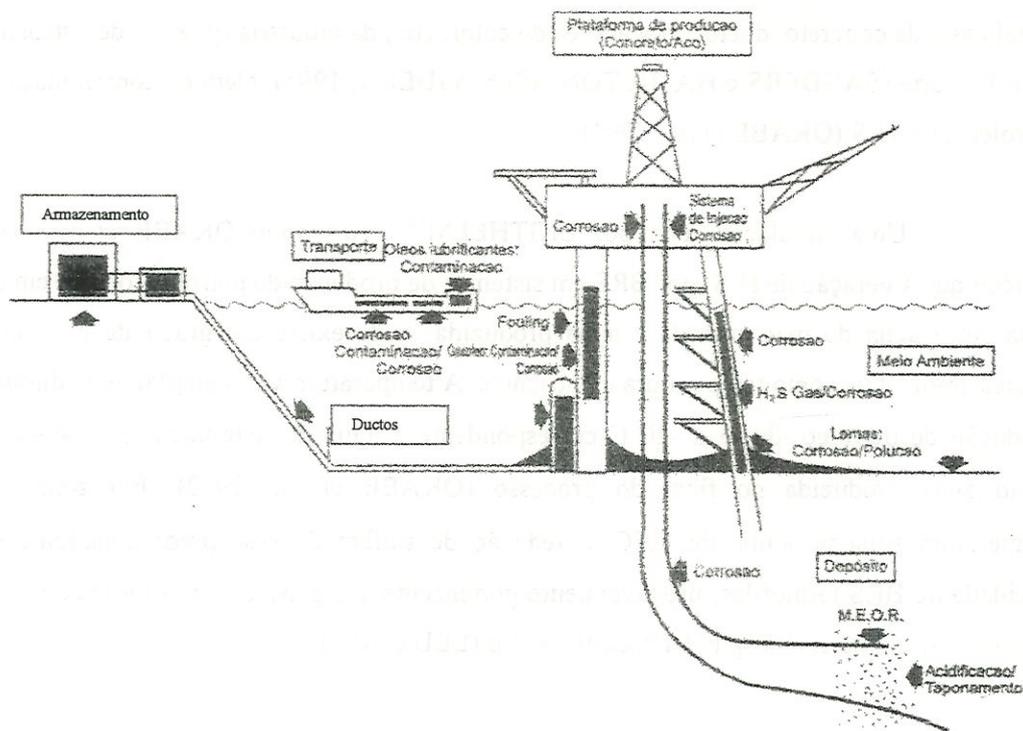


FIGURA 3.5 Diagrama esquemático da diversidade de estruturas e sistemas afetados por biocorrosão e “biofouling” na indústria de petróleo *offshore*

Fonte: SANDERS e HAMILTON (1986); VIDELA (1995)

Estudos desenvolvidos em sistemas de produção de óleo no Mar do Norte por SANDERS e HAMILTON (1986), indicaram que os maiores riscos de biocorrosão por BRS estão envolvidos no sistema de injeção com água do mar e não na superfície externa, onde a proteção catódica é efetiva. OKABE *et al.* (1992) alertaram que a injeção de água do mar em petróleo bruto resulta nos balanços de íons sulfato, temperatura e nutrientes orgânicos apropriados para o desenvolvimento de BRS em canalizações e reservatórios.

WESTLAKE *et al.* (1986) identificaram a relação sintrófica entre bactérias aeróbias, anaeróbias e facultativas em campos de petróleo (Figura 3.6). Primeiramente, os constituintes do petróleo como *n*-alcanos e compostos aromáticos de baixa massa molecular são utilizados por bactérias aeróbias e ou bactérias facultativas, produzindo compostos de como o ácido lático. Na ausência de oxigênio, o ácido lático é utilizado por bactérias facultativas e bactérias anaeróbias, como *Pseudomonas* sp e BRS, respectivamente. Esses grupos bacterianos estão envolvidos no processo de biocorrosão, pois a primeira é

responsável pela despolarização anódica transformando o Fe^{3+} em Fe^{2+} , acelerando o processo corrosivo, enquanto a segunda transforma sulfato em sulfeto. Estes dois produtos metabólicos se combinam-se e formam FeS . O sulfeto ferroso, misturado ao petróleo, estabiliza as fases óleo-água, causando problemas na sua separação (WIDDEL, 1988).

Nos fluidos produzidos utilizando-se fluxo de água (water-flooding) em campos de petróleo, observa-se uma ampla população de microrganismos aeróbios, facultativos e anaeróbios. Entre microrganismos isolados de sistemas de produção de petróleo capazes de atacar os cupons metálicos estão os gêneros *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Clostridium* (WESTLAKE *et al.*, 1986).

De acordo com estudos realizados pelo Cenpes/Petrobrás, a corrosão detectada em plataformas brasileiras *offshore* e em terra firme, nos equipamentos como tubos e oleodutos, ocorre devido a incrustações de sulfato de bário e BRS, ambos provenientes da água do mar tratada usada na injeção para recuperação do petróleo (MAGALHÃES *et al.*, 1996).

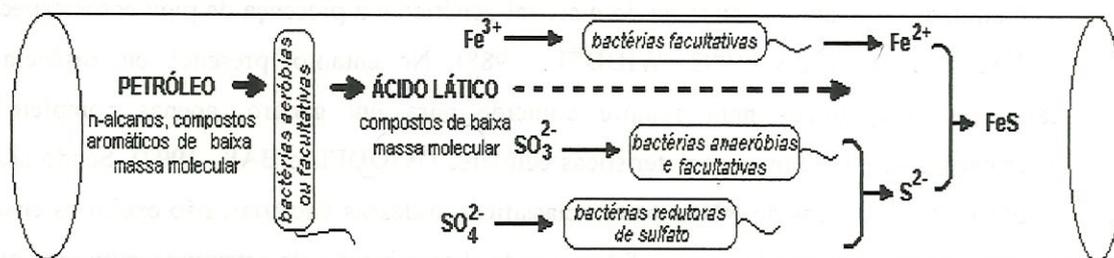


FIGURA 3.6 Interação entre bactérias aeróbias, anaeróbias e facultativas presentes em fluidos de campos de petróleo.

Fonte: WESTLAKE *et al.* (1986)

3.3 TAXONOMIA E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

As bactérias redutoras do íon sulfato fazem parte de um grupo heterogêneo de procariotos envolvendo espécies dos Domínios Bacteria e Archaea (HANSEN, 1994; WHITE, 1995), com a habilidade comum em utilizar o íon sulfato como acceptor final de elétrons, reduzindo-o a sulfeto e eliminando-o como produto do seu metabolismo (bactérias sulfetogênicas) (POSTGATE, 1979; WIDDEL e PFENNIG, 1984; WIDDEL, 1988; BROCK *et al.*, 1994; HANSEN, 1994; OLLIVIER *et al.*, 1994; WHITE, 1995).

A determinação das sequências de RNAr 16S é geralmente aceita como uma técnica decisiva para a definição taxanômica de bactérias, dentre elas as BRS (WIDDEL e BAK, 1992). Assim, análises morfo-fisiológicas celulares, juntamente com as moleculares, têm classificado as BRS na subdivisão delta das proteobactérias, exceto o gênero Gram-positivo *Desulfotomaculum* (DEVEREUX *et al.*, 1989; VOORDOUW, 1995).

A fisiologia e a sistemática das BRS são bastante reconhecidas (POSTGATE, 1979; WIDDEL e PFENNIG, 1984; WIDDEL, 1988). A sua classificação, portanto, baseia-se nas características nutricionais e morfológicas, suportada por alguns critérios químicos como a quantidade de guanina e citosina do material genético e a presença de pigmentos especiais (WIDDEL e HANSEN, 1992; WIDDEL, 1988). No entanto, presença ou ausência de caracteres bioquímicos nem sempre coincide para um gênero, apenas complementa informações sobre algumas características celulares (WIDDEL e BAK, 1992). Sendo assim, a aplicação de análises do RNAr para a classificação dessas bactérias, não exclui os ensaios microbiológicos de fisiologia, morfologia e de determinação de estruturas químicas como ferramentas para o entendimento e compreensão das culturas.

Comparações entre sequências do RNAr 16S têm revelado a presença de dois ramos (DEVEREUX *et al.*, 1990) dentro da subdivisão delta das Proteobactérias, os quais separam os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium* de outros membros, sugerindo o estabelecimento de duas famílias: *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteriaceae*. Os dois gêneros citados anteriormente compõem a família *Desulfovibrionaceae*, enquanto que os gêneros *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfobotolus*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfofarculus* e *Desulfobacterium* constituem a família *Desulfobacteriaceae* (WIDDEL e BAK, 1992; WIDDEL e HANSEN, 1992; OUDE

ELFERINK *et al.*, 1998). Segundo DEVEREUX *et al.* (1990), nessa subdivisão estão incluídas as bactérias mesófilas e Gram-negativas e que portanto, os gêneros *Thermodesulfobacterium* e *Desulfotomaculum* estariam fora desse grupo.

Uma árvore filogenética baseada no RNAr 16S de algumas espécies de BRS, determinada por KNOBLAUCH *et al.* (1999), é apresentada na Figura 3.7. Nela são destacados alguns gêneros de BRS pertencentes a subclasse delta de *Proteobacteria*. As espécies destacadas foram isoladas e identificadas pelos autores a partir de amostras de sedimentos marinhos psicrófilos

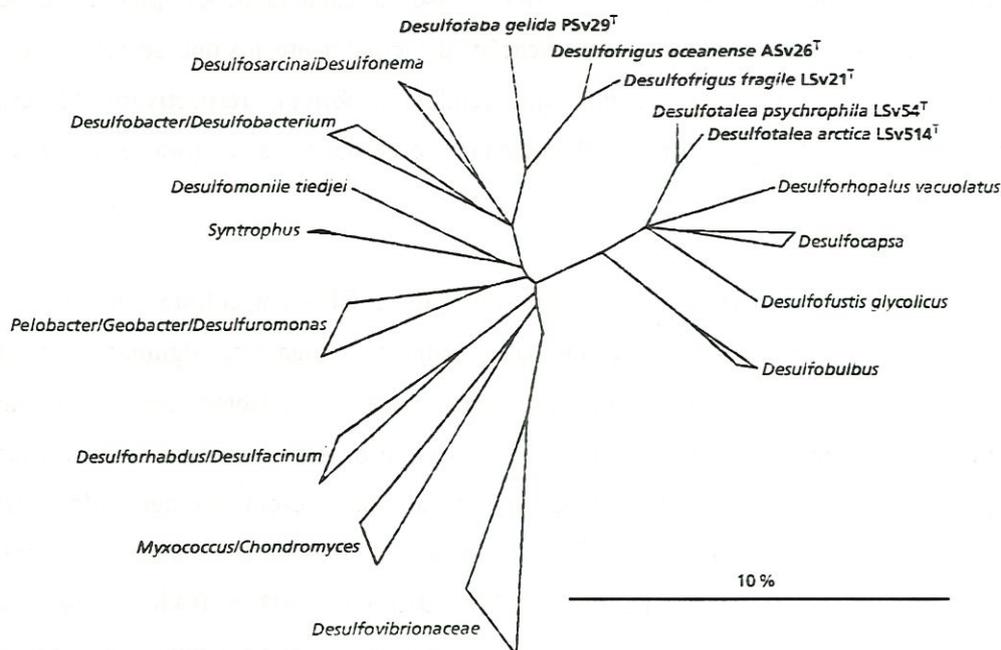


FIGURA 3.7 Árvore filogenética baseada no RNAr 16S de algumas espécies de BRS pertencentes a subdivisão delta de *Proteobacteria*

Fonte: KNOBLAUCH *et al.* (1999)

Nos primeiros trabalhos de pesquisadores sobre as BRS (POSTGATE, 1979), dois gêneros tornaram-se clássicos, o gênero *Desulfovibrio*, constituído por células bacterianas curvas e móveis, não formadoras de esporos, que utilizava preferencialmente os substratos orgânicos lactato e piruvato, realizando a oxidação incompleta desses substratos, e o outro grupo, cujas bactérias possuíam um metabolismo similar, porém, abrangendo

espécies formadoras de esporos, cujo gênero foi denominado *Desulfotomaculum* (WIDDEL, 1988). A formação de esporos é a principal característica que distingue os gêneros *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio* (WIDDEL, 1988). Posteriormente, outros tipos de BRS foram descritos, muitos com respostas fisiológicas e morfológicas diferentes dos gêneros anteriormente citados (WIDDEL, 1988).

São diferentes os tipos celulares de BRS descritos, incluindo cocos, bacilos longos retos ou ovais; bacilos curvos ou espirilos; células agregadas, com presença intracelular de vesículas de gás e filamentos (Tabela 3.1) (WIDDEL e BAK, 1992). No entanto, os aspectos morfológicos não constituem um bom critério para a descrição taxonômica, e podem ser discordantes das informações moleculares que classificam as células (WIDDEL e BAK, 1992). Além disso, a capacidade de pleomorfismo dessas bactérias pode comprometer a identificação, principalmente no que se refere aos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*, que tendem a formar, respectivamente, espirilos e filamentos, morfologias estas influenciadas pela idade da cultura e pelas condições ambientais (POSTGATE, 1979).

Alguns pesquisadores relataram que as BRS em cultura pura de laboratório, principalmente as originárias de ambientes salinos, agregam-se algumas vezes devido a condições desfavoráveis ao crescimento, tais como pH extremo, temperatura acima do ótimo, alta concentração de doadores de elétrons e de sais minerais, ou pela presença de compostos tóxicos. No entanto, sabe-se que na natureza, crescimento agregado pode ser uma característica de proteção comum às células, frente a condições desfavoráveis (PANKHURST, 1971; POSTGATE, 1979). DALSGAARD e BAK (1994), cultivando *Desulfovibrio desulfuricans*, observaram que quando a bactéria foi submetida à rotação de 60 rpm, o crescimento foi mais lento, a divisão celular quase cessou e que longas células espiraladas foram formadas.

Segundo WIDDEL e PFENNIG (1984), o pleomorfismo do gênero *Desulfovibrio* ocorre sob condições de *stress*, como altas concentrações de sulfeto, mas células jovens que estão no início da fase exponencial são morfológicamente constantes.

A maioria das BRS são móveis e apresentam flagelos para a locomoção. O gênero *Desulfotomaculum* possui flagelo peritríquio, enquanto que o gênero *Desulfovibrio*, monotríquio, porém, existem culturas de *D. desulfuricans* sem flagelos e imóveis

(POSTGATE, 1979). Outros gêneros imóveis apresentados na Tabela 3.1 são: *Desulfomonas*, *Desulfospira*, *Desulfohabdus*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* e *Desulfobacca*.

Alguns critérios químicos são usados na classificação das BRS, e segundo WIDDEL (1988) podem ser destacadas a composição da membrana, considerando-se a coloração de Gram, as enzimas e os transportadores de elétrons envolvidos em seu metabolismo.

Em geral, grande parte das bactérias marinhas é Gram-negativa e por possuírem membrana externa, apresentam melhores condições de vida em ambientes nutricionalmente diluídos como o ambiente aquático, isto porque estas bactérias lançam suas enzimas no espaço periplasmático evitando que se dispersem na água (PELCZAR *et al.*, 1993). A maioria das BRS foi descrita como Gram-negativa (Tabela 3.1), porém, células jovens de *Desulfotomaculum nigrificans* apresentam coloração Gram-positiva (POSTGATE, 1979; WIDDEL, 1988). Contudo, sob microscopia eletrônica, e segundo análises do RNAr 16S, considera-se a coloração de Gram de BRS uma característica insegura como diagnóstico para classificação das bactérias. Por exemplo, a espécie *Desulfotomaculum nigrificans* apresenta a composição da parede celular de um organismo Gram-positivo (NAZINA e PIVOVAROVA¹² *apud* WIDDEL, 1988), apesar de apresentar resposta negativa quando corada pelo método de Gram. O mesmo ocorreu com *Desulfotomaculum halophilum* (TARDY-JACQUENOD *et al.*, 1998). Atualmente esse gênero é classificado como Gram-positivo, permanecendo fora da subdivisão delta das proteobactérias, que abrange as células Gram-negativas (VOORDOUW, 1995; WIDDEL e BAK, 1992).

Citocromos, ferredoxinas, flavodoxinas, NAD⁺ e NADP⁺, entre outros, estão entre os transportadores de elétrons envolvidos no metabolismo de redutoras do íon sulfato, cujas funções estão destacadas na Tabela 3.4.

Segundo MOURA¹³ *et al. apud* HANSEN (1994), as BRS apresentam diferentes tipos de citocromos. Alguns gêneros possuem, em sua membrana, um citocromo de baixo potencial de oxi-redução, denominado citocromo c₃. Este citocromo está envolvido no transporte dos elétrons provenientes das fontes de energia para o íon sulfato do APS

¹² NAZINA, T.N.; PIVOVAROVA, T.A. (1979). Submicroscopic organization and sporulation in *Desulfotomaculum nigrificans*. *Engl. Transl. Mikrobiologiya*. v.48, p. 241-245

(adenosina fosfosulfato), mas não é encontrado em organismos que usam outros aceptores de elétrons. O citocromo c_3 está presente em todas as culturas de *Desulfovibrio* sp e em alguns outros gêneros. Nos gêneros que oxidam completamente o substrato é encontrado outro tipo de citocromo, o tipo b, presumivelmente envolvido na cadeia transportadora de elétrons dessas espécies, e ausente nas oxidadoras incompletas (BROCK *et al.*, 1994). Alguns gêneros não formadores de esporos apresentam citocromos dos tipos c e b; outros apresentam apenas um deles, como *Desulfotomaculum* sp, que apresenta apenas o tipo b (WIDDEL, 1988).

Os transportadores de elétrons e as enzimas envolvidas na redução do íon sulfato têm sido investigadas, principalmente em espécies de *Desulfovibrio* e de *Desulfotomaculum* (WIDDEL, 1988). Entre as enzimas, destacam-se: hidrogenases, desidrogenases e redutases.

Segundo CZECHOWSKI *et al.* (1990), espécies de *Desulfovibrio* podem conter três tipos de hidrogenases que têm sido encontradas no citoplasma, como em *Desulfovibrio multispirans*; no periplasma, como em *Desulfovibrio vulgaris* e em *Desulfovibrio salexigens* e na membrana celular. Algumas BRS que apresentam hidrogenase podem reduzir sulfato com hidrogênio molecular (PANKHURST, 1971). Também foi constatado nesse gênero, a presença das enzimas D-lactato, L-lactato, piruvato e formiato desidrogenases (WIDDEL, 1988).

A ATP sulfurilase, como será visto no item 3.5 deste capítulo, é a enzima que ativa o íon sulfato a APS, porém não é encontrada apenas em BRS. Essa enzima catalisa também o primeiro passo da reação assimilativa do sulfato em bactérias e plantas, mas muitas diferenças químicas existem entre as ATP sulfurilases dos dois processos (WIDDEL, 1988). A APS redutase é a enzima que reduz o APS a sulfito e AMP, e também está presente no gênero *Thiobacillus*, uma bactéria capaz de oxidar o sulfeto, e em bactérias púrpuras fotótrofas (HANSEN, 1994). Somam-se às redutases, a sulfito redutase e a tiosulfato redutase (WIDDEL, 1988).

¹³ MOURA, J.J.G.; COSTA, C.; LIU, M-Y; MOURA, I.; LEGALL, J. (1991). Structural and functional approach toward a classification of the complex cytochrome c system found in sulfate-reducing bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1058, p. 61-66

TABELA 3.4 – Transportadores de elétrons encontrados em bactérias redutoras de sulfato e suas possíveis funções.

TRANSPORTADORES DE ELÉTRONS	POTENCIAL MÉDIO (mV)	POSSÍVEIS FUNÇÕES
NAD ⁺	-320	Aceptor de ADH (muitas espécies); acceptor de AlaDH (<i>Dsv m</i>); acceptor de MDH (<i>Dsb</i>); acceptor de GAPDH (<i>Dsv m</i>)
NADP ⁺	-320	Aceptor de ME (<i>Dsv</i>); acceptor de IDH (<i>Dsbcter</i>); redução do urânio (<i>Dsv. vulgaris</i>)
Citocromo c ₃ – tsm	-50 a -400	Aceptor de hidrogenase periplásmica; acceptor de FDH (<i>Dsv gigas</i>)
Citocromo c ₃ octaheme – ctp	?	redução do tiosulfato (caminho do tritionato) (<i>Dsv</i>)
Citocromo c ₃ hexadecaheme – tsm	?	Aceptor de hidrogenases
Citocromo c ₃ monoheme – tsm	ca.0	Aceptor de FDH (<i>Dsv</i>) ?
^b Citocromo c ₃ tetraheme – tsm	-12- a -320	nd
Citocromo c hexaheme – tsm	?	Nitrito redutase (<i>Dsv desulfuricans</i>)
Citocromo b – tsm	?	SucDH (<i>Dsb</i> ; <i>Dsv. gigas</i>)
Menaquinona – tsm	-73	Aceptor de LDH, NADHADH
Rubredoxina – inc	0 a -50	Doador para a APS redutase; transporte de elétrons do NADH para O ₂
Rubreritrina – ctp	+230	redução do tritionato para tiosulfato e bissulfito (<i>Dsv. vulgaris e desulfuricans</i>)
Flavodoxina – ctp	-150 / -440	Alternativa para ferredoxina
Ferredoxina II – ctp	-130	Doador de bissulfito redutase
Ferredoxina I – ctp	-440	Aceptor de PDH e AIDH (<i>Dsv</i>)
Menaquinona		transporte de elétrons durante a oxidação do acetato
Desulforedoxina	-35	nd
Desulfoferredoxina	?	nd
Flavoredoxina	-348	Transfere elétrons para a bissulfito redutase

ABREVIACÕES: ADH: álcool desidrogenase; AIDH: aldeído desidrogenase; AlaDH: alanina desidrogenase; CIT: citocromo; FDH: formiato desidrogenase; SucDH: succinato desidrogenase; H₂ase: hidrogenase; IDH: isocitrato desidrogenase; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; MDH: malato desidrogenase; ME: enzima málica; LDH: lactato desidrogenase; PDH: piruvato oxiredutase; NADH/NAD⁺: desidrogenases; *Dsb*: *Desulfobulbus* sp; *Dsbcter*: *Desulfobacter* sp; *Dsv*: *Desulfovibrio* sp; m: marinho. tsm :transmembrana, ctp: citoplasmática, ?: localização incerta, nd: não determinado

^a LOVLEY *et al.* (1993) ^b WIDDEL, (1988) ^c FAUQUE *et al.* (1991) *apud* WIDDEL e HANSEN, (1992)

Fonte: HANSEN (1994)

A enzima desassimilativa sulfito redutase (também chamada de bisulfito redutase em pH 7) das BRS é encontrada em quatro diferentes formas: desulfoviriidina, presente principalmente nas espécies de *Desulfovibrio* utilizadoras de hidrogênio e lactato (POSTGATE, 1979; WIDDEL e PFENNIG, 1984; BROCK *et al.*, 1994); desulforubidina, em *Desulfomicrobium* sp; P582, em *Desulfotomaculum* sp; e desulfofuscidina, em *Thermodesulfobacterium* sp (WIDDEL e HANSEN, 1992; HANSEN, 1994; LIU e PECK JR., 1981).

As bissulfito redutases de BRS são diferentes no espectro de absorção ou em suas propriedades químicas (SIEGEL¹⁴ *apud* WIDDEL, 1988), porém uma única forma é encontrada em cada espécie (STANIER *et al.*, 1987). Quanto à sua localização, não há evidências físicas que indiquem que as bissulfito redutases são associadas à membrana (WIDDEL, 1988). A desulfovirdina produz uma siroporfirina, que em meio alcalino, apresenta uma coloração vermelho fluorescente, um teste típico para diagnosticar a presença da bissulfito redutase (POSTGATE, 1979; WIDDEL, 1988). Sua função está descrita no item 3.5.

WIDDEL (1988) comentou ainda sobre a existência de duas outras enzimas, a catalase e a superoxidase dismutase, envolvidas na respiração do oxigênio em organismos aeróbios, mas observadas também em *Desulfovibrio vulgaris*, *D. gigas* e *D. desulfuricans*. LIU e PECK¹⁵ *apud* WIDDEL (1988) isolaram em *D. desulfuricans* um citocromo agindo como uma nitrito redutase.

3.4 DIVERSIDADE NUTRICIONAL DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO COM RELAÇÃO À OXIDAÇÃO DOS SUBSTRATOS ORGÂNICOS E REDUÇÃO DOS COMPOSTOS INORGÂNICOS

3.4.1 Substratos utilizados como fonte de carbono e energia para a redução do sulfato

3c [As BRS são, em sua maioria, quimiorganótrofas (WIDDEL e PFENNIG, 1984) e utilizam compostos orgânicos de baixa massa molecular como lactato, piruvato, malato, etanol e ácidos graxos de cadeia curta (POSTGATE, 1979; LAANBROEK e PFENNIG, 1981; WIDDEL, 1988;), produzidos como metabólitos ou produtos finais de organismos fermentativos ou aeróbios (OLLIVIER *et al.*, 1994). carbonos, açúcares (glicose e frutose) e em alguns casos indol, fenol ou catecol (OLLIVIER *et al.*, 1994).]

¹⁴ SIEGEL, L.M. (1975). Biochemistry of the sulfur cycle. In: *Metabolism of sulfur compounds – Methabolic pathways*. D. M. Greenberg (Ed). Academic Press. NY. v.7, p. 217-286.

¹⁵ LIU, M.C.; PECK JR, H.D. (1981). The isolation of a hexaheme cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* and its identification as a new type of nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* v. 256, p. 13159-13164

Entretanto, existem espécies mixotróficas, capazes de utilizar apenas o H_2 como fonte de elétrons (WIDDEL e PFENNIG, 1984), além das fontes orgânicas. Poucas espécies podem usar álcoois com mais de três carbonos, açúcares (glicose e fucose) e em alguns casos indol, fenol ou catecol (OLLIVIER *et al.* 1994). Apesar de serem classificadas como organismos heterótrofos, alguns gêneros podem crescer autotroficamente com CO_2 como fonte de carbono (WIDDEL, 1988). É comum a existência de metabolismo fermentativo em alguns gêneros (WIDDEL e PFENNIG, 1984).

HAMILTON (1985) comenta que estudos quantitativos realizados com substratos marcados evidenciaram que, em sedimentos marinhos, 10% do hidrogênio, 50% do acetato, 10% do propionato e 10% do butirato foram utilizados durante a redução do sulfato, e que lactato e acetato, em lagos eutrofizados, não suportam este metabolismo.

A Tabela 3.5 apresenta os substratos orgânicos utilizados pelas espécies de BRS durante a redução do sulfato, bem como a classificação das BRS segundo a oxidação dos mesmos.

Como mencionado anteriormente nos parágrafos relacionados à biocorrosão e à caracterização morfológica, as bactérias redutoras de sulfato são divididas em dois grupos fisiológicos distintos, em relação à oxidação do substrato orgânico: um grupo capaz de oxidar completamente os substratos orgânicos (inclusive acetato) a CO_2 , denominado oxidador completo, e um grupo oxidador incompleto que não apresenta os mecanismos enzimáticos envolvidos na oxidação total do substrato, produzindo acetato nesta oxidação (POSTGATE, 1979; WIDDEL, 1988; BROCK *et al.*, 1994; HANSEN, 1994).

A via de oxidação do acetyl-CoA, presente em alguns gêneros, é usualmente associada à habilidade em também usar acetato como substrato de crescimento, como o gênero *Desulfobacter*. Contudo, outros oxidadores completos podem apresentar crescimento mais lento nesse substrato (WIDDEL e HANSEN, 1992). Somam-se aos oxidadores completos *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfotomaculum sapomandens* e *Desulfovibrio baarsii* (WIDDEL, 1988; BROCK *et al.*, 1994). Dentre as espécies de *Desulfotomaculum* que utilizam o acetato, um bom crescimento pode ser obtido sob elevadas temperaturas (OUDE ELFERINK *et al.*, 1995).

A eficiência na utilização do acetato não é a mesma para todas as oxidadoras completas, provavelmente devido ao mecanismo de utilização desse substrato. Tipos especializados como *Desulfobacter* sp, usam acetato como único substrato orgânico e crescem vigorosamente. Outras oxidadoras completas preferem outros ácidos orgânicos ou álcoois, e usam acetato muito lentamente, com baixa produção celular; por exemplo a *Desulfovibrio baarsii* (oxidador incompleto) apresenta um coeficiente de produção celular (Y) em torno de 0,7 - 1,4 g/mol, enquanto que a *Desulfobacter postgatei* (oxidador completo), 3,4 - 4,8 g/mol (WIDDEL, 1988).

Existem dois caminhos para a oxidação do acetil-CoA a CO₂ sob condições anaeróbias: o ciclo modificado dos ácidos tricarbóxicos (TCAm) (BRANDIS-HEEP *et al.*, 1983; WHITE, 1995), presente nas culturas típicas de ambiente marinho do gênero *Desulfobacter*, e a via do acetil-CoA, também chamada de via do monóxido de carbono (BRANDIS-HEEP *et al.*, 1983).

Estudos desenvolvidos por BRANDIS-HEEP *et al.* (1983) com a espécie *Desulfobacter postgatei*, confirmaram a presença de todas as enzimas necessárias para a oxidação do acetato via TCAm. Durante o metabolismo, há formação de acetil-CoA pela ação da enzima CoA transferase, que catalisa a transferência do grupo CoA do succinil-CoA produzido no TCAm (STANIER *et al.*, 1987; BROCK *et al.*, 1994).

A via do acetil Co-A é utilizada pelas espécies *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfobacterium* sp, *Archaeoglobus fulgidus* (SPORMANN e THAUER, 1988), *Desulforhabdus amnigenus* e *Desulfobacca acetoxidans* (OUDE ELFERINK *et al.*, 1995), e envolve uma série de reações não-cíclicas, porém reversíveis (BROCK *et al.*, 1994). Essa via metabólica é encontrada em bactérias capazes de crescer autotroficamente com CO₂ produzindo acetato, porém o sentido inverso do processo é utilizado por algumas bactérias redutoras de sulfato, incluindo os gêneros citados acima, no qual acetato é oxidado a CO₂ (BROCK *et al.*, 1994). Nesse metabolismo, acetil-CoA libera grupos metila e carbonila, que serão oxidados a CO₂ por vias distintas (BROCK *et al.*, 1994; SPORMANN e THAUER, 1988).

Um aspecto interessante é que, apesar de energeticamente equivalentes, a oxidação via ciclo modificado dos ácidos tricarbóxicos, utilizado por *Desulfobacter* sp parece ser mais eficiente que a via do acetil-CoA (HANSEN, 1994).

Usualmente, o termo oxidador completo contempla os gêneros capazes de oxidar completamente o substrato a CO₂, porém é importante ressaltar que essa classificação não exclui a eventual eliminação de acetato por esses grupos (STAMS *et al.*¹⁶. *apud* HANSEN, 1992). Uma explicação para a excreção de acetato ocorre quando a formação do acetil-CoA é mais rápida que as reações catabólicas de oxidação carbonácea; o acúmulo de acetil-CoA proporciona a formação de acetato, e este é excretado (BRANDIS-HEEP *et al.*, 1983).

Aparentemente, os gêneros oxidadores incompletos possuem um mecanismo enzimático diferente do TCAm, que permitiria a oxidação do acetato (formação do acetil-CoA) originário dos substratos (WIDDEL e PFENNIG, 1984). Somente compostos com até dois carbonos podem ser oxidados completamente, tais como oxalato, glicina, formiato e metanol (WIDDEL e HANSEN, 1992; BROCK *et al.*, 1994). Contudo, o acetato poderá ser assimilado como fonte de carbono orgânico no material celular, quando essas bactérias utilizarem o hidrogênio ou o formiato como doadores de elétrons (WIDDEL, 1988). [As BRS desse grupo são nutricionalmente menos versáteis que as oxidadoras completas.] Provavelmente, entre as incompletas, a mais versátil seja a *Desulfovibrio* sp, que usa H₂, lactato, piruvato, malato, fumarato, etanol, glicerol e aminoácidos (BROCK *et al.*, 1994).

Nenhuma evidência da oxidação de ácidos voláteis, como ácido acético, por BRS, tem sido demonstrada em ambientes altamente salinos, indicando que as culturas desses ambientes são, principalmente, oxidadoras incompletas. Esse processo favorece o acúmulo de acetato nos sedimentos. O aumento da concentração de NaCl em 30% em ambientes com BRS ativas, resultou em aumento nos níveis de acetato, em torno de 800 µM, indicando que a oxidação completa da matéria orgânica é drasticamente reduzida sob altas concentrações de sais (OREN¹⁷ *apud* OLLIVIER *et al.*, 1994).

¹⁶ STAMS, A.J.M.; HANSEN, T.A.; SKYRING, G.W. (1985). Utilization of amino acids as energy substrate by two marine *Desulfovibrio* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*

¹⁷ OREN, A. (1988). Anaerobic degradation of organic compounds at high salt concentrations. *Antonie Leeuwenhoek*. v. 54, p. 267-277.

TABELA 3.5 (cont) – Substratos orgânicos e inorgânicos utilizados por espécies de BRS

ESPÉCIES DE BRS	de	Oxidação	Necessidade NaCl (%)	Fermentação	DOADORES DE ELÉTRONS E FONTES DE CARBONO						ACEPTORES DE ELÉTRONS								
					lactato	acetato	malato	piruvato	etanol	formiato	H ₂	outros	sulfato	enxofre elementar	sulfito	tiosulfato	nitrito	oxigênio	outros
<i>Desulfobotulus</i>		i			+	-	-	-	-	-	-								
<i>Desulfomonas pigra</i>		i	-		+	-	nd	+	-	+			-						h
<i>Desulforhabdus amnigenus</i>		c	-	nd	nd	+	nd	nd	+	+	nd	prop	+	-	+	+	nd	nd	
<i>Desulfobacter postgatei</i>		c	0,7		-	+	-	-	-	-	-		+	-	+	+	-		
<i>hydrogenophilus latus</i>		c	1		-	+	-	-	(+)	-	c+								
<i>curvatus</i>		c	2		-	+	-	-	-	-	-								
		c	2		-	+	-	+	-	(+)					i+	i+			
<i>Desulfoarculus</i>		c			-	(+)	-	-	-	-									
<i>Desulfomicrobium</i>		i			+	-	+		(+)		+								
<i>Desulfospira jorgensenii</i>			+	-	+		-	+		+	+		+	+	+	+			
<i>Desulfohalobium retbaense</i>		i	10	8+	+	-	-	+	+	+	+		+	+	+	+			
<i>Archaeglobus fulgidus</i>		c			+						+								
<i>profundus</i>		c			+						+								

Legenda: ^a espécies marinhas ^b com piruvato ^c Widdel ^d subespécie *aestuarii* ^e subespécie *oxamicus* ^f com malato ^g com lactato ou piruvato ^h exceto uma cultura ⁱ dismutação nd não determinado; gli glicose; but butirato; fur furfural; tol tolueno; acet acetona; prop propionato; met metanol; glice glicerol; al alanina; fru frutose; C₁₈ ácidos graxos com 18C; Cr Cr(VI); U (VI); qui quinoline ; ind indole; metil metilados; orgcl organoclorados t termófilo; m mesófilo; i incompleta; c completa; + com crescimento; (+) pouco crescimento; - sem crescimento

FONTE: CAMPBELL e POSTGATE (1965); WIDDEL e PFENNIG (1984); WIDDEL (1988); MIN e ZINDER (1990); WIDDEL e BAK (1992); WIDDEL e HANSEN (1992); LOWE *et al.* (1993); HANSEN (1994); OLLIVIER *et al.* (1994); VOORDOUW (1995); FINSTER *et al.* (1997); JOHANSEN *et al.* (1997); TEBE e OBRAZTSOVA (1998); OUDE ELFERINK *et al.* (1998);

No entanto, segundo OUDE ELFERINK *et al.* (1995), a maioria das BRS Gram-negativas, utilizadoras de acetato, preferem condições marinhas para o crescimento, e a degradação de acetato pelas espécies de água doce como *Desulfoarculus baarsii*, *Desulfobacterium cathecolicum* e *Desulfococcus biacutus*, possibilita apenas um lento crescimento.

O acetato é um intermediário importante durante a decomposição anaeróbia de compostos orgânicos em ambientes naturais (BRANDIS-HEEP *et al.*, 1983), e duas possibilidades de degradação são conhecidas: sob concentração limitante de sulfato, o acetato é fermentado por organismos metanogênicos acetoclásticos a CH₄ e CO₂; sob disponibilidade de sulfato, é possível seu consumo pelas BRS utilizadoras desse composto (BRANDIS-HEEP *et al.*, 1983; WIDDEL, 1988).

O lactato tem sido usado como um excelente substrato orgânico para enriquecimento, isolamento e cultivo dos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (POSTGATE, 1979; WIDDEL e PFENNIG, 1984; WIDDEL, 1988). Como pode ser visto na Tabela 3.5, o lactato também é utilizado por alguns oxidadores completos como *Desulfobacter* sp, *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfovibrio baarsi*, *Desulfococcus niacini*, algumas espécies de *Desulfobacterium* e *Desulfonema* sp. Contudo, *Desulfovibrio baarsi*, a maioria das espécies de *Desulfobacter* e algumas espécies do gênero *Desulfobacterium*, *Desulfonema* e *Desulfotomaculum* não podem utilizá-lo (WIDDEL e PFENNIG, 1984; WIDDEL e HANSEN, 1992).

A oxidação do lactato a piruvato é mediada pela lactato desidrogenase, e o piruvato é descarboxilado para acetil-CoA, em *Desulfovibrio vulgaris*, com flavodoxinas ou ferredoxinas, usadas como aceptores de elétrons (WIDDEL e HANSEN, 1992).

POSTGATE (1979) e WIDDEL (1988) comentam que os ácidos dicarboxílicos envolvidos no TCA, como o ácido málico, ácido succínico e ácido fumárico, são substratos relativamente comuns para BRS oxidadoras completas e incompletas. Os ácidos fumárico e málico permitem um crescimento mais rápido, quando comparado ao ácido succínico (WIDDEL, 1988). KREMER¹⁸ *et al.* *apud* WIDDEL e HANSEN (1992), observaram que a

¹⁸ KREMER, D.R., NIENHUIS-KUIPER, H.E., TIMMER, C.J.; HANSEN, T.A. (1989). Catabolism of malate and related dicarboxylic acids in various *Desulfovibrio* strains and the involvement of an oxygen-labile NADPH dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* v. 151, p. 34-39

atividade da enzima malato desidrogenase depende de cátions divalentes (Mn^{2+} ou Mg^{2+}) e que é estimulada por íons K^+ .

3.1 [Entre as BRS que realizam a oxidação completa do substrato, muitas espécies oxidam o propionato, produto comum de muitas fermentações anaeróbias e da degradação de ácidos graxos de cadeia longa por culturas simtróficas. Na presença de sulfato, o propionato pode ser oxidado a acetato e CO_2 pelo gênero *Desulfobulbus* (LAANBROEK e PFENNIG, 1981). *Desulfococcus multivorans* pode oxidar propionato a CO_2 , e seu crescimento é duas vezes maior que o de *Desulfobulbus* sp (STAMS *et al*¹⁹. *apud* WIDDEL e HANSEN, 1992).]

3.1 [Ácido butírico e outros ácidos graxos como isobutírico e isovalérico são oxidados por muitas BRS, completa ou incompletamente (WIDDEL, 1988). O ácido isobutírico, utilizado como substrato orgânico em técnicas de enriquecimento de amostras de origem marinha, promove o desenvolvimento de espécies filamentosas como *Desulfonema limicola*, enquanto que o isovalérico pode selecionar *Desulfococcus multivorans*] ou tipos com células ovais, provavelmente espécies de *Desulfobacterium* (WIDDEL, 1988).

São várias as espécies de BRS, tanto as que oxidam completamente quanto as que oxidam incompletamente o substrato, que podem crescer utilizando etanol como fonte de energia (WIDDEL, 1988; HANSEN, 1994). Porém, as taxas de crescimento são baixas (HANSEN, 1994). WIDDEL (1988) comentou que enriquecimentos com etanol, em cultivos descontínuos de amostras naturais ou de culturas puras, podem inibir o crescimento das BRS em função do favorecimento da produção de compostos orgânicos de enxofre, a partir de aldeídos e sulfeto de hidrogênio que, possivelmente afetam a bactéria.

Durante o crescimento em etanol e sulfato, *Desulfovibrio gigas* e outras três culturas de *Desulfovibrio* examinadas apresentaram alta atividade da álcool desidrogenase, ausente no crescimento com lactato (WIDDEL e HANSEN, 1992). Com essa enzima, *Desulfovibrio gigas* oxida etanol a acetaldeído, que por sua vez é convertido a acetato via acetil-CoA, realizando fosforilação a nível de substrato, com produção de duas moléculas de ATP (HANSEN, 1994).

¹⁹ STAMS, A.J.M.; KREMER, D.R.; NICOLAY, K.; WEENK, G.H.; HANSEN, T.A. (1984). Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch. Microbiol.* v. 139; p. 167-173.

O crescimento quimilitotrófico de *Desulfovibrio* spp, na presença de H₂ como doador de elétrons, requer acetato e CO₂ como fonte de carbono para a biossíntese (WIDDEL, 1988). A oxidação do H₂ como fonte de energia para o crescimento tem sido claramente documentada, sendo que o hidrogênio e o acetato têm sido identificados como os principais nutrientes em sedimentos marinhos (HAMILTON e MAXWELL, 1986; WIDDEL, 1988).

BADZIONG *et al.* (1979) realizaram ensaios submetendo duas culturas do gênero *Desulfovibrio* a um meio mineral com H₂, SO₄²⁻ e CO₂, e em um segundo ensaio acrescentando acetato a esta condição. Seus resultados indicaram que 70% da biossíntese celular envolvendo a matéria carbonácea derivou do acetato, enquanto que apenas 30% foi proveniente do CO₂. A cultura que recebeu CO₂ como única fonte de carbono, não apresentou crescimento satisfatório. Nesse estudo também foi constatado que o acetato não participou da redução desassimilativa do sulfato, sendo o H₂ presente no meio o único responsável por essa via.

MIN e ZINDER (1990), estudando a fisiologia de *Desulfotomaculum thermoacetoxidans*, uma espécie de BRS oxidadora completa, determinaram que o crescimento com H₂/CO₂, como fonte de carbono e energia, ocorre apenas na presença de sulfato como aceptor final de elétrons e que, nessas condições, acetato sempre foi produzido e liberado pela célula. É possível que nesta condição, o acetil-CoA seja produzido a partir do H₂/CO₂, processo este semelhante ao realizado pelas bactérias acetogênicas.

A habilidade em crescer em formiato é característica de muitos gêneros de BRS, com detecção da atividade da enzima formiato desidrogenase em *Desulfovibrio* sp e em gêneros oxidadores completos, exceto em *Desulfobacter* sp. A utilização de formiato em gêneros oxidadores completos ocorre pelo caminho do monóxido de carbono, para a oxidação do acetil-CoA. O ácido fórmico, por ser menos lipofílico que o ácido acético, provavelmente não pode entrar na célula por difusão via membrana (WIDDEL e HANSEN, 1992), ocorrendo por transporte ativo.

A Tabela 3.6 apresenta as reações dos substratos utilizados por BRS. Nela são também destacadas as variações de energia livre sob condições padrões.

A primeira bactéria anaeróbia disponível em cultura pura capaz de realizar descloração redutiva em compostos aromáticos como o percloroetileno (PCE) foi a cultura DCB-1, isolada de um consórcio bacteriano em lodo de esgoto, e tem sido taxonomicamente descrita como *Desulfomonile tiedjei* (SHELTON e TIEDJEI, 1984). Segundo SHELTON e TIEDJEI (1984), a *Desulfomonile tiedjei* é capaz de obter energia para o crescimento a partir da descloração de 3-clorobenzoato, através de mecanismo respiratório quimiosmótico, indicando que pode existir uma vantagem seletiva para essa atividade, ou necessidade das células na destoxificação do ambiente em que se encontram.

TABELA 3.6 – Substratos orgânicos utilizados por BRS e os respectivos valores da variação de energia livre padrão.

SUBSTRATO	REAÇÃO	ΔG° kJ/mol reação ¹	ΔG° kJ/mol reação ²
LACTATO	$2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-160,1	-
	$2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 6\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-255,3	-
HIDROGÊNIO	$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow 4\text{H}_2\text{O} + \text{HS}^-$	-152,2	-
ACETATO	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47,6	-
PROPIONATO	$4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-150,6	-
FORMIATO	$4\text{CHOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$	-	-182,6
MALATO	$2\text{C}_2\text{HOHCOO}^{2-} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{CO}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$	-	-181,0
ETANOL	$2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} + \text{S}^{2-}$	-	-59,3
PIRUVATO	$4\text{CH}_3\text{COCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{CO}_2 + \text{S}^{2-}$	-	-331,0
SUCCINATO	$4\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}^{2-} + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{CO}_2 + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{S}^{2-}$	-	-150,4
FUMARATO	$2\text{C}_2\text{H}_2\text{COO}^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CO}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$	-	-190,1

¹ WIDDEL (1988) ² POSTGATE (1979)

MORT e DEAN-ROSS (1994) estudaram a biodegradação de compostos fenólicos (*p*-cresol e fenol), por BRS provenientes de sedimentos contaminados. Através da determinação de parâmetros cinéticos, particularmente pela observação do comprimento da fase lag de crescimento, observaram que culturas aclimatadas, ou seja, provenientes de regiões sujeitas à contaminação, apresentaram fase lag menor, quando comparada com culturas não aclimatadas, oriundas de ambientes não contaminados, porém, ambas puderam degradar o compostos.

Muitos compostos metilados na natureza têm sido utilizados por BRS, como betaina, dimetilsulfoniopropionato e metoxilados aromáticos pelos gêneros *Desulfomonile* e *Desulfobacterium*, além da espécie *Desulfotomaculum orientis* (HANSEN, 1994). JOHANSEN *et al.* (1997) estudaram a utilização de compostos heteroaromáticos como quinol e indol e seus metilados análogos, por uma espécie de BRS denominada

Desulfovibrio indolicum, capaz de utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia.

Na ausência de sulfato e de outro aceptor final de elétrons inorgânico, vários tipos de BRS podem crescer através da fermentação de substratos orgânicos (Tabela 3.5) (WIDDEL, 1988). Espécies de *Desulfovibrio* e de *Desulfovibrio* e a *Desulfosarcina variabilis* fermentam fumarato; *Desulfovibrio* sp fermentam também malato, sendo os produtos de fermentação o succinato, acetato, CO₂ e, algumas vezes, propionato. O piruvato é facilmente fermentado por espécies que usam lactato, como a espécie *Desulfovibrio desulfuricans*, que produzem acetato, CO₂ e H₂ (POSTGATE, 1979).

A presença dos substratos lactato e etanol parece ser uma boa condição para a ocorrência do metabolismo fermentativo em algumas espécies de *Desulfovibrio*, produzindo propionato e acetato (LAANBROEK *et al.*, 1984; WIDDEL e PFENNIG, 1984). Espécies de *Desulfovibrio* e de *Desulfotomaculum*, que não crescem através do metabolismo fermentativo do etanol ou do lactato, puderam crescer com esses compostos, na ausência de sulfato, em co-cultura com organismos metanogênicos hidrogenotróficos, obtendo energia apenas através da fosforilação a nível de substrato, ou seja, energia proveniente apenas da oxidação do substrato (BRYANT *et al.*, 1977; LIU e PECK JR, 1981).

3.4.2 Compostos inorgânicos utilizados como aceptores finais de elétrons

32 Um aspecto relevante diz respeito à versatilidade das bactérias e sua flexibilidade frente a diversas situações. Sob condições limitantes de sulfato, por exemplo em ambiente de água doce, algumas BRS podem executar um outro metabolismo, a fim de obter energia, como a fermentação ou a fosforilação oxidativa utilizando outros compostos aceptores de elétrons, como nitrato ou mesmo oxigênio (DILLING e CYPIONKA, 1990; HANSEN, 1994;). Na Tabela 3.5 estão relacionados alguns compostos inorgânicos utilizados como aceptor final de elétrons, por espécies de BRS.

A oxidação dos doadores de elétrons com um aceptor final de elétrons, geralmente, oferece duas vantagens, quando comparada ao catabolismo puramente fermentativo: - geração de ATP na cadeia transportadora de elétrons; - fosforilação a nível de substrato mais eficiente (WIDDEL e HANSEN, 1992).

Segundo observações de LIU e PECK JR. (1981), sob o ponto de vista energético, *Desulfovibrio* sp parece ser melhor adaptada a crescer em sulfato que *Desulfotomaculum* sp, pois gera três vezes mais ATP durante crescimento em lactato ou etanol na presença de sulfato. Portanto, as espécies de *Desulfovibrio* apresentam vantagens em ambientes ricos em sulfato, o que contribui para a explicação da existência de raras espécies de *Desulfotomaculum* sp marinhas (LIU e PECK JR, 1981).

A membrana das BRS não é livremente permeável para o sulfato e requer energia para o transporte. Segundo WIDDEL e HANSEN (1992), existe uma adaptação pelas BRS quanto a concentração de sulfato presente no meio. Sob concentrações limitantes, o transporte do sulfato para o interior da célula é eletrogênico, apresentando um fator de acúmulo na ordem de 10^3 a 10^4 , utilizando no mínimo 3 prótons por molécula de sulfato. Aumentando a concentração de sulfato, o fator de acúmulo diminui e a concentração interna de sulfato não excede 25 mM, sugerindo que a regulação do sistema de utilização do sulfato nesta condição evita gasto de energia e sobrecarga de sulfato desnecessária.

A utilização de sulfito e tiosulfato como aceptores alternativos de elétrons é muito comum entre espécies de BRS (WIDDEL e HANSEN, 1992; OLLIVIER *et al.*, 1994). Sulfito e tiosulfato são intermediários na redução do sulfato, e se um destes dois são adicionados ao meio de cultura como aceptores de elétrons, não é necessário sua ativação com ATP como ocorre com o sulfato (item 3.5) (WIDDEL, 1988). Estequiometricamente, a redução de 1 mol de tiosulfato por *Desulfovibrio vulgaris*, origina 2 moles de sulfeto (BADZIONG e THAUER, 1978)

A espécie *Desulfovibrio sapovorans* não reduz tiosulfato, e as espécies *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfobacter latus* e *Desulfonema magnum* não reduzem sulfito nem tiosulfato, provavelmente por carecerem de um sistema de transporte apropriado para esses compostos (WIDDEL, 1988). No entanto, *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* foi capaz de utilizar tiosulfato comoceptor final de elétrons, apresentando maior crescimento quando comparado ao sulfato (MIN e ZINDER, 1990).

Poucas espécies podem crescer em meio contendo enxofre elementar (WIDDEL e HANSEN, 1992), como a cultura Norway 4 do gênero *Desulfovibrio* (BIEBL e

PFENNIG²⁰ *apud* WIDDEL, 1988). Enxofre pode também inibir o crescimento de BRS na presença de sulfato como mostrado em *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfobacter postgatei* ou espécies de *Desulfonema* (WIDDEL, 1988).

Certas BRS têm a capacidade metabólica de utilizar sulfito e tiosulfato por um processo de fermentação inorgânica denominado dismutação ou transformação de parte da molécula, que envolve apenas o desmembramento da molécula de tiosulfato em sulfato e sulfeto, ou seja, a valência dos átomos de enxofre continua a mesma, não sofrendo nenhuma reação de oxi-redução (JØRGENSEN, 1990; JØRGENSEN e BAK, 1991; FINSTER *et al.*, 1998). Estudos comprovaram que a transformação parcial do sulfito e do tiosulfato para sulfato e sulfeto procede no sentido inverso das reações da redução desassimilativa do sulfato (KRAMER e CYPIONKA²¹ *apud* WIDDEL e HANSEN 1992).

BAUMAN e DENK²² *apud* McCREADY *et al.* (1983) constataram que culturas de *Desulfovibrio* sp são capazes de utilizar nitrato na ausência de sulfato como acceptor final de elétrons, resultando na redução do nitrato em íon amônia. Contudo, o mesmo artigo traz a informação dos trabalhos de STEENKAMP e PECK JR²³ *apud* McCREADY *et al.* (1983), no qual *Desulfovibrio desulfuricans* poderia utilizar nitrato desde que sulfato fosse adicionado como acceptor final de elétrons. Conclusões obtidas por McCREADY *et al.* (1983) e DALSGAARD e BAK (1994) indicaram que em ambientes sob concentrações limitantes de sulfato, e com nitrato disponível, *Desulfovibrio* sp pode obter energia pelo processo de redução de nitrato em adição ao metabolismo tradicional de redução do sulfato. O produto final deste tipo de redução disassimilativa do nitrato é amônia e não nitrogênio como as desnitrificantes verdadeiras (WIDDEL, 1988).

Na Tabela 3.7 são apresentadas a variação de energia livre da redução do sulfato, sulfito, tiosulfato e nitrato, pela espécie *Desulfovibrio desulfuricans*.

A redução do sulfato tem taxa máxima nas regiões profundas e altamente redutoras do sedimento, contudo foi evidenciada elevada atividade de redução de sulfato em ambientes óxicos (Eh>0 mV), regiões 2 cm acima do sedimento (JØRGENSEN e BAK,

²⁰ BIEBL, H.; PFENNIG, N. (1977). Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* v. 112, p. 115-117.

²¹ KRAMER, M.; CYPIONKA, H. (1989). Sulfate formation via ATP sulfurlyase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria. *Arch. Microbiol.* v. 151, p. 232-237.

²² BAUMANN, *; DENK, V. (1950). The physiology of sulfate reduction. *Arch. Mikrobiol.* V. 15, p. 283-307.

²³ STEENKAMP, D.J.; PECK JR, H.D. (1980). The association of hydrogenase and dithionite reductase activities with the nitrite reductase of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 94; p. 41-48.

1991). Existem outros estudos que envolveu cultivos de BRS sob condições aeróbias a fim de determinar a habilidade de algumas destas bactérias utilizarem oxigênio molecular (DILLING e CYPIONKA, 1990; VAN NIEL e GOTTSCHAL, 1998), contudo este mecanismo ainda não está bem estabelecido. Segundo WIDDEL e HANSEN (1992) e WIDDEL (1988), em ambientes oxidados as BRS usam um produto da oxidação química do sulfeto, muito provavelmente tiosulfato, comoceptor de elétrons sem experimentar oxigênio molecular.

TABELA 3.7 – Variações de energia livre da redução de alguns compostos utilizados por *Desulfovibrio desulfuricans*

SUBSTRATO	REAÇÃO	$\Delta G'$ (kcal/mol de reação)
SULFATO	$4H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-} + 4H_2O$	-173,8
SULFITO	$3H_2 + SO_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + 3H_2O$	-182,7
TIOSSULFATO	$4H_2 + S_2O_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + H_2S$	-193,7
NITRATO	$NO_3^- + 4H_2 + 2H^+ \rightarrow 3H_2O + NH_4^+$	-149,2

Fonte: POSTGATE (1979)

3.4.3 Taxas de crescimento e tempo de geração de culturas de BRS

Geralmente, os microrganismos são estudados como população e não como células individuais (VIDELA, 1996), sendo assim, o crescimento microbiano se refere ao aumento do número de células ou massa microbiana em uma população (BROCK *et al.*, 1994).

O ciclo de crescimento em sistemas descontínuos de uma população microbiana pode ser dividida em fases distintas: **fase lag**, que corresponde ao período de adaptação da cultura nas condições de cultivo; **fase exponencial**, que corresponde ao crescimento propriamente dito, onde a taxa de crescimento é constante devido à constante divisão celular; após a depleção dos nutrientes no meio, o crescimento exponencial cessa, iniciando a **fase estacionária** onde o número de células permanece estável, ou seja, o número de células viáveis (capazes de se reproduzir) e inviáveis está em equilíbrio; na **fase de declínio** as células se auto digerem, a morte predomina e a população diminui (BROCK *et al.*, 1994, VIDELA, 1996). A extensão da fase lag está associada as condições de cultivo

da cultura, ela pode estar ausente se as condições de cultivo do inóculo não são alteradas, porém pode ser extensa se o inóculo estiver na fase de declínio.

Segundo BORZANI (1990), as velocidades específicas (μ) de crescimento de microrganismos, de formação de produto e de consumo de substrato em um processo fermentativo, são parâmetros importantes no estudo da cinética do processo. Em um dado instante t do processo estudado, essas velocidades são comumente definidas do seguinte modo (LUEDEKING²⁴ *apud* BORZANI, 1990):

a) velocidade específica de crescimento do microorganismo: $\mu_x = dX/dtX$

b) velocidade específica de formação de produto: $\mu_p = dP/dtX$

c) velocidade específica de consumo do substrato: $\mu_s = -dS/dtX$

sendo X , P e S respectivamente, as concentrações do microrganismo, do produto e do substrato no instante considerado. Nessas definições dX/dt , dP/dt e $-dS/dt$ são, respectivamente, as velocidades de crescimento do microrganismo, de formação do produto e de consumo do substrato, todas no instante t .

Se a velocidade específica de crescimento do microrganismo é constante, a equação representa a chamada fase exponencial de crescimento, onde o crescimento é proporcional a massa celular presente e esta velocidade tem seu valor máximo (μ_{max}) (GOMES, 1995). O tempo necessário para que a célula se divida, ou para que a população se duplique, é conhecido como tempo de geração (T_g), que pode ser calculado conhecendo-se o valor de μ (VARESCHE, 1993), conforme a seguinte equação:

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad \text{Equação 3.1}$$

A Tabela 3.8 apresenta a taxa de crescimento máxima e o tempo de geração de algumas espécies de BRS. Constantes cinéticas mensuradas em laboratório podem ser diferentes nos ambientes naturais, onde as células estão sempre associadas a biofilmes e diferentes gradientes nutricionais e ambientais estão presentes (SONNE-HANSEN *et al.*, 1999).

²⁴ LUEDEKING, R. (1967). Fermentation Process kinetics. In: *Biochemical and Biological Engineering Science*. Ed. N. Blakebrough. Academic Press, London. v.1, 205p

Uma das dificuldades em comparar os valores dos parâmetros cinéticos é atribuída as diferentes metodologias tanto de mensuração de microrganismos quanto de substrato, e principalmente pelas condições de cultivo. Segundo BORZANI (1986) o estado de agitação do meio em fermentação pode afetar a cinética do processo. A agitação durante o cultivo de microrganismos, aumenta a taxa de utilização do substrato por facilitar a transferência de massa.

Estudos realizados por LAANBROEK *et al.* (1984), em cultivos em etanol e sulfato e sob 1,4% de salinidade, determinaram que a taxa máxima de crescimento específico para *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobulbus propionicus* e *Desulfovibrio bacuolatus* foram 0,13, 0,08 e 0,10 h⁻¹, respectivamente. No entanto, cultivando as mesmas espécies nas mesmas condições, porém em batelada, as taxas máximas de crescimento específico para as espécies estudadas foram 50 a 70% mais baixas.

Sob cultivo em lactato e sulfato, OKABE e CHARACKLIS²⁵ *apud* OKABE *et al.* (1992) obtiveram o valor do μ_{\max} para a espécie *Desulfovibrio desulfuricans*, 0,38 e 0,55h⁻¹ para temperatura de 25 e 43°C, respectivamente, decrescendo drasticamente fora desta faixa de temperatura. No entanto, OKABE *et al.* (1992), em seu próprio estudo, determinaram que em meio sob concentração limitante de sulfato o μ_{\max} foi de 0,344 h⁻¹ a 35°C. REIS *et al.* (1992) determinaram que uma cultura do gênero *Desulfovibrio* apresentou variação no valor do μ_{\max} conforme o aumento do pH, obtendo o valor máximo no pH 6,6.

3.4.4 Inibição da redução do sulfato e toxicidade do sulfeto

2c [O crescimento de muitas espécies de BRS é freqüentemente inibido por enxofre elementar, provavelmente por ser um oxidante que muda o potencial de oxi-redução no meio para valores positivos (WIDDEL e HANSEN, 1992).] SMITH e KLUG (1981b) pesquisaram a inibição da redução do sulfato por BRS com molibdato (Na₂MoO₄) que, por ser estereoquimicamente similar ao sulfato, pode inibir a adenosina trifosfato sulfurilase, a primeira enzima no caminho da redução do sulfato. Segundo sua pesquisa, a concentração de 20 mM de molibdato em ambiente marinho inibiu completamente a formação de sulfeto, enquanto que em ambiente de água doce, onde a concentração de sulfato é menor, 0,2 mM de molibdato foi suficiente para a inibição completa.

²⁵ OKABE, S.; CHARACKLIS, W.G. (1992). Effects of temperature and phosphorus concentration on microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 39, p. 1031-1042.



TABELA 3.8 – Parâmetros cinéticos μ_{\max} e Tg para algumas espécies de BRS

Espécie	μ_{\max}	Tg	Substratos
<i>Desulfoharbodus amnigenus</i> ¹	0,13-0,19 d ⁻¹	3,5-5,0 d	Acetato e sulfato
<i>Desulfoharbodus amnigenus</i> ¹	0,5 d ⁻¹	1,5 d	Formiato, propionato etanol e sulfato
<i>Desulfobacca acetoxidans</i> ²	0,32-0,41 d ⁻¹	1,7-2,1 d	Acetato e sulfato
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ³	0,15 h ⁻¹	4,6 h	Acetato, H ₂ e sulfato
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ³	0,21 h ⁻¹	3,3 h	Acetato, H ₂ e tiosulfato
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ⁴	0,06 h ⁻¹	10,2 h	Acetato, H ₂ , sulfato e nitrato
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ⁵	0,35 h ⁻¹	1,9 h	Lactato e sulfato
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ⁶	0,38-0,55 h ⁻¹	1,2-1,8 h	Lactato e sulfato
<i>Desulfovibrio</i> sp ⁷	0,33 h ⁻¹	2 h	Lactato e sulfato
<i>Desulfobacter</i> sp ⁸	0,8-1,1 d ⁻¹	0,6-0,9 d	Acetato e sulfato
<i>Desulfobacter postgatei</i> ⁹	0,13 h ⁻¹	5,3 h	Etanol e sulfato
<i>Desulfobulbus propionicus</i> ⁹	0,08 h ⁻¹	8,6 h	Etanol e sulfato
<i>Desulfovibrio bacuolatus</i> ⁹	0,10 h ⁻¹	6,9 h	Etanol e sulfato
<i>Desulfotomaculum thermoacetoxidans</i> ¹⁰	0,06 h ⁻¹	11 h	Lactato e sulfato

¹OUDE ELFERINK *et al.* (1995) ²OUDE ELFERINK *et al.* (1998) ³BADZIONG e THAUER (1978) ⁴DALSGAARD e BAK (1994) ⁵OKABE *et al.* (1992) ⁶OKABE e CHARACKLIS³³ *apud* OKABE *et al.* (1992) ⁷REIS *et al.* (1992) ⁸SMITH e MAH²⁶ *apud* OUDE ELFERINK *et al.* (1998) ⁹LAANBROEK *et al.*, (1984) ¹⁰MIN e ZINDER (1990).

O sulfeto de hidrogênio pode inibir a atividade das BRS (POSTGATE, 1979) e a inibição pode ser o resultado da toxicidade direta, ou devida ao efeito indireto de formação de sulfeto de ferro insolúvel. O ferro é um constituinte de ferredoxinas, citocromos (POSTGATE, 1979) e outros compostos essenciais, a ocorrência de precipitação interrompe o sistema de transporte de elétrons (BROCK *et al.*, 1994). CZECHOWSKI *et al.* (1990), em seu experimento, concluiu que ao diminuir a concentração de ferro de 2,0 a 0,5 mg/L houve um correspondente decréscimo no nível de atividade da hidrogenase em *Desulfovibrio vulgaris*.

Segundo LAANBROEK *et al.* (1984), a produção de sulfeto durante o crescimento de BRS em meio de cultura, pode facilmente limitar a concentração de ferro, no

²⁶ SMITH, P.H.; MAH, R.A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.* v. 14, p. 368-371.

entanto em ambientes naturais, esta limitação pode ser evitada pelo metabolismo das bactérias utilizadoras de sulfeto.

O sulfeto produzido pela atividade microbiana é distribuído entre H_2S , HS^- e S^{2-} na solução e H_2S no biogás. Em pH 7,5, por exemplo, 20% do sulfeto total presente na solução existe como H_2S livre. Assim, a toxicidade do sulfeto é muito dependente do pH, pois o sulfeto não ionizado é capaz de atravessar a membrana celular (BROCK *et al.*, 1994).

2c [A inibição da redução de sulfato por sulfeto foi detectada em um experimento realizado por REIS *et al.* (1992), que cultivaram uma cultura de *Desulfovibrio* sp isolada de um digestor anaeróbio. Foi constatado que a taxa de utilização do sulfato aumentava sempre que o sulfeto era expulso do meio pelo fluxo de nitrogênio, indicando a inibição direta porém reversível do processo. Os autores determinaram ainda que a completa inibição ocorreu em 547 mg/L de sulfeto de hidrogênio (16,1 mM).]

HAUSER e HOLDER²⁷ *apud* REIS *et al.* (1992) reportaram que concentrações de sulfeto na fase líquida de 320 mg/L, em pH 7,2 (correspondendo a 96 mg/L de sulfeto de hidrogênio solúvel), não afetaram a utilização do sulfato pelas culturas de BRS. No entanto, OKABE *et al.* (1992), utilizando diferentes concentrações de sulfeto determinaram que concentrações da ordem de 150 mg/L de sulfeto total diminuiram lentamente a utilização de lactato e a produção celular, e 280 mg/L inibiram drasticamente a produção celular. Finalmente, a utilização de lactato e produção celular foram fortemente inibidas em 600 mg/L de sulfeto total. Os autores observaram que com o aumento da concentração de sulfeto, o tamanho das células diminuiu enquanto que a produção de polímeros extra celulares (EPS) aumentou.

3.5 – BIOQUÍMICA DA REDUÇÃO DESASSIMILATIVA DO ÍON SULFATO

As reações envolvidas na redução do sulfato estão descritas na Tabela 3.9. Antes de ser reduzido, o sulfato é ativado por uma ATP sulfúrilase que catalisa a ligação do íon ao fosfato de uma molécula de ATP (reação 1), formando a adenosina fosfosulfato (APS) (WIDDEL, 1988; WIDDEL e HANSEN, 1992; BROCK *et al.*, 1994; HANSEN,

²⁷ HAUSER, J.Y.; HOLDER, G.A. (1986). Iron availability in mixed cultures of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* v. 28, p. 101-106

1994). Sulfato é o único acceptor final de elétrons que deve ser ativado (HAMILTON, 1985), e essa ativação é bioquimicamente necessária devido ao potencial desfavorável do par sulfato/bissulfito (-450 mV) (HANSEN, 1994). A energia investida neste processo é recuperada por uma força próton motiva ou pela fosforilação a nível do substrato (VOORDOUW, 1995). Uma consequência direta dos baixos valores de potencial redox é a limitada produção de energia proveniente da oxidação dos substratos, que esta intimamente relacionado à restrita nutrição destes organismos (HAMILTON, 1985).

Apesar da reação 1 ser termodinamicamente desfavorável, a hidrólise do pirofosfato (reação 2) catalisada pela pirofosfatase, favorece a reação 1 no sentido da formação do APS (STANIER *et al.*, 1987; WIDDEL e HANSEN, 1992).

A rota de formação do APS é comum, tanto na redução assimilativa quanto na redução desassimilativa do íon sulfato, mas o destino do APS é diferente. Na redução desassimilativa o íon sulfato do APS é reduzido a bissulfito e AMP por uma APS redutase (reação 3) (BROCK *et al.*, 1994; WIDDEL e HANSEN, 1992).

O bissulfito formado é então reduzido a sulfeto, mas o doador natural de elétrons para a sulfito redutase não é conhecido (WIDDEL e HANSEN, 1992). Tem sido sugerido que a redução do bissulfito ocorre via caminho do tritionato (Figura 3.8a), o qual envolve a redução do sulfito em estágios intermediários, com formação de tritionato, tiosulfato e sulfeto, através das respectivas enzimas bisulfito redutase, tritionato redutase e tiosulfato redutase (WIDDEL, 1988; WIDDEL e HANSEN, 1992). Este caminho contrasta com a proposta da redução direta pela bissulfito redutase, utilizando seis elétrons, sem a formação dos intermediários livres (Figura 3.8b) (WIDDEL e HANSEN, 1992).

TABELA 3.9 Reações envolvidas na redução desassimilativa do íon sulfato em *Desulfovibrio sp*

Reação 1 - $\text{SO}_4^{2-} + \text{ATP} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{APS} + \text{PP}_i$	$\Delta G^{0'} = +46 \text{ kJ/mol}$
Reação 2 - $\text{PP}_i + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{P}_i$	$\Delta G^{0'} = -21,9 \text{ kJ/mol}$
Reação 3 - $\text{APS} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{AMP}$	$\Delta G^{0'} = -68,6 \text{ kJ/mol}$
Reação 4 - $3\text{HSO}_3^- + 2\text{e}^- \rightarrow \text{S}_3\text{O}_6^{2-}$	$\Delta G^{0'} = -171,7 \text{ kJ/mol}$
Reação 5 - $\text{S}_3\text{O}_6^{2-} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{HSO}_3^-$	
Reação 6 - $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{HSO}_3^-$	

Fonte: BADZIONG e THAUER (1978)

A via direta da redução do sulfato, como demonstrado na Figura 3.8b, nos permite inferir que é possível a ocorrência desse processo em ambientes cujo valor de potencial de oxi-redução esteja entre +100 e -100 mV, já que as enzimas operam nessa faixa.

Alguns argumentos reforçam a teoria do caminho do tritionato, como por exemplo a presença da tiosulfato redutase purificada em *Desulfovibrio* sp e *Desulfotomaculum* sp (BADZIONG e THAUER²⁸ apud WIDDEL e HANSEN, 1992). No entanto, existem alguns argumentos contra esta teoria (WIDDEL, 1988; WIDDEL e HANSEN, 1992).

Um esquema geral do processo metabólico para a redução do sulfato é apresentado na Figura 3.9, onde é possível visualizar a obtenção de energia pela oxidação do substrato e concomitante redução do sulfato.

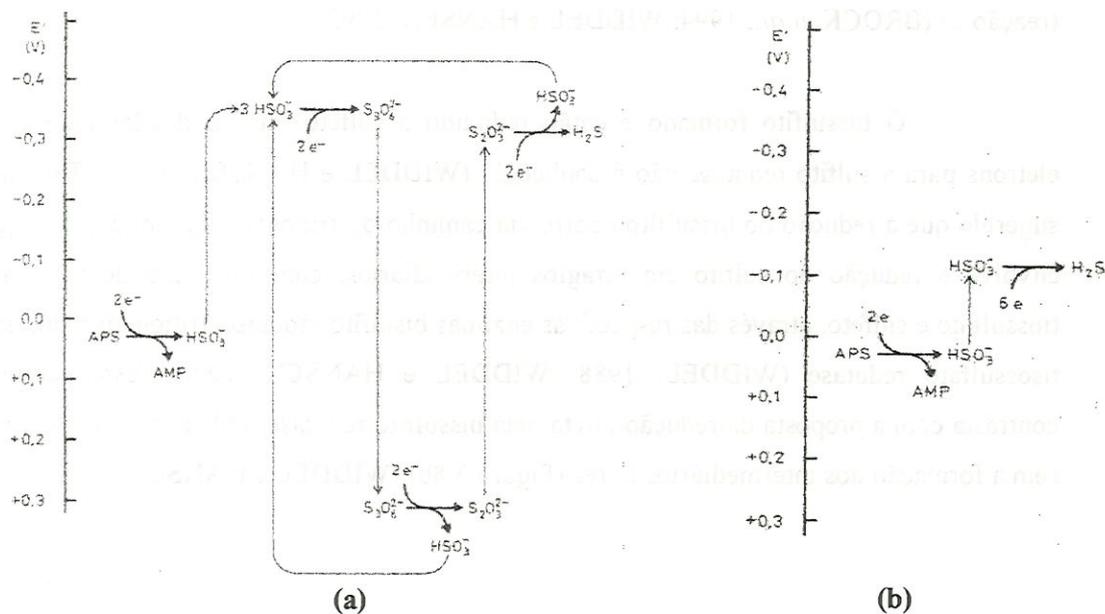


FIGURA 3.8 Caminhos propostos da redução da adenosina fosfosulfato (APS) e do bissulfito (HSO_3^-) em escala de oxi-redução; (a) caminho da redução seqüencial do bissulfito via tritionato ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$) e tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$); (b) caminho da redução direta do bissulfito a sulfeto (H_2S).

²⁸ BADZIONG, W.; THAUER, R.K. (1980). Vectorial electron transport in *Desulfovibrio vulgaris* (marburg) growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. *Arch. Microbiol.* v. 125, p. 167-174.

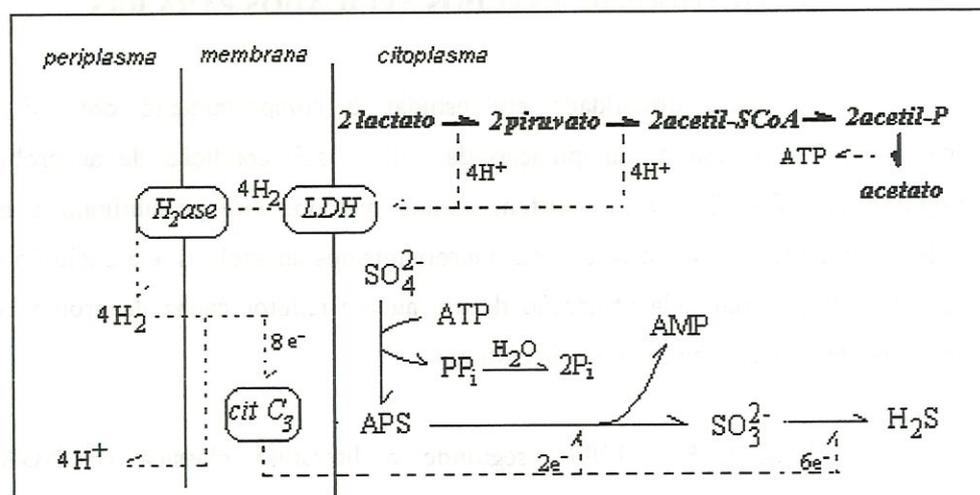


FIGURA 3.9 Esquema geral do processo metabólico envolvido na redução do sulfato em presença de lactato como fonte de energia em *Desulfovibrio* sp

Fonte: Modificado de BROCK *et al.* (1994)

O H_2 disponível no ambiente ou gerado por certas reações orgânicas (através da ação da lactato desidrogenase - LDH, por exemplo), transfere elétrons para a enzima hidrogenase (H_2ase) associada ao citocromo c_3 (cit C_3). Quando átomos de hidrogênio são oxidados, os prótons (H^+) ficam fora da membrana e os elétrons são transferidos para o interior da célula. Neste momento, uma força próton motiva é acionada para ser usada na síntese de ATP. No citoplasma, os elétrons são usados para a redução do APS (BROCK *et al.*, 1994).

A oxidação de compostos orgânicos como o lactato em ambientes naturais gera átomos de hidrogênio o qual atravessa a membrana celular e a condição externa é que determina os passos seguintes: se há disponibilidade de sulfato, o hidrogênio é oxidado e seus elétrons são transferidos para o interior da células, reduzindo o sulfato a sulfeto; se o sulfato não está disponível porém há presença de Archaea metanogênicas no ambiente, então o hidrogênio é utilizado na produção de metano, fenômeno este chamado transferência de hidrogênio interespecies, permitindo o crescimento de BRS por fosforilação a nível de substrato apenas (STANIER *et al.*, 1987).

3.6 MÉTODOS DE ESTUDOS APLICADOS PARA BRS

A maior dificuldade em estudar o comportamento dos microrganismos anaeróbios é atribuída à manipulação da cultura sob condição de anaerobiose estrita. Segundo HUNGATE (1969), existem alguns métodos que possibilitam a depleção de agentes oxidantes durante o cultivo de microrganismos anaeróbios, e a exclusão do oxigênio do meio pode se dar pela utilização de um agente redutor capaz de promover um baixo potencial de oxi-redução no meio de cultura.

VAZOLLER (1995), seguindo a literatura clássica (HUNGATE, 1969; MILLER e WOLIN, 1974), introduziu os procedimentos para manipulação de culturas estritamente anaeróbias na Área de Microbiologia do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP. Seus resultados, bem como estudos posteriores (MONTENEGRO, 1994; GOMES, 1995; VARESCHE, 1997;), suportaram que as técnicas introduzidas foram eficazes para o isolamento e cultivo de microrganismos anaeróbios estritos.

No cultivo de culturas puras de BRS, o potencial de oxi-redução deve estar em torno de -100 mV, valor alcançado não apenas pela retirada do oxigênio do meio mas também pela adição de agentes redutores (WIDDEL e PFENNIG, 1984; POSTGATE, 1979), como por exemplo sulfeto de sódio, cisteína, tioglicolato de sódio (POSTGATE, 1979) ascorbato de sódio e ditionito de sódio (WIDDEL e BAK, 1992). Como indicador de condições redutoras do meio, emprega-se a resazurina, um corante que é adicionado ao meio de cultivo na concentração final de 1 mg/L (WIDDEL e BAK, 1992).

Diferentes meios de cultura tem sido usados para o cultivo de BRS (WIDDEL e BAK, 1992; WIDDEL e PFENNIG, 1984; POSTGATE, 1979; PANKHURST, 1971) porém nenhum deles é apropriado para o desenvolvimento de todas as espécies de BRS, sendo a escolha dependente do objetivo do cultivo. Por exemplo, alguns deles são ideais para uma resposta qualitativa, outros, por conter um redutante, são eficazes no isolamento e quantificação de BRS (POSTGATE, 1979).

Um rápido crescimento de BRS é alcançado em meios contendo, por exemplo, acetato, etanol, lactato e hidrogênio, e um inoculado com uma quantidade de cultura menor ou igual a 1% (v/v) (WIDDEL e BAK, 1992). O meio contendo lactato tem sido usado com

sucesso para o cultivo dos clássicos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (WIDDEL e BAK, 1992).

Os íons amônio são, convencionalmente, a fonte de nitrogênio principal das BRS, mas muitas culturas podem fixar nitrogênio gasoso (POSTGATE, 1979; WIDDEL, 1988).

Segundo POSTGATE (1979) e WIDDEL e PFENNIG (1984), 0,05% de sais de ferro devem ser incorporados ao meio a fim de diagnosticar o crescimento de BRS devido à reação destes com o sulfeto produzido, formando FeS o qual torna o meio escurecido. De acordo com REIS *et al.* (1992), o EDTA é adicionado ao meio como um agente complexante do ferro, evitando a limitação do crescimento pela depleção do ferro precipitado, o que afetaria inclusive a produção da enzima hidrogenase, dependente do ferro para a sua constituição.

Culturas marinhas requerem NaCl e Mg^{2+} para o crescimento (WIDDEL e BAK, 1992). LAANBROEK e PFENNIG (1981) comentaram que a concentração de NaCl e $MgCl_2$ em meios para cultivo de BRS de água doce é de 1,2 e 0,4 g/L, enquanto que em meios de cultivo de espécies marinhas aumentam para 3 e 20 g/L. Segundo POSTGATE (1979), amostras de origem marinha ou estuarina requerem aproximadamente 2,5% de NaCl ao meio de cultura, e o crescimento de culturas de água doce pode ser inibido em meios salinos (POSTGATE, 1979). LEU *et al.* (1996) utilizou no cultivo de BRS em meio equivalente a água doce, 0,1% de salinidade, o que correspondeu a 1g/L de NaCl, 0,4 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e 0,1 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

De modo geral, a necessidade de sal em BRS de ambientes marinhos pode ser satisfeita com 20g/L de NaCl e 1,5 g/L de $MgCl_2$; culturas oriundas de água salobra requerem concentração menor, e bactérias de água doce podem até mesmo serem inibidas por concentrações de sal equivalentes ao ambiente marinho (WIDDEL, 1988). O crescimento em concentrações de NaCl maiores que em água do mar (aproximadamente 27 g/L) tem sido possível para as espécies *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. salexigens* e outras BRS isoladas de campos de petróleo contendo aproximadamente 100 g/L de NaCl (CORD-RUWISCH²⁹ *et al. apud* WIDDEL, 1988).

²⁹ CORD-RUWISCH, R.; KEINITZ, W.; WIDDEL, F. (1987). Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. petrol. Technol.* v. Jan., p. 97-106.

A adição de um complexo nutricional como extrato de levedura ou peptona não é recomendado para enriquecimentos pois estes nutrientes causam rápido desenvolvimento de diversas bactérias fermentativas (WIDDEL e BAK, 1992).

As culturas obtidas em ensaios de enriquecimento devem ser transferidas duas a cinco vezes para meios recentes, antes de submeter a amostra ao isolamento de culturas, porém, o tempo de incubação é dependente do metabolismo celular específico (WIDDEL e BAK, 1992).

A maioria dos tipos de BRS foi isolada de enriquecimentos em sistemas descontínuos (batelada), que favorece a seleção de um tipo de sulfato redutoras em função do doador de elétrons, origem do inóculo, temperatura de incubação e concentração de sais (WIDDEL, 1988).

MIN e ZINDER (1990), nos experimentos para a obtenção da espécie redutora de sulfato *Desulfovibrio thermoacetoxidans*, empregaram técnicas muito semelhantes aquelas utilizadas para o isolamento de culturas metanogênicas e não metanogênicas, em que destaca-se o uso de diluições decimais seriadas em frascos de Hungate (Bellco®) seguidas pelo método do “Roll-Tube” para o isolamento das colônias.

VAZOLLER (1993) obteve uma cultura pura de BRS em meio sólido, cultivados em frascos Wolfe®, os quais possuem, em um dos lados, uma reentrância com a função de estocar a água formada por condensação durante a incubação.

Utilizando o método do “Roll-Tube”, descrito por HUNGATE (1969), VARESCHE (1997) isolou colônias de bactérias fotótrofas anoxigênicas e OUDE ELFERINK *et al.* (1995; 1998) e BADZIONG *et al.* (1978) bactérias redutoras de sulfato. As colônias obtidas em 3-4 dias a 35°C por BADZIONG *et al.* (1978), foram identificadas como de BRS pela coloração escura que apresentava, sendo retiradas e transferidas para um meio de cultura sob condições anaeróbias.

WIDDEL e BAK (1992) comentaram que culturas de BRS podem ser facilmente isoladas através de diluições seriadas decimais, método análogo à técnica para

determinação do número mais provável (NMP). AECKERSBERG *et al.*³⁰. *apud* WIDDEL e BAK (1992) isolaram, por este método, BRS utilizadoras de alcanos.

WIDDEL e BAK (1992) recomendam que culturas de BRS sejam transferidas de 6 a 12 semanas como subcultivos de manutenção.

FINSTER *et al.* (1998), para a realização do teste para verificação da utilização de substratos e aceptores finais de elétrons, inoculou frascos com 1% da cultura a ser testada. As diferentes fontes de energia testadas separadamente foram, acetato, propionato, butirato, piruvato, lactato, fumarato e formiato (5 mM cada), e 90% de hidrogênio. Os aceptores finais de elétrons estudados foram tiosulfato, sulfato (10mM cada), enxofre elementar (5mM) ou nitrato (5mM) e 0,02 atm de oxigênio.

Entre os diversos métodos de medida de concentração de microrganismos, o turbidimétrico talvez seja um dos mais freqüentemente utilizados no caso de leveduras e bactérias, principalmente pela simplicidade e relativa rapidez com que se obtém os resultados (BORZANI, 1972). REIS *et al.* (1992), durante seus estudos com BRS, afirmou que a quantificação de celular durante o crescimento de BRS pelo método de determinação de massa seca, não fornece resultados seguros devido a interferência das altas concentrações de sulfeto de ferro.

VARESCHE (1997), durante ensaios com bactérias fotótrofas anoxigênicas, utilizou o método de LOWRY modificado por PETERSON (1977) para dosagem de proteína celular e obtenção da curva de crescimento, na qual foi possível determinar a taxa máxima de crescimento específico e o tempo de geração (Tg) para a cultura estudada. Este mesmo método foi utilizado por GOMES (1995) para quantificação de bactérias celulolíticas em reatores simulando aterro sanitário.

Com posse dos valores de concentração de microrganismos é possível construir um gráfico de crescimento da cultura, e com suas variações determinar a velocidade específica máxima de crescimento da cultura segundo os conceitos de BORZANI (1986) aplicados por VAZOLLER (1993), VARESCHE (1997) e GOMES (1955).

³⁰ AECKERSBERG, F.; BAK, F.; WIDDEL, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.*

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - ORIGEM DAS AMOSTRAS E RELAÇÃO DAS ATIVIDADES EXPERIMENTAIS

As quatro amostras de BRS estudadas foram fornecidas pelo Cenpes/Petrobrás, previamente cultivadas em meio de cultura, provenientes de diferentes locais. A Tabela 4.1 mostra a relação das origens das amostras

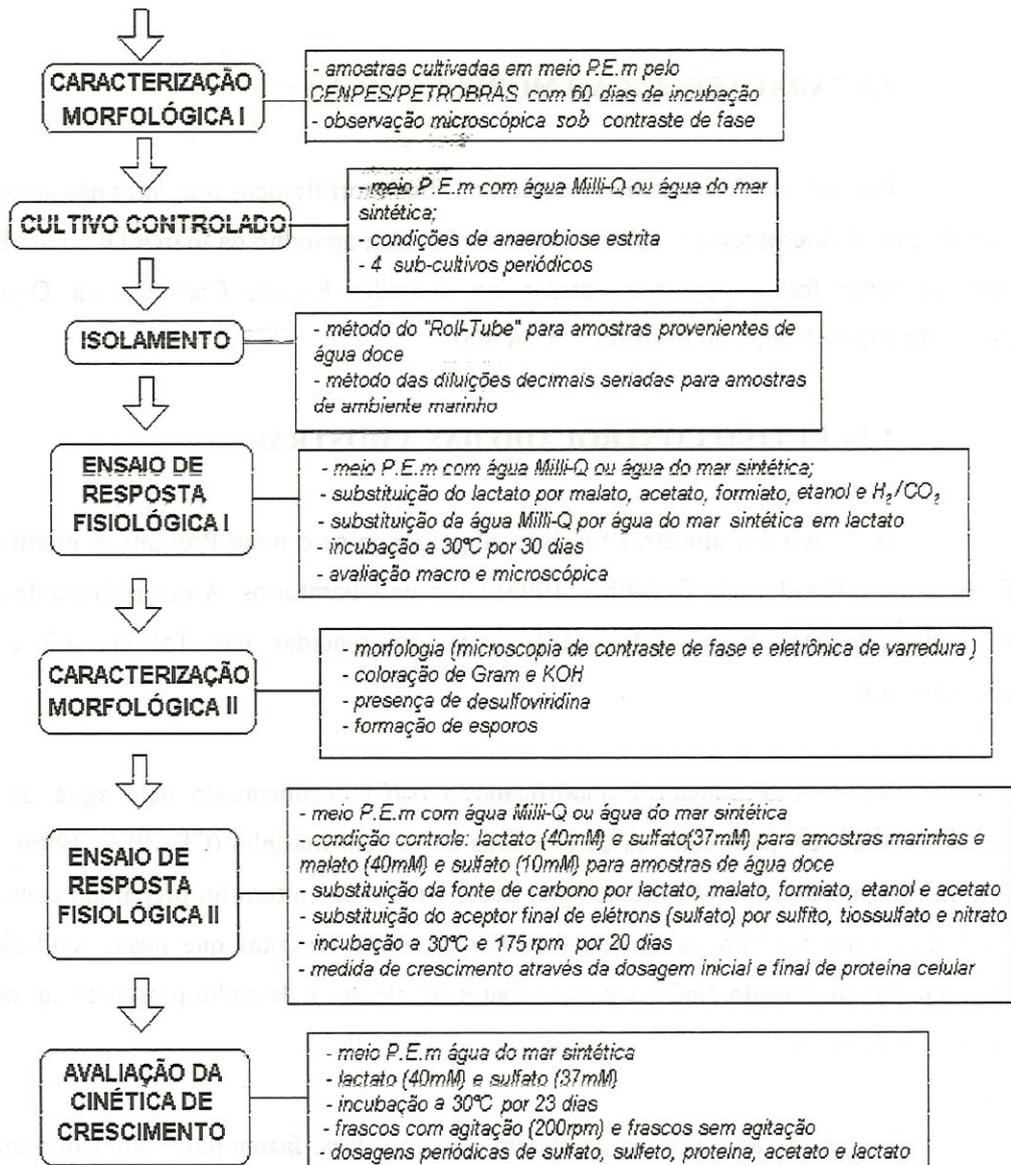
No período entre a data da coleta e o envio pelo Cenpes/Petrobrás para o Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento, as amostras FW2, SW1 e SW2 foram submetidas a subcultivos para manutenção em meio de cultura Postgate E modificado (P.E.m), com salinidade equivalente ao local de origem, incubadas a 30°C. Segundo informações do CENPES (1996) a amostra FW1 foi mantida no meio P.E.m, a 30°C, sem sofrer subcultivos periódicos.

As atividades experimentais realizadas com as amostras estão descritas cronologicamente na Figura 4.1a. As amostras foram submetidas a exame microscópico para a caracterização dos tipos morfológico das amostras, e o posterior cultivo das mesmas foi feito em meio P.E m, sob anaerobiose estrita. Seguiram-se os procedimentos para o isolamento das culturas, as quais posteriormente foram caracterizadas através de estudos morfo-fisiológicos. As etapas subseqüentes não foram aplicadas a todas as amostras, como pode ser visto na Figura 4.1b. Somente as amostras FW2 e SW1 foram submetidas a uma análise de resposta fisiológica com medida de crescimento bacteriano (análise de resposta fisiológica II). O ensaio cinético de crescimento microbiano foi realizado apenas com a amostra SW1.

TABELA 4.1 – Origens das amostras, segundo Laboratório do Cenpes/Petrobrás

Amostras	Origens
FW1 (água doce)	<p>Composta a partir de cinco amostras, cultivadas em meio Postgate E para enriquecimento de BRS mesófilas e de baixa salinidade. Apresentam a seguinte origem:</p> <ul style="list-style-type: none"> -resíduo de Corrosão do TQ 6302 do Sistema de Refrigeração da REPLAN data de coleta: Março/95 -amostra do Rio de Mogiguaçu – Porto Ferreira – SP; data de coleta: Agosto/95 -amostra do Rio de Sapucaí – São Joaquim da Barra – SP; data de coleta: Dezembro/95 -amostra de água oleosa (produzida) coletada no Lançador de PIGs do Oleoduto do Sistema de Produção da RPNS – trecho Canto do Amaro – Estreito A (CAM/ET-A); data de coleta: Novembro/95 -amostra de água oleosa (produzida) coletada no Recebedor de PIGs do Oleoduto do Sistema de Produção da RPNS – trecho Canto do Amaro – Estreito A (CAM/ET-A); data de coleta: Novembro/95
FW2 (água doce)	<p>Originada do Resíduo de Corrosão do Gasoduto que sai da Estação de São Mateus (SM) e chega a Fazenda Cedro (FC), do Sistema de Produção do E&P – GEPRO (ES)</p>
SW1 (marinha)	<p>Composta a partir de duas amostras obtidas de água do mar tratada para injeção (ponto de coleta localizado após a desaeradora e antes das bombas “Booster” do Header de injeção – ponto 5 do fluxograma apresentado na Figura C.2 do Apêndice) – “Água de Injeção da Plataforma de Produção Secundária de Namorado 1 (PNA-1)”; data de amostragem Abril/92</p>
SW2 (marinha)	<p>Obtida a partir de uma amostra de água do “Sistema de Tratamento de Água produzida do DIES”; data de amostragem Setembro/94</p>

Fonte: CENPES (1996)



(a)

	<i>Caracterização Morfológica I</i>	<i>Cultivo Controlado</i>	<i>Isolamento das culturas</i>	<i>Análise de Resposta Fisiológica I</i>	<i>Caracterização Morfológica II</i>	<i>Análise de Resposta Fisiológica II</i>	<i>Avaliação da cinética de crescimento</i>
FW1							
SW2							
FW2							
SW1							

(b)

FIGURA 4.1 Relação das atividades realizadas; (a) relação das atividades experimentais e os procedimentos aplicados; (b) atividades experimentais realizadas para cada amostra

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA I

Foi realizado uma caracterização dos tipos morfológicos presentes nas amostras, através de exame microscópico, sob contraste de fase, em aparelho da marca Olympus BHT. Foram realizadas fotomicrografias obtidas em aparelho Expose Control Unit Olympus empregando filmes Kodak ou Fujifilm – ASA 400.

4.3 CULTIVO CONTROLADO DAS AMOSTRAS

O cultivo das amostras foi feito empregando-se o meio Postgate E modificado (P.E.m), como utilizado pelo CENPES (1996) em seus laboratórios. A composição do meio basal e as soluções estoque adicionadas estão apresentadas nas Tabelas 4.2 e 4.4, respectivamente.

No meio Postgate E modificado o NaCl é substituído pela água do mar sintética (Tabela 4.3), para cultivos de amostras de origem marinha (CENPES, 1996). Para as culturas originadas em ambiente de água doce, o meio de cultura foi preparado com água Milli-Q, conforme descrito na Tabela 4.2. É importante ressaltar que nesta condição de cultivo, não foi adicionado NaCl, sendo as fontes de cloreto e de sódio presentes em outros componentes do meio.

Em adição aos sais que compõem o meio P.E.m, fazem parte também o lactato de sódio (40mM) como fonte de carbono e o sulfato de sódio e sulfato ferroso como fonte de sulfato, cuja concentração no meio com água destilada é 10mM enquanto que em meio com água do mar é 37mM. Além destes, tioglicolato de sódio na concentração de 1,7mM é responsável pela redução do potencial de oxi-redução do meio de cultura a valores menores que -100 mV. Este valor foi monitorado pela resazurina, um corante indicador de potencial redox. O extrato de levedura foi utilizado apenas durante os primeiros cultivo controlados, sendo excluído do meio P.E.m nos cultivos posteriores, a fim de controlar o desenvolvimento de células não redutoras do íon sulfato.

O meio de cultura foi preparado utilizando água Milli-Q previamente fervida e resfriada a 40°C, ou água do mar sintética, em que os sais foram solubilizados. Após a dissolução dos sais foi necessário ajustar o pH para 8,40 adicionando-se NaOH. O meio P.E.m foi mantido por 20 minutos sob fluxo de N₂, e então distribuído nos frascos de reação.

O gás foi introduzido nos frascos através de um sistema de distribuição simultânea de gases, descrito por VAZOLLER (1995). Os gases, antes de chegarem ao sistema de distribuição, passam por uma coluna catalítica capaz de reter traços de oxigênio, em geral presentes nas linhas de condução dos gases e nos cilindros estoque dos gases comerciais (VAZOLLER, 1995).

Após a distribuição nos frascos de reação, o meio foi submetido a esterilização em autoclave, a 120°C por 20 minutos. Um detalhe importante se refere a sensibilidade da água do mar sintética a altas temperaturas, sendo assim a esterilização do meio P.E.m preparado com água do mar foi realizada por filtração em membrana (membrana Millipore 0,45 µm). Este método de filtração requer que todo o equipamento Millipore seja previamente esterilizado. Após a dissolução dos sais e do ajuste do pH, fluxionou-se nitrogênio no meio por 20 minutos sob condições assépticas (próximo ao bico de Bunsen). Após este período, a filtração e a distribuição foi feita em frascos estéreis, ainda sob fluxo de N₂ (100%).

Para manter as condições anaeróbias nos meios de cultura e nas soluções estoques, os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila e lacres de alumínio ou roscas. Para a adição das soluções estoque, bem como do inóculo no meio basal, foram utilizadas seringas de 1 mL estéreis, “lavadas” assepticamente (próximo ao bico de Bunsen) com N₂ (100%), mantendo-se a atmosfera isenta de oxigênio.

Os cultivos foram realizados em frascos de antibióticos de 30 mL com 10 mL de volume de reação e inóculo de 5%. Após a adição das soluções estoques não houve troca de atmosfera para a inoculação, a mesma foi mantida sob N₂ (100%). Após a inoculação as amostras foram mantidas a 30°, subcultivadas periodicamente conforme os resultados do acompanhamento microscópico.

TABELA 4.2 - Composição do meio basal Postgate E modificado (P.E.m)

Componentes	Quantidades
Água ¹	1000 mL
KH ₂ PO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,83 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,47 g
Extrato de Levedura ²	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Solução de resazurina 0,1%	1,0 mL

¹ - água Milli-Q para culturas de água doce; água do mar sintética para amostras marinhas

² - utilizado apenas durante o cultivo controlado

Fonte: CENPES (1996); POSTGATE (1979)

TABELA 4.3 - Composição da água do mar sintética

Componentes	Quantidades
Água Milli-Q	1000 mL
NaF	0,003 g
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,020 g
H ₃ BO ₃	0,030 g
KBr	0,10 g
KCl	0,70 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,470 g
Na ₂ SO ₄	4,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,78 g
NaCl	23,50 g
NaSiO ₃ .9H ₂ O	0,02 g
Na ₂ .EDTA	0,001 g
NaHCO ₃	0,2 g

Observação: para evitar a formação de precipitados, os sais não devem ser dissolvidos juntos.

Fonte: CENPES (1996); STANDARD METHODS (1992)

TABELA 4.4 – Soluções estoque adicionadas e suas concentrações no meio P.E.m

Soluções estoque	Concentração no meio de cultura
Sulfato de sódio	7,0 mM
Sulfato ferroso	1,8 mM
Lactato de sódio	40 mM
Tioglicolato de sódio	1,7 mM

4.4 ISOLAMENTO DAS CULTURAS DE BRS

Foram empregados dois métodos para o isolamento das culturas de BRS, a técnica do “Roll-Tube” e a técnica das diluições decimais seriadas. O critério para uso de uma ou outra forma de isolamento foi baseado no meio de cultura, uma vez que a água do mar sintética, como já dito anteriormente, apresenta sensibilidade a altas temperaturas, inviabilizando a utilização do método do “Roll-Tube”. A Tabela 4.5 apresenta a técnica de isolamento utilizada para cada amostra.

TABELA 4.5 – Técnicas utilizadas para o isolamento das amostras

Amostras	Técnica de isolamento
FW1	“Roll-Tube”
FW2	“Roll-Tube”
SW1	Diluições decimais seriadas
SW2	Diluições decimais seriadas

As condições do meio de cultivo utilizadas na fase de isolamento das colônias foram mantidas as mesmas do cultivo controlado, exceto para a técnica do “Roll-Tube”, em que foi acrescido ao meio de cultura ágar 2% (p/v).

O método das diluições decimais seriadas consistiu na transferência de 0,1 mL de amostra no meio de cultura P.E.m, o que correspondeu a uma diluição inicial de 10^{-2} , e desse para o sucessivo frasco. O quantidade de diluições foi determinada especificamente para cada amostra, segundo a presença de contaminantes na mesma. A amostra diluída foi incubada a 30°C, até que apresentasse crescimento.

O método do “Roll-Tube”, desenvolvido por HUNGATE (1969), possibilita o crescimento de colônias anaeróbias em uma fina camada de ágar aderido à superfície interna de tubos de ensaios, hermeticamente fechados e sob atmosfera isenta de oxigênio. Os procedimentos para a realização deste método estão descritos a seguir:

- distribuiu-se em tubos Balch®, 3 mL de meio de cultura P.E.m com ágar 2% (p/v) sob condições de anaerobiose; os tubos foram lacrados e autoclavados a 120°C por 20 minutos;

- mantendo as mesmas condições nutricionais do cultivo controlado (exceto pela exclusão do extrato de levedura), foram adicionados os volumes das soluções estoque ao meio de cultura estéril, na temperatura de aproximadamente 52°C, sob condições assépticas;
- adicionou-se o inóculo; homogeneizou-se o meio ainda liquefeito e cada tubo foi colocado horizontalmente em um recipiente com banho de gelo e rolado a fim de solidificar o meio nas paredes internas do tubo;
- incubaram-se os tubos invertidos, a 30°C, até o aparecimento das colônias.

Após o período de incubação em que as colônias se desenvolveram, o procedimento de coleta e inoculação de cada colônia, esquematizado na Figura 4.2, foi:

- abriu-se o tubo Balch® próximo ao bico de Bunsen, prendendo-o a uma garra de forma a ficar em uma posição horizontal;
- utilizou-se uma agulha de 40 x 12 mm encurvada formando um ângulo de 90°, acoplada ao sistema de distribuição de gás, para fluxionar nitrogênio no interior do tubo;
- com uma seringa estéril e uma agulha pequena (20 x 5,5 mm), retirou-se 0,1 mL do meio de cultura, previamente reduzido, do frasco onde a colônia foi inoculada;
- substituiu-se a agulha pequena por uma de calibre maior (40 x 12 mm) para que a mesma pudesse alcançar a colônia desejada no interior do tubo;
- liberou-se o volume de meio de cultivo sobre a colônia, “sugando-a” instantaneamente de forma a ser retirada juntamente com o meio adicionado;
- já com a colônia no interior da seringa, trocou-se a agulha grande por outra de calibre menor, inoculando a colônia no mesmo frasco de reação do qual foi retirado o volume de coleta;

Após o isolamento, as culturas foram subcultivadas em meio *P.E.m*, a 30°C, e repicadas periodicamente a cada 30 dias, mantendo as mesmas condições do cultivo controlado.

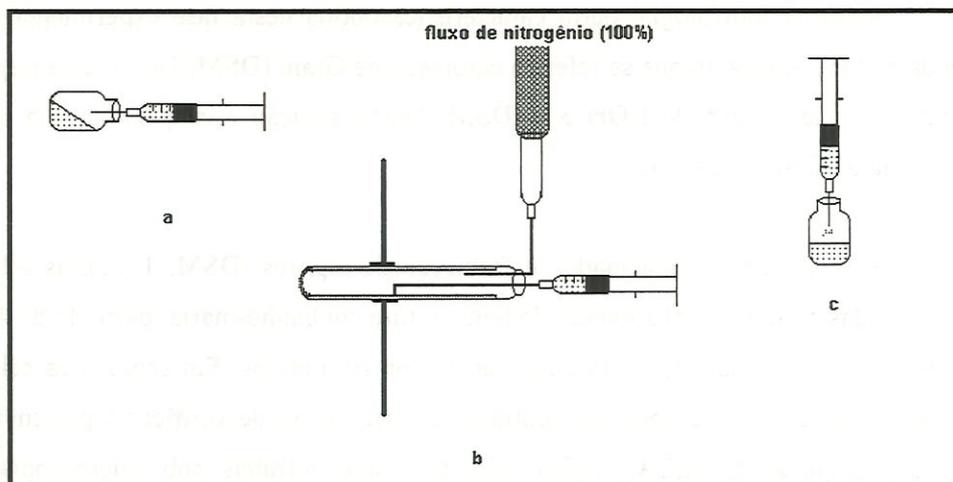


FIGURA 4.2 Esquema da coleta da colônia em “Roll-Tube; (a) retirada de um volume do meio de cultura previamente reduzido; (b) coleta da colônia sob fluxo de nitrogênio (100%); (c) introdução do volume, com a colônia coletada, no interior do frasco de cultivo

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA II - CULTURAS ISOLADAS

A morfologia das células foi acompanhada pelo exame microscópico sob contraste de fase, durante todas as atividades experimentais (descrito no item 4.2). As dimensões celulares médias foram obtidas através das medidas do comprimento e da espessura de 10 células de cada cultura.

Para a observação sob microscópio eletrônico de varredura, foi utilizado o método de secagem do HMDS (Hexametildisilazano), descrito originalmente por NATION³¹ *apud* ARAÚJO (1995) para tecidos de insetos e adaptados por ARAÚJO (1995) para o tratamento de biofilmes bacterianos. Este tratamento consiste na fixação com Glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por um período de 12 horas a 4°C; desidratação em uma série gradativa de álcoois: 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, permanecendo 10 minutos em cada concentração; e secagem da massa bacteriana por 30 segundos com HMDS (ARAÚJO, 1995).

³¹ NATION, J.L. (1983). A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain. Techn.* v. 58, n. 06, p. 347-351.

Além da morfologia, outra característica obtida nesta fase experimental foi a resposta da cultura isolada no que se refere à coloração de Gram (DSM, 1991). Esta resposta foi confirmada pela técnica do KOH 3% (DSM, 1991), solução esta que rompe a parede celular de células Gram-negativas.

Para detectar a capacidade de formação de esporos (DSM, 1991), as células foram submetidas a um gradual aumento de temperatura em banho-maria, partindo de 40°C até atingir 80°C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. Em seguida as células foram examinadas sob microscopia de contraste de fase, a fim de verificar a presença de esporos, que segundo VIDELA (1996), são altamente refráteis sob microscopia de contraste de fase.

Para verificar a presença de desulfoviridina, uma enzima sulfito redutase específica de alguns gêneros de BRS, foram adicionadas gotas de NaOH 2N sobre a amostra disposta em uma lâmina, observando-a microscopicamente sob luz de comprimento de onda de 365 nm. Se ocorresse a formação de zonas avermelhadas, características de culturas com desulfoviridina, o teste era considerado positivo. A cor esta associada ao cromóforo sirohidroclorina deste pigmento (POSTGATE, 1979).

4.6 – ENSAIO DE RESPOSTA FISIOLÓGICA DAS CULTURAS ISOLADAS

4.6.1 Análise Fisiológica I – Avaliação da resposta fisiológica das culturas isoladas cultivadas em diferentes fontes de carbono.

Este ensaio consistiu em fornecer às quatro culturas isoladas, diferentes fontes de carbono a fim de determinar os possíveis compostos utilizados por elas. Dois foram os motivos pelos quais este ensaio foi realizado: primeiro para determinar a que grupo pertencia os gêneros de BRS isolados (grupo oxidador completo ou incompleto), determinado pelo crescimento ou não em acetato como fonte de carbono e doador de elétrons; segundo para determinar a condição mais favorável ao crescimento dos gêneros isolados.

Além das fontes de carbono, foram realizados subcultivos das culturas FW1 e FW2 em meio P.E.m com água do mar sintética. Estas culturas eram originalmente de água

doce. O subcultivo em água do mar foi feito com a finalidade de observar o comportamento das células na presença de salinidade elevada.

Utilizando frascos de antibiótico de 30 mL, foram testados no meio P.E.m os seguintes compostos: malato de sódio, acetato de sódio, formiato de sódio e etanol, todos com concentração igual a 40 mM, como fonte de carbono e elétrons em substituição ao lactato de sódio. Atmosfera de H₂ e CO₂ foi também testada para avaliar o crescimento celular, e nessa condição foi efetuado troca da atmosfera de N₂ por esta mistura gasosa, sem a adição de outra fonte de carbono. O subcultivo das culturas FW1 e FW2 em meio com água do mar sintética empregou o lactato de sódio (40mM) como fonte de carbono e elétrons. As culturas sob estas condições foram realizadas em duplicata e incubadas a 30°C por 30 dias.

Análises macroscópicas foram realizadas baseando-se em alterações da cor do meio de cultivo (de transparente a escuro), e análises microscópicas confirmaram a presença do crescimento da massa celular de BRS.

4.6.2 – Análise Fisiológica II - Avaliação da resposta fisiológica das culturas FW2 e SW1 cultivadas em diferentes fontes de carbono e aceptores de elétrons.

Este ensaio teve a finalidade de quantificar o crescimento de culturas em diferentes fontes de carbono e aceptores de elétrons. Para este ensaio foram utilizadas duas culturas: uma cultura de origem marinha e outra de água doce, que apresentassem melhores respostas nos ensaios que antecederam este. As culturas estudadas foram a SW1 e a FW2, no entanto, a cultura FW2 foi cultivada de duas maneiras distintas, uma delas mantendo a condição de isolamento em meio P.E.m com água Milli-Q e a outra substituindo a água Milli-Q por água do mar sintética. A cultura SW1 foi mantida em sua condição de origem em meio P.E.m com água do mar sintética. Também foram quantificados o crescimentos em cultivo sem ferro e em cultivo sob temperatura de 55°C

As culturas, antes de serem testadas, foram cultivadas em meio P.E.m, em frascos de Duran de 500 mL, com volume útil de reação de 300 mL, inóculo de 7% (v/v), de duas formas: - mantendo-se exatamente as mesmas condições impostas no cultivo controlado; - substituindo o sulfato ferroso por cloreto ferroso a fim de adaptá-las a este novo

composto, que se fez necessário uma vez que as culturas seriam submetidas a uma condição fisiológica sem sulfato ferroso, porém com necessidade da adição de ferro.

A Figura 4.3 ilustra os procedimentos para a obtenção dos seis inóculos que foram utilizados nos testes fisiológicos das culturas. Assim, quatro inóculos da cultura FW2 e dois da cultura SW1 foram estudados.

Após o período de incubação de 20 dias, a 30°C, e sob agitação de 175 rpm, as culturas foram submetidas a centrifugação de 3000 rpm por 15 minutos em “ependorfs” de plástico de 12 mL estéreis. Foram então ressuspensas em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), na proporção 1:1. Este procedimento, para preparação de inóculo, foi realizado próximo ao bico de Bunsen, com todo o material necessário esterilizado. Este tratamento do inóculo foi realizado a fim de eliminar resíduos do cultivo anterior (VARESCHE, 1997), evitando interferências nos resultados.

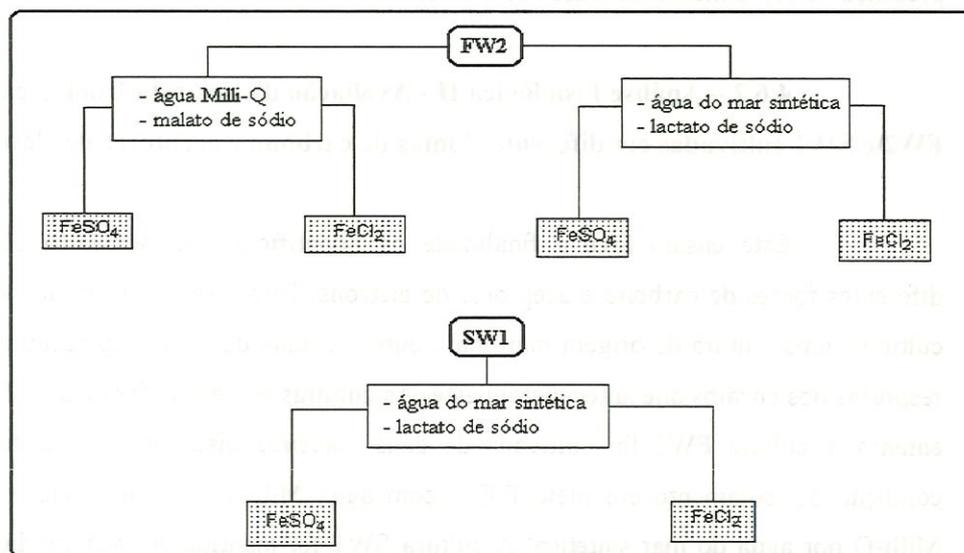


FIGURA 4.3 – Esquema da preparação dos inóculos utilizados no ensaio fisiológico II

O cultivo no ensaio fisiológico II ocorreu em frascos de antibióticos de 30 mL com 10 mL como volume de reação, em triplicata. Os volumes de meio e soluções foram os mesmos utilizados durante o cultivo controlado, diferindo nos compostos testados e na condição em que o sulfato férrico deveria ser suprimido e substituído por cloreto férrico, a fim de manter a mesma concentração de ferro no interior dos frascos de reação. Utilizou-se

um volume de inóculo de 5% (v/v). Os frascos foram incubados a 30°C, sob agitação de 175 rpm, por um período de incubação de 20 dias.

A Tabela 4.6 apresenta as condições fisiológicas estudadas com as culturas cultivadas em meio P.E.m com água do mar sintética (culturas SW1 e FW2). Nestas condições a concentração de 27mM de sulfato, presente na água do mar sintética, foi mantida mesmo quando outros compostos aceptores de elétrons como sulfito, tiosulfato e nitrato foram adicionados. Para a cultura FW2, cultivada em meio P.E.m com água Milli-Q, as condições fisiológicas estão apresentadas na Tabela 4.7. Neste ensaio o sulfato foi totalmente substituído pelos outros aceptores de elétrons.

TABELA 4.6 – Condições nutricionais estudadas para culturas cultivadas em meio P.E.m, preparado com água do mar sintética

Sulfato (37mM) sem fonte de carbono
Sulfato (37mM) + lactato de sódio (40mM)
Sulfato (37mM) + lactato de sódio (40mM) + 55°C
Sulfato (37mM) + malato de sódio (20mM)
Sulfato (37mM) + formiato de sódio (20mM)
Sulfato (37mM) + acetato de sódio (20mM)
Sulfato (37mM) + etanol (20mM)
Sulfato (27mM) + lactato de sódio (40mM)
Sulfato (27mM) + lactato de sódio (40mM) sem ferro
Sulfato (27mM) + lactato de sódio (40mM) + sulfito de sódio (10mM)
Sulfato (27mM) + lactato de sódio (40mM) + tiosulfato de sódio (10mM)
Sulfato (27mM) + lactato de sódio (40mM) + nitrato de sódio (10mM)

() concentração da solução no meio de cultura, expressa em molaridade

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado com amostragens no tempo inicial (equivalente a um frasco recém inoculado mantido sob refrigeração) e após 20 dias de incubação, utilizando um método indireto de quantificação bacteriana. Apesar do ensaio ter sido realizado em triplicata, foi aproveitado a média aritmética de dois dos melhores resultados de cada condição testada.

TABELA 4.7 – Condições nutricionais estudadas para culturas cultivadas em meio P.E.m, preparado com água Milli-Q

Sulfato (10mM) sem fonte de carbono
Sulfato (10mM) + malato de sódio (40mM)
Sulfato (10mM) + malato de sódio (40mM) + 55° C
Sulfato (10mM) + lactato de sódio (20mM)
Sulfato (10mM) + formiato de sódio (20mM)
Sulfato (10mM) + acetato de sódio (20mM)
Sulfato (10mM) + etanol (20mM)
Malato de sódio (40mM)
Malato de sódio (40mM) + sulfito de sódio (10mM)
Malato de sódio (40mM) + tiosulfato de sódio (10mM)
Malato de sódio (40mM) + nitrato de sódio (10mM)

() concentração da solução no meio de cultura, expressa em molaridade

4.6.2.1 Quantificação de proteína celular

O método utilizado para dosagem de proteína celular foi o desenvolvido por LOWRY e modificado por PETERSON (1977) e consiste na reação entre as proteínas solubilizadas com o indicador “Folin Ciocalteau”, utilizando como padrão a proteína soro albumina bovina (SAB).

Para a determinação da proteína celular promoveu-se o rompimento celular pelo método descrito por BHADURI e DEMCHICK (1983). As amostras foram tratadas com acetona e SDS. O método está descrito a seguir:

- distribuiu-se 10 mL da cultura em “ependorfs”, centrifugando-os a 3000 rpm por 20 minutos; desprezou-se o sobrenadante;
- o “pellet” foi ressuspenso em 10 mL de solução tampão fosfato a 0,1M (Tabela 4.8), e centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos; desprezou-se o sobrenadante; realizou-se esta operação duas vezes;
- o “pellet” foi ressuspenso em 5 mL de acetona (P.A.) e mantida em repouso por 20 minutos em banho de gelo;
- centrifugou-se a amostra a 3000 rpm por 20 minutos; desprezou-se o sobrenadante e o residual de acetona foi eliminado fluxionando N₂ (100%) na amostra;

- a amostra foi ressuspensa em 5 mL da solução dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, acrescida de 5 mL de NaOH 2N e agitou-se vigorosamente; a amostra permaneceu em repouso na ausência de luz por 30 minutos;
- após o período de reação, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 3000 rpm, por 10 minutos;
- retirou-se 0,5 mL do sobrenadante e efetuou-se a dosagem de proteínas.

Uma vez liberadas, as proteínas foram quantificadas pelo método de LOWRY modificado por PETERSON (1977). Neste método a concentração de proteínas é obtida através da curva de calibração expressa em miligramas de soro albumina bovina por Litro - mgSAB/L – (Apêndice A1) (VARESCHE, 1997). O procedimento está descrito a seguir:

- foram distribuídos 5 mL da solução D (Tabela 4.8) em tubos de ensaio;
- adicionou-se um volume de 0,5 mL do sobrenadante resultante da extração de proteína das células; no tubo “branco” a amostra de proteína foi substituída por 0,5 mL de NaOH 1N; após serem agitados vigorosamente, os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos;
- adicionou-se um volume de 0,5 mL do reativo “Folin Ciocalteu” 1N; os tubos foram agitados e deixados em repouso por 30 minutos na ausência de luz;
- as leituras da absorbância foram feitas no comprimento de onda de 750 nm.

TABELA 4.8 – Soluções utilizadas para a dosagem de proteínas celular

Solução tampão fosfato 0,1M

26,80 g de fosfato de sódio dibásico em 1000 ml de água

8,3 ml de uma solução de hidróxido de sódio 2N

Completar o volume para 2000 mL com água Milli-Q

Solução dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%

10 g de dodecil sulfato de sódio

1000 mL de água Milli-Q

Solução D

20 mL de uma solução 0,5% de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

20 mL de uma solução 1% de tartarato de sódio e potássio

Obs: armazenar no escuro, sob refrigeração, no máximo por 30 dias

Fonte: BHADURI e DEMCHICK (1983); PETERSON (1977)

4.7 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA CULTURA

SW1

Neste ensaio foi possível acompanhar o crescimento bacteriano da cultura SW1, determinando a taxa máxima de crescimento específico (μ_{\max}) e o tempo de geração (Tg), bem como as velocidades específicas de utilização do sulfato e ácido láctico e as velocidades de produção de sulfeto e ácido acético.

Os ensaios foram realizados em quatro frascos de Duran de 1000 mL com volume útil de reação de 750 mL, mantendo-se as condições do cultivo controlado. Foi utilizado um inóculo de 5% (v/v), o qual recebeu o mesmo tratamento descrito para o ensaio fisiológico II. Dois frascos foram submetidos a uma agitação de 200 rpm enquanto os outros dois foram incubados sem agitação. Os frascos foram mantidos a 30°C por um período de 23 dias.

Para acompanhar o crescimento bacteriano foi utilizado o método de dosagem de proteína (LOWRY modificado por PETERSON, 1977) descrito no item 4.6.2.1. A dosagem de sulfato foi realizada por um método turbidimétrico, de sulfeto por um método colorimétrico e o acompanhamento da utilização de ácido láctico e produção de ácido acético por determinações cromatográficas. Estes métodos estão descritos abaixo.

4.7.1 Método para dosagem de sulfato

A determinação do sulfato foi realizada pelo método turbidimétrico descrito no STANDARD METHODS (1992), no qual o íon sulfato é precipitado em um meio de ácido acético com cloreto de bário (BaCl_2) formando cristais de sulfato de bário. A concentração mínima detectável é de aproximadamente 1 mg/L. A absorvância da suspensão é lida a 420 nm e a concentração determinada pela comparação da leitura com a curva padrão com sulfato de sódio (Apêndice A2). O procedimento utilizado para a dosagem de sulfato está descrito abaixo:

- mediu-se 100 mL da amostra diluída 100x e transferiu-se este volume para um erlenmeyer;
- adicionou-se 20 mL da solução tampão A (Tabela 4.9) e agitou-se;
- adicionou-se 0,26 g de cloreto de bário e agitou-se em velocidade constante por 1 minuto;

- o branco foi realizado com a amostra acrescida da solução tampão, sem a adição do cloreto de bário;
- mediu-se a turbidez a 420 nm.

TABELA 4.9 – Solução Tampão A para dosagem de sulfato

Solução Tampão A
30,0 g Cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
5,0 g Acetato de sódio ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)
1,0 g Nitrato de potássio (KNO_3)
20,0 mL Ácido acético (CH_3COOH 99%)

Fonte: STANDARD METHODS (1992)

4.7.2 Método para dosagem de sulfeto total

Para o acompanhamento da produção de sulfeto durante o ensaio de crescimento bacteriano, foi utilizado o método descrito por QUENTIN e PACHMEYER e modificado por PLAS *et al*³². *apud* VARESCHE (1997). A concentração de sulfeto detectada por este método situa-se entre 0 e 1,5 mM. A concentração é obtida através de curva padrão com sulfeto de sódio (Apêndice A3). Cuidados para evitar perdas devem ser tomados, como manter os tubos sempre fechados e utilizar água desoxigenada (fervida e resfriada). Segue abaixo os procedimentos para a dosagem de sulfeto:

- distribuiu-se um volume de 200 μ L da amostra em tubos Bellco®; água Milli-Q desoxigenada substituiu a amostra para o branco;
- adicionou-se um volume de 10 mL da solução de acetato de zinco a 0,01M, 1 mL da solução dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD) e 70 μ L da solução de sulfato férrico amoniacal (todas as soluções descritas na Tabela 4.10);
- após o período de reação de 20 minutos, mediu-se a absorbância em 663 nm.

³² PLAS, C; HARANT, H.; DANNER, H.; JELINEK, E.; WIMMER, K.; HOLUBAR, P.; BRAUN, R. (1992). Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colourless sulphur bacteria. *Appl. Microb. Biotech.* v. 36, p. 817-822.

TABELA 4.10 – Soluções para dosagem de sulfeto total

Solução de Acetato de Zinco 0,01M

20 g de acetato de zinco dihidratado

0,2 ml de ácido acético P.A.

1000 mL de água Mili-Q desoxigenada

*Obs. Armazenar sob refrigeração***Solução de sulfato férrico amoniacal**

2 mL de ácido sulfúrico P.A. (gota a gota) em 50 mL de água Mili-Q desoxigenada

10 g de sulfato férrico amoniacal $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ *Completar o volume para 100 mL com água Mili-Q desoxigenada**Obs: armazenar no escuro sob refrigeração***Solução de dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD)**

0,5 g de DMPD em 50 mL de água desoxigenada sob banho de gelo

50 ml de ácido sulfúrico (96%) gota a gota

*Completar o volume com água desoxigenada para 250 mL**Obs: armazenar no escuro sob refrigeração por 30 dias*Fonte: PLAS *et al*³². *apud* VARESCHE (1997)**4.7.3 Método para dosagem de ácidos orgânicos**

As análises de ácido láctico e ácido acético foram realizadas em um cromatógrafo Pharmacia LKB, constituído de um controlador LCC 2252, duas bombas HPLC 2248, um forno para coluna HPLC 2155 e um detector UV Visível VWM 2141 em comprimento de onda de 210 nm. Uma coluna Aminex HPX-87H de exclusão iônica com 300 x 7,8 mm foi usada como fase estacionária. A fase móvel foi constituída por solução a 10% de acetonitrila em H_2SO_4 (0,004M), com fluxo de 0,600 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μL .

Antes da injeção, 1,0 mL da amostra foi filtrado em filtro Millipore de 13 mm de diâmetro e 0,45 μm , diluído a 10,0 mL de uma solução de H_2SO_4 a 0,5M e filtrado novamente, na mesma porosidade anterior.

As áreas equivalentes aos picos foram corrigidas para concentração em mg/L, através das equações obtidas pelas curvas padrão de ácido láctico (Apêndice A4) e de ácido acético (Apêndice A5).

4.7.4 Avaliação dos valores obtidos

Os cálculos da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e tempo de geração (T_g) da cultura isolada utilizou os conceitos definidos em literatura básica sobre cinética de crescimento celular (BORZANI, 1986), em que T_g é inversamente proporcional a μ_{\max} , sendo $\ln 2$ a constante de proporcionalidade (Equação 3.1).

A determinação da velocidade específica na fase exponencial de crescimento foi feita graficamente, projetando-se os valores do logaritmo neperiano da concentração celular (obtida, neste caso, através da dosagem de proteína celular) contra o tempo de cultivo, identificando os pontos que possuem a maior probabilidade de alinharem-se em uma mesma reta. Estes correspondem a fase exponencial de crescimento, onde a velocidade específica é máxima e constante. Através do cálculo da regressão linear dos pares de pontos, determinou-se a equação da reta, cujo coeficiente angular corresponde ao μ_{\max} (VARESCHE, 1997).

As curvas de consumo de ácido láctico e sulfato e de produção de ácido acético e sulfeto foram obtidas projetando-se os valores das respectivas concentrações em função do tempo, e correspondem às velocidades de consumo e de produção, respectivamente. As velocidades específicas foram obtidas dividindo as velocidades pela concentração de microrganismos no respectivo tempo.

As variáveis de entrada de cada processo são avaliadas de acordo com a seguinte regra: se a variável de entrada for igual a zero, o valor da variável de saída é igual a zero; caso contrário, o valor da variável de saída é igual ao valor da variável de entrada.

Assim, os valores parciais são atribuídos de acordo com a seguinte regra: se a variável de entrada for igual a zero, o valor da variável de saída é igual a zero; caso contrário, o valor da variável de saída é igual ao valor da variável de entrada.

Assim, os valores parciais são atribuídos de acordo com a seguinte regra: se a variável de entrada for igual a zero, o valor da variável de saída é igual a zero; caso contrário, o valor da variável de saída é igual ao valor da variável de entrada.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes às atividades experimentais realizadas com as amostras fornecidas pelo Cenpes/Petrobrás.

Como apresentado no capítulo anterior, o meio de cultura empregado em todas as fases do trabalho foi o Postgate E modificado (P.E. *m*), preparado com água Milli-Q no cultivo de amostras de água doce ou preparado em água do mar sintética para o cultivo de amostras provenientes de ambientes marinhos.

Após o cultivo controlado das amostras, em que foi possível adequá-las às condições de cultivo sob anaerobiose estrita, seguiu-se o procedimento de isolamento das culturas. Dois métodos foram utilizados: diluições decimais seriadas para as amostras SW1 e SW2 de origem marinha e a técnica do “Roll-Tube” para as amostras FW1 e FW2, provenientes de água doce. Em adição ao método do “Roll-Tube”, algumas vezes, foi necessário o emprego da técnica de diluições decimais seriadas, a fim de purificar a cultura obtida.

Uma cultura de BRS foi isolada de cada amostra estudada, e estudos morfo-fisiológicos foram realizados com os isolados. Especialmente com as culturas FW2 e SW1, foi feito um ensaio sobre a resposta fisiológica celular, através da medida de crescimento bacteriano em diferentes condições nutricionais. O estudo da cinética de crescimento da cultura SW1 foi conduzido em um intervalo de 23 dias. Neste período foram realizadas 8 leituras, obtendo-se os valores de proteína total, sulfeto total, sulfato, ácido láctico e ácido acético. Os resultados possibilitaram a determinação da velocidade específica de crescimento da cultura SW1, bem

como do tempo de geração, da velocidade específica de consumo de sulfato e lactato e a da velocidade específica de produção de sulfeto e acetato.

5.1 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA I

A caracterização morfológica inicial, realizada com as amostras originais previamente enriquecidas pelo Cenpes/Petrobrás em meio P.E.m, com aproximadamente 60 dias de incubação, revelou diferentes tipos morfológicos presentes nas amostras.

A Figura 5.1 destaca as diversas morfologias presentes na amostra enriquecida de água do mar tratada para injeção, denominada amostra SW1, com o predomínio de bacilos curvos (Figura 5.1d). Podem ser vistos também, alguns filamentos espiralados, filamentos retos e bacilos retos.

Na Figura 5.2 são apresentadas as morfologias encontradas na amostra FW1, enriquecida a partir de um “pool” de amostras envolvendo resíduo de corrosão, água oleosa produzida em sistemas petrolíferos além de amostras de água dos rios, dos quais, provavelmente, é coletada a água de injeção. Nesta figura observam-se cocos, filamentos e bacilos curvos, estes últimos predominantes na amostra (Figura 5.2c).

As morfologias da amostra enriquecida FW2, proveniente de um resíduo de corrosão de um gasoduto, estão apresentadas na Figura 5.3. Nesta são destacadas as morfologias de filamentos espiralados, bacilos retos e bacilos curvos (Figura 5.3c), esses últimos predominantes.

Na Figura 5.4 são apresentadas as morfologias presentes na amostra SW2, enriquecida a partir de uma amostra de água do mar tratada para injeção, na qual destacam-se bacilos curvos de tamanhos variados (Figura 5.4a e 5.4c), alguns cocos e algumas células alongadas.

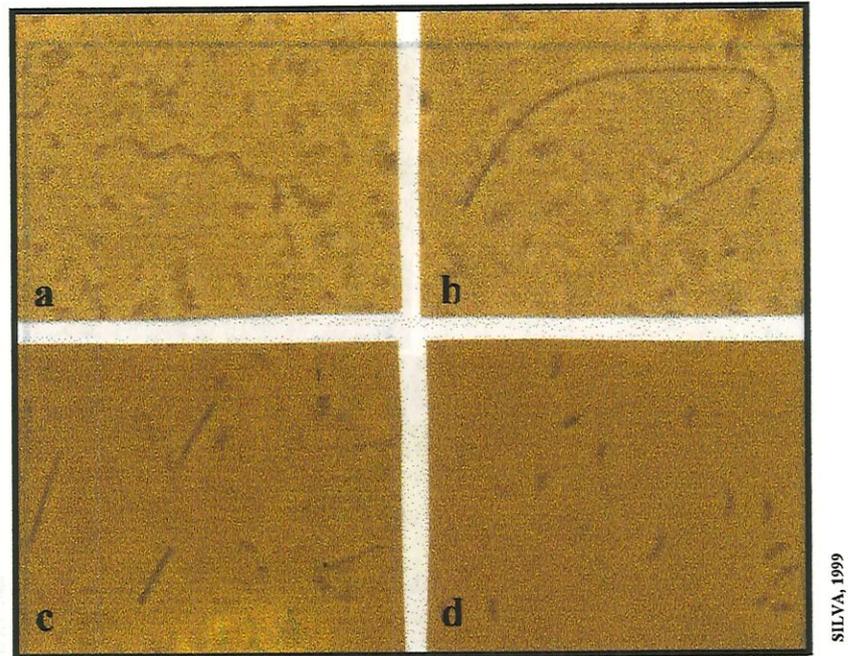


FIGURA 5.1 Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra SW1, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).

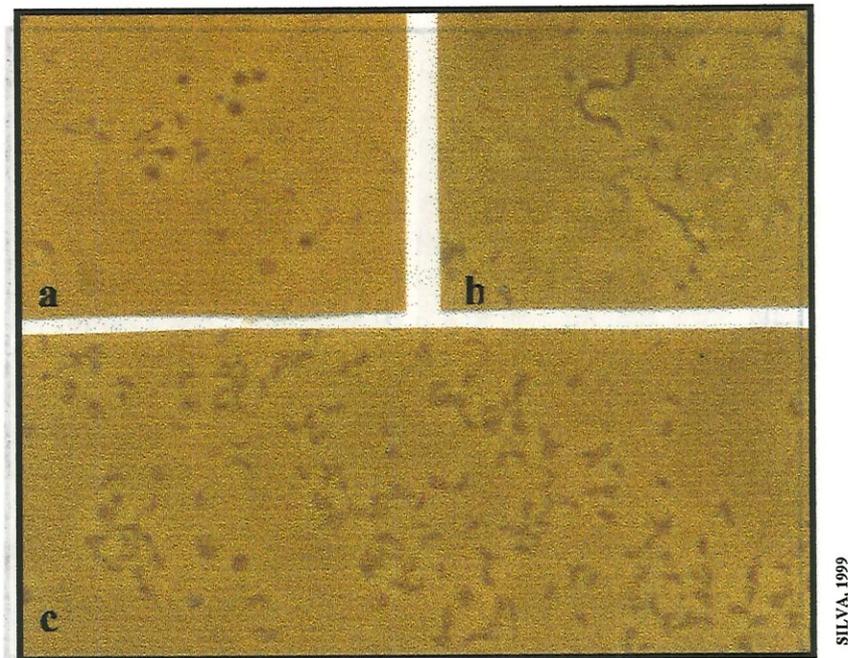


FIGURA 5.2 Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra FW1, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

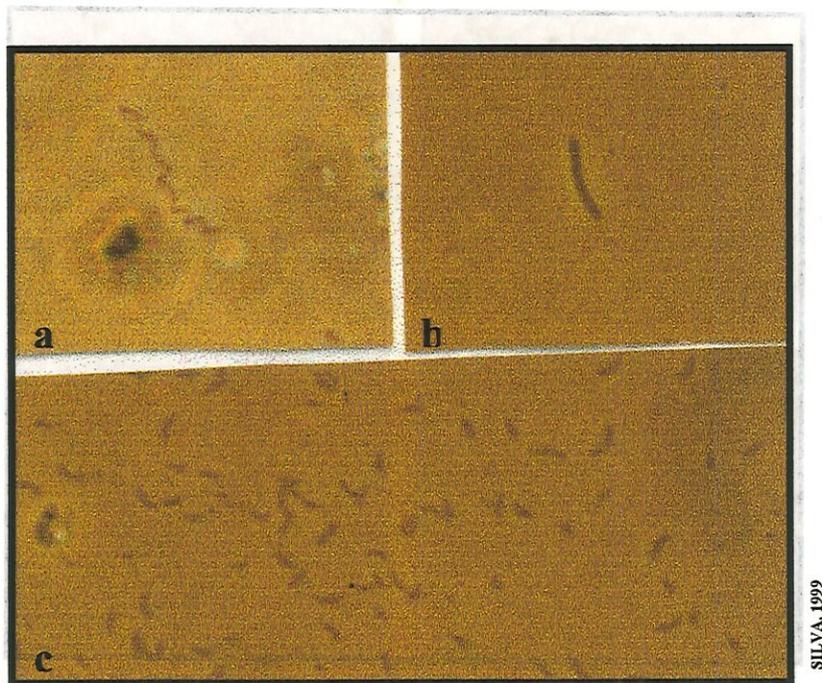


FIGURA 5.3 Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra FW2, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

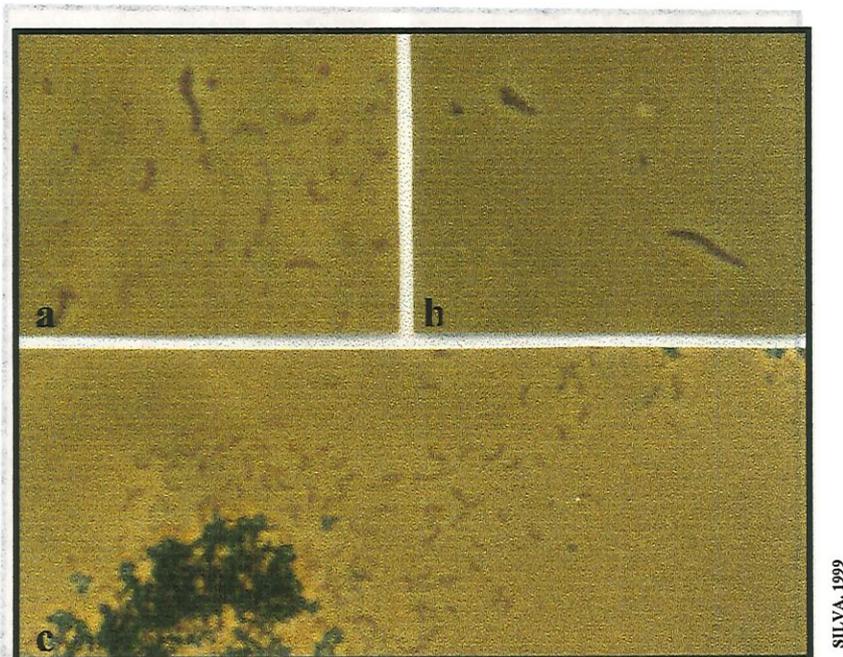


FIGURA 5.4 Células encontradas no mapeamento morfológico da amostra SW2, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).

Apesar de serem originalmente diferentes, as amostras apresentaram basicamente as mesmas morfologias, com predomínio de bacilos curvos característicos de BRS (POSTGATE, 1979; WIDDEL e PFENNIG, 1984). Outra evidência da presença de BRS nas amostras foi a coloração escura do meio, observada macroscopicamente, devido à formação de FeS.

5.2 CULTIVO CONTROLADO

As amostras foram cultivadas no meio de cultura P.E.m, o mesmo empregado nos cultivos realizados pelo Cenpes/Petrobrás, adequando-as às novas condições experimentais, sob anaerobiose estrita, segundo as normas da área de Microbiologia do Laboratório de Processos Biológicos (SHS-EESC-USP). No entanto, nos últimos subcultivos desta fase, o extrato de levedura foi excluído do meio a fim de minimizar o desenvolvimento de outros grupos bacterianos. WIDDEL e BAK (1992) comentaram que este composto causa um rápido desenvolvimento de várias bactérias fermentativas.

O cultivo controlado das amostras SW1, FW1 e FW2 ocorreu em um período de 73 dias, mantendo-se as culturas a 30°C. Os tempos de incubação foram determinados conforme os resultados dos exames microscópicos. Foram realizados 4 subcultivos, os três primeiros incubados por 15 dias e o último por 28 dias. A amostra SW2 foi submetida a um período de cultivo de 83 dias, sendo o primeiro subcultivo incubado por 21 dias, o segundo por 28 dias e o terceiro por 34 dias. O período total empregado no cultivo controlado, foi o mesmo sugerido por WIDDEL e BAK (1992), em que amostras enriquecidas devem ser transferidas de 2 a 5 vezes em novo meio, antes de iniciar o processo de isolamento da cultura.

Como pode ser visto na Figura 5.5a, o cultivo controlado selecionou a morfologia de bacilos curvos na amostra SW1, pois nesta fase experimental não foram observados os filamentos encontrados no mapeamento inicial.

A amostra FW1 apresentou uma abundante concentração de longos filamentos, alguns espiralados, o que não foi constatado durante o mapeamento inicial dessa amostra. No entanto, prevaleceram os bacilos curvos (Figura 5.5b).

Estavam presentes na amostra FW2, além dos predominantes bacilos curvos, bacilos retos, cocos e algumas células alongadas (Figura 5.5c). Microscopicamente foi constatado um aumento do material particulado, provavelmente sulfeto de ferro precipitado.

Quanto à amostra SW2, a diferença esteve na diminuição do material particulado, observado microscopicamente. As morfologias permaneceram as mesmas: alguns cocos e filamentos curtos, bacilos curvos pequenos e grandes (Figura 5.5d).

Pela comparação dos exames microscópicos realizados inicialmente e após o cultivo controlado, pode-se concluir que tanto o enriquecimento realizado pelo Cenpes/Petrobrás quanto o cultivo controlado, sob anaerobiose estrita e na ausência de extrato de levedura, realizado neste trabalho, foram igualmente capazes de selecionar os mesmos tipos morfológicos, entre eles, os predominantes bacilos curvos, característicos de BRS. Sabe-se que enriquecimentos selecionam os organismos com maior velocidade de crescimento e aqueles melhores adaptados ao meio de cultivo utilizado. Assim, pode-se inferir que o meio Posgate E modificado, juntamente com os métodos de anaerobiose estrita, foi capaz de selecionar BRS com a morfologia de bacilos curvos. De acordo com WIDDEL e BAK (1992), lactato e sulfato tem sido usado com sucesso para o cultivo de organismos pertencentes aos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*.

5.3 ISOLAMENTO DAS CULTURAS REDUTORAS DO ÍON SULFATO

Neste item são apresentadas as seqüências do isolamento das culturas. As morfologias isoladas serão apresentadas e discutidas no item 5.4, juntamente com a caracterização morfo-fisiológica das mesmas.

Os métodos utilizados para o isolamento se mostraram eficientes na obtenção de culturas puras. O critério de análise do crescimento baseou-se no escurecimento e turvação do meio líquido, e na formação de colônias escuras em meio sólido, ambos suportados por exames microscópicos. O período de incubação não foi padronizado para todas as amostras, estando este dependente dos resultados observados nos exames microscópicos. A temperatura de incubação foi de 30°C.

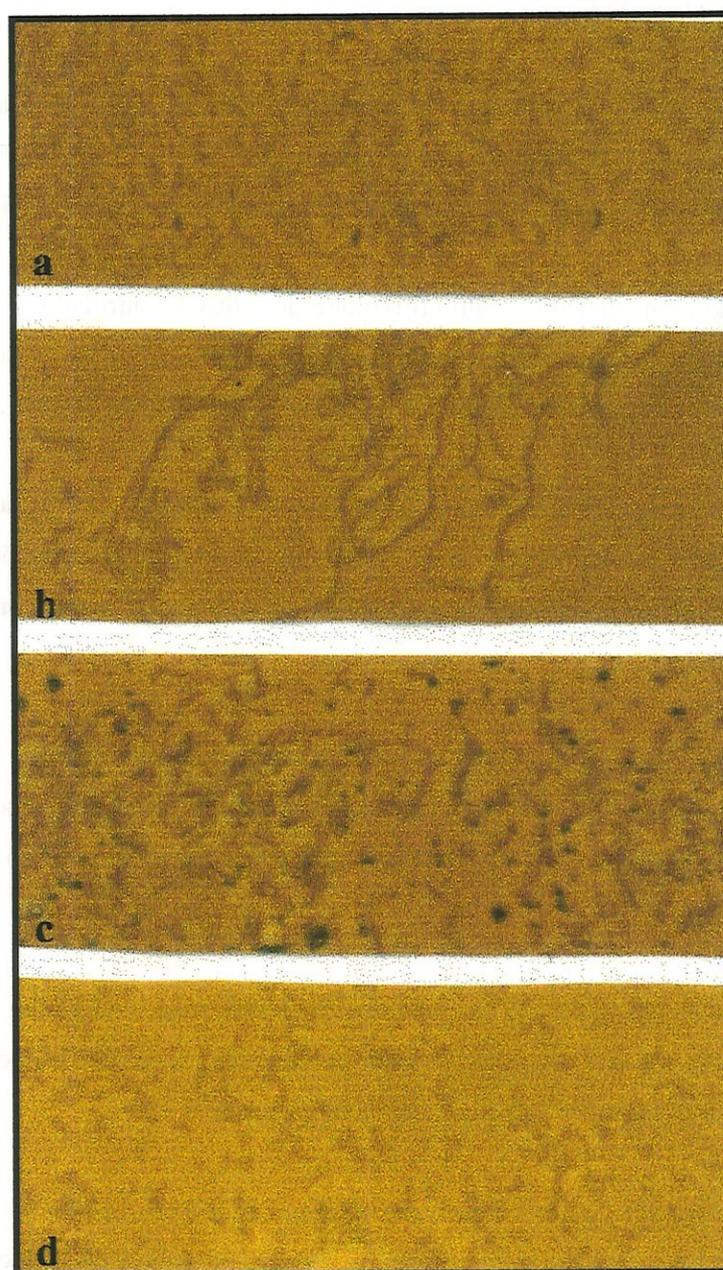


FIGURA 5.5 Morfologias encontradas na fase de cultivo controlado, observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto); (a) amostra SW1; (b) amostra FW1; (c) amostra FW2; (d) amostra SW2

5.3.1 Amostra SW1

Como anteriormente referido, a amostra SW1 foi submetida ao isolamento utilizando-se a técnica das diluições seriadas decimais. Em um período de 76 dias foram realizadas 4 séries de diluições, como pode ser visto no esquema apresentado na Figura 5.6.

Utilizando como inóculo o último repique do cultivo controlado (com 28 dias de incubação), foi realizada a primeira (diluição I) das quatro séries, com oito diluições decimais. Após 13 dias de incubação, apenas a diluição 10^{-2} apresentou crescimento de BRS.

A segunda série (diluição II) teve como inóculo a diluição 10^{-2} da série anterior, e realizaram-se 6 diluições a partir desta. Após 27 dias de incubação, as diluições 10^{-2} e 10^{-10} apresentaram crescimento, com abundância de bacilos curvos, porém ainda com presença de alguns filamentos curtos.

Estas duas diluições foram utilizadas como inóculo para a terceira série (diluição III), na qual foram realizadas dois grupos tendo cada um deles 5 diluições para cada inóculo. Após 29 dias de incubação, apenas as diluições 10^{-2} e 10^{-8} provenientes do inóculo 10^{-10} apresentaram crescimento.

Amostras das diluições 10^{-2} e 10^{-8} foram inoculadas em uma última série (diluição IV), na qual foram realizadas três diluições, obtendo-se uma cultura pura de bacilos curvos, após 7 dias de incubação, na diluição 10^{-4} , proveniente da diluição 10^{-8} .

Pode-se concluir que os bacilos curvos observados inicialmente na amostra SW1, enviada pelo Cenpes/Petrobrás, foram selecionados e isolados através da técnica de diluições decimais seriadas. Suas características morfológicas estão apresentadas no item 5.4.4.

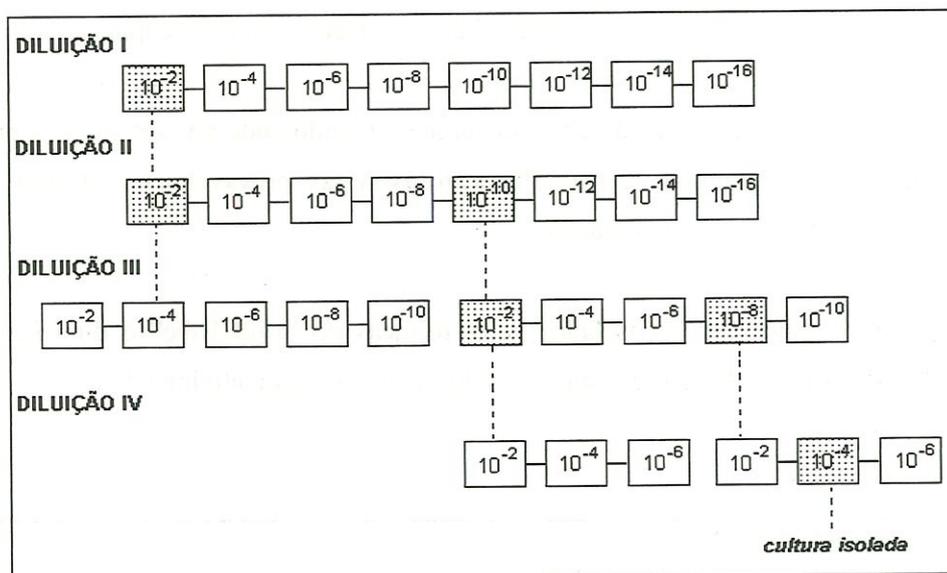


FIGURA 5.6 Esquema do isolamento da cultura SW1 através de diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados se referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes.

5.3.2 Amostra FW2

Para o isolamento da amostra FW2 foi utilizado o método do “Roll-Tube”, seguido de algumas diluições decimais, como pode ser visto no esquema apresentado na Figura 5.7. O primeiro “Roll-Tube” compreendeu 7 tubos de ensaio, utilizando-se um inóculo com 30 dias de incubação. Após 40 dias de incubação uma colônia foi coletada e inoculada em meio de cultura. Com 15 dias de incubação, exames microscópicos indicaram a presença de outras morfologias, além de bacilos curvos. Decidiu-se, então, submeter esta amostra à técnica de diluições decimais seriadas.

Foram realizadas quatro série de diluições, cada qual com 30 dias de incubação. No entanto, o melhor desenvolvimento em todas as séries ocorreu na diluição 10⁻². O cultivo a 10⁻² da última diluição (diluição IV) foi utilizado como inóculo para o “Roll-Tube” II. Após 37 dias

de incubação, foi coletada a única colônia que cresceu sobre a superfície do ágar, completamente isolada. A colônia está apresentada na Figura 5.8, visualizada em microscopia comum.

Esta colônia então, foi cultivada em meio líquido onde foi constatado a presença de bacilos curvos e de algumas formas filamentosas, estas provavelmente devido alterações morfológicas dos próprios bacilos curvos.

Os bacilos curvos, isolados pelas técnicas do “Roll-Tube” e diluições decimais seriadas, foram visualizados entre outras morfologias no mapeamento inicial.

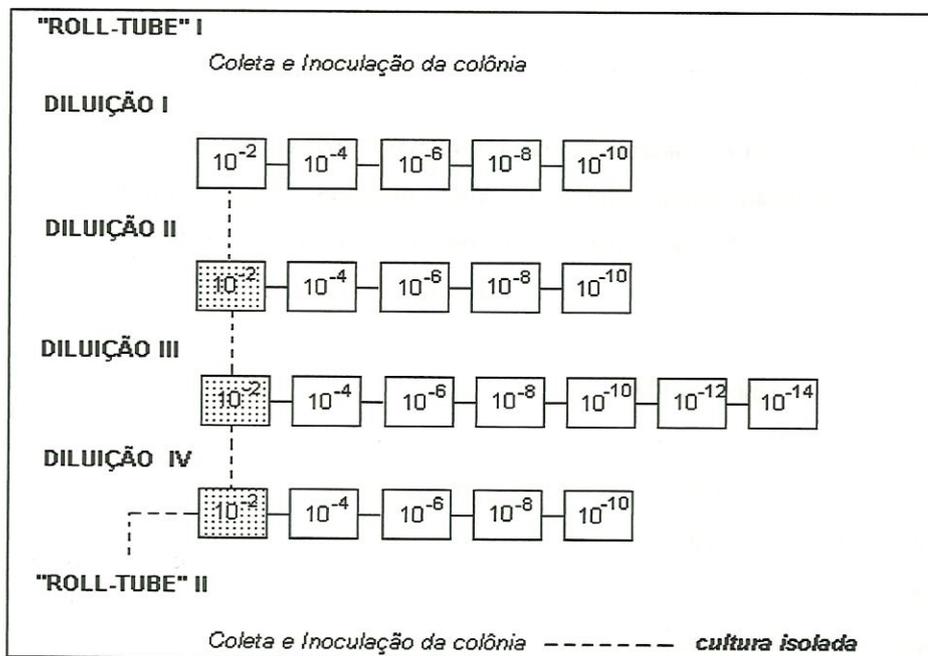
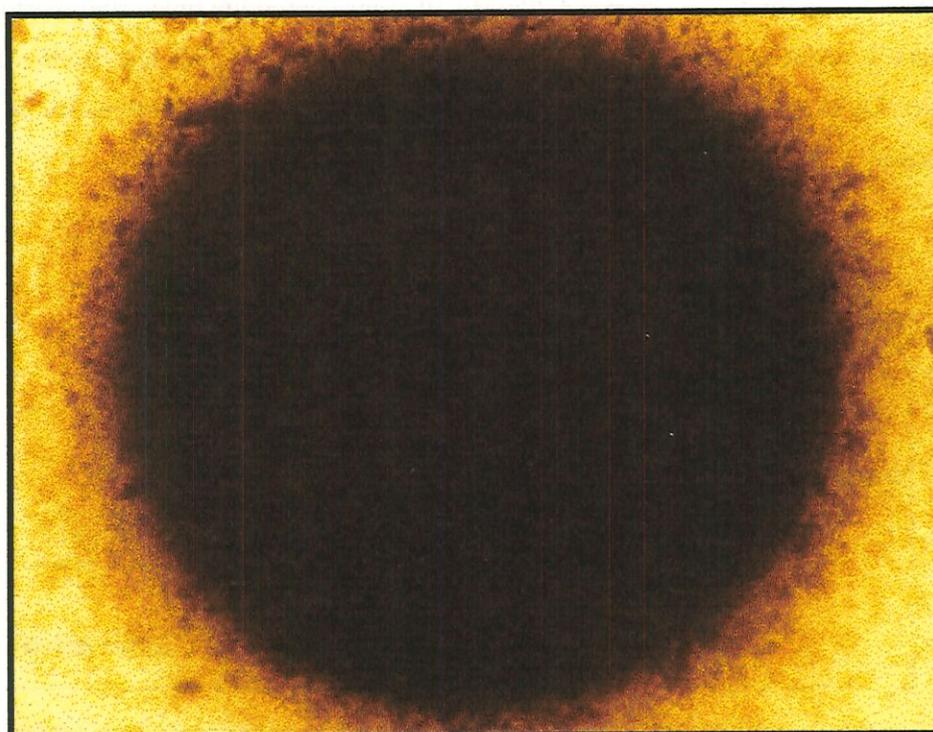


FIGURA 5.7 Esquema do isolamento da cultura FW2, pelo método do “Roll-Tube” e das diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados se referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes.



SILVA, 1999

FIGURA 5.8 Microfotografia da colônia isolada da amostra FW2 em “Roll-Tube” (microscopia comum, ocular 10; objetiva 4; zoom de 1,25 e ampliação da foto)

5.3.3. Amostra SW2

A amostra SW2 foi submetida ao isolamento por meio da técnica de diluições decimais seriadas. Duas séries de diluições foram suficientes para a obtenção da cultura pura desta amostra. O esquema do isolamento está apresentado na Figura 5.9.

O inóculo para a primeira diluição partiu do último subcultivo controlado (com 29 dias de incubação). Na primeira série foram realizadas 5 diluições seriadas. Observações microscópicas indicaram que as diluições apresentavam diversas morfologias, exceto a diluição 10^{-8} , na qual, apesar de apresentar poucas células, foi verificado apenas dois tipos morfológicos.

Amostra da diluição 10^{-8} com 25 dias de incubação foi inoculada em uma segunda série, na qual foram realizadas sete diluições. Após 15 dias de incubação, todas as diluições

apresentaram crescimento, mas apenas a diluição 10^{-14} apresentou um único tipo morfológico de bacilos curvos pequenos, similares aos vistos no mapeamento inicial. Os bacilos maiores e outras morfologias presentes inicialmente na amostra SW2 não foram selecionadas no processo de isolamento.

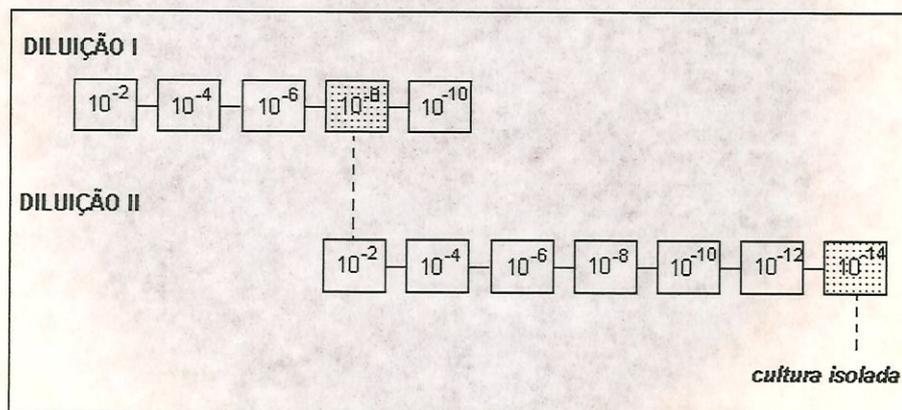


FIGURA 5.9 Esquema do isolamento da cultura SW2, utilizando diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados se referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes.

5.3.4 Amostra FW1

O isolamento da cultura FW1, realizado através do método do “Roll-Tube”, iniciou-se utilizando um inóculo com 30 dias de incubação. A Figura 5.10 mostra o esquema das etapas de isolamento. Dois tubos de ensaio apresentaram resultado positivo, mas com períodos de incubação distintos (“Roll-Tube” I com 42 dias e “Roll-Tube” II com 28 dias de incubação). As colônias foram coletadas e subcultivadas em meio líquido. Após 15 dias de incubação, exames microscópicos das duas culturas indicaram a ocorrência de mais de uma morfologia. Sendo assim, optou-se pela realização de duas séries de diluições decimais seriadas de cada cultivo.

Na primeira série de diluições decimais, os inóculos estudados foram provenientes do “Roll-Tube” I e do “Roll-Tube” II, realizando-se 5 diluições para cada inóculo. Após 20 dias de incubação, foi feita a segunda série, com 5 diluições da amostra da diluição 10^{-6} , proveniente

do “Roll-Tube” II, a qual apresentou bom crescimento em relação às demais. Uma cultura pura de bacilos curvos foi obtida na diluição 10^{-2} após 20 dias de incubação.

Este tipo morfológico foi o mesmo encontrado predominantemente no mapeamento inicial da amostra. As demais morfologias não foram mais observadas no decorrer do processo de isolamento.

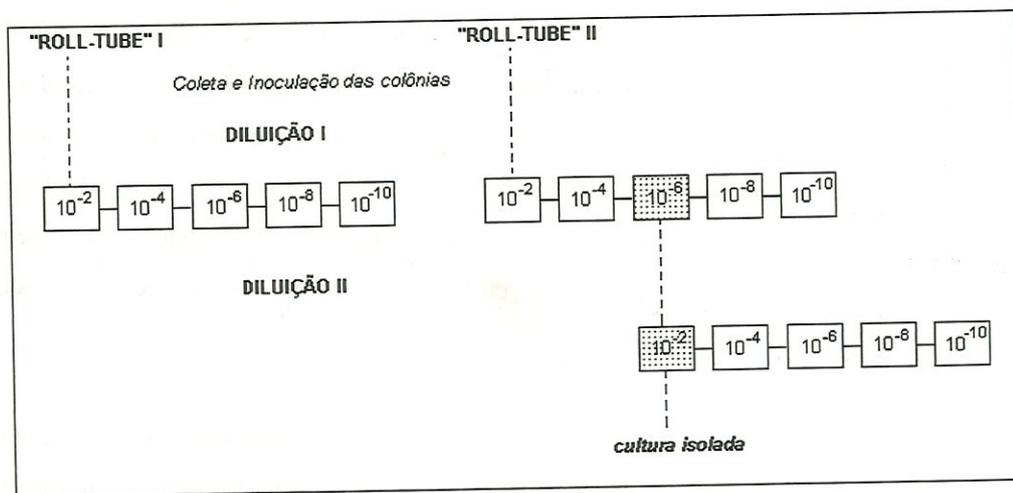


Figura 5.10 Esquema do isolamento da cultura FW1 através do método do “Roll-Tube” e de diluições decimais seriadas. Os quadrados destacados se referem as diluições que apresentaram crescimento de BRS as quais foram utilizadas como inóculo para as séries seguintes.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DAS CULTURAS ISOLADAS

As culturas isoladas receberam denominações similares as siglas das amostras, ou seja, a cultura isolada da amostra FW1 foi denominada cultura FW1, e assim para as demais.

Dentre os caracteres morfológicos estudados em todas as culturas isoladas estão: dimensões celulares, resposta segundo a coloração de Gram, formação de esporos e presença de desulfoviridina.

As quatro culturas isoladas foram submetidas ao ensaio fisiológico I, em que foram testados diferentes fontes de carbono, incubados a 30°C sem agitação. No entanto, para as culturas FW1 e FW2, originalmente de água doce, foi testado também um cultivo sob condições salinas, utilizando o meio P.E.m com água do mar sintética. Assim foi possível observar o comportamento das culturas FW1 e FW2 sob condições marinhas. A avaliação do crescimento celular nesse ensaio foi feita após 30 dias de cultivo, através de observações macroscópicas (turvação do meio de cultivo) e microscópicas.

No ensaio de resposta fisiológica II, foram testados diferentes fontes de carbono e aceptores inorgânicos de elétrons, a 30°C e sob agitação de 175 rpm. Também foram analisados o crescimento na ausência de ferro e o crescimento sob temperatura de 55°C. Decorrido os 20 dias de incubação, foram feitos exames microscópicos, e as amostras foram congeladas para posterior dosagens de proteína total pelo método de LOWRY modificado por PETERSON (1977), para avaliar as respostas de crescimento. Esse ensaio fisiológico foi aplicado para as amostras FW2 e SW1, amostras melhor caracterizadas, morfo e fisiologicamente, nos experimentos que antecederam o ensaio de resposta fisiológica II.

5.4.1 Cultura FW1

A cultura isolada FW1, proveniente de uma amostra composta por resíduos de corrosão, água de rios e água produzida em sistemas petrolíferos, constituiu-se de bacilos curvos, com dimensões médias de 1,2 μm de comprimento e 0,5 μm de espessura (Figura 5.11a),

cultivados a 20 dias na condição de isolamento. Foi observado, macroscopicamente, a formação de biofilmes aderidos à superfície interna dos frascos nos quais a cultura FW1 foi cultivada.

Uma amostra dos bacilos curvos da cultura FW1, cultivados por 15 dias, foram submetidos aos testes morfológicos cujos resultados os consideraram Gram-negativos, devido a reação das células com o KOH, uma vez que a resposta tintorial da reação de Gram se apresentou indefinida; capazes de formar esporos e sem a enzima desulfoviridina. Alguns esporos podem ser vistos na Figura 5.11a.

As respostas fisiológicas no ensaio I da cultura FW1, estão apresentados na Tabela 5.1. Neste ensaio foi utilizado um inóculo com 20 dias de incubação. Dentre as diferentes condições estudadas, o melhor resultado ocorreu no cultivo em meio com água do mar sintética (40mM de lactato de sódio e 37 mM de sulfato), em que foram evidenciados grande quantidade de bacilos curvos, morfológicamente constantes. Entre os cultivos em meio P.E.m preparado com água Milli-Q, os melhores resultados foram obtidos em lactato de sódio (40mM) e malato de sódio (40mM) e H₂/CO₂ (80/20%), todos na presença de 10mM de sulfato, apresentando boa concentração de bacilos curvos. Raras células foram vistas na presença etanol (40mM) e formiato de sódio (40mM), e ausência total de células em meio com acetato de sódio (40mM).

Examinando um subcultivo após 27 dias de incubação em meio salino, constatou-se que, nesta condição, os bacilos curvos foram um pouco maiores do que os cultivados na condição de isolamento, com dimensões médias de 1,8 µm de comprimento e 0,4 µm de espessura (Figura 5.11b e 5.11c). Os resultados da coloração de Gram e desulfoviridina foram os mesmos obtidos no cultivo sob as condições de isolamento. Contudo, o teste de esporos não foi capaz de promover a esporulação total da cultura. Um outro teste de esporos foi realizado com a cultura cultivada por 7 dias nas mesmas condições e o resultado continuou o mesmo, ou seja, algumas células esporularam porém outras permaneceram intactas e móveis. Alguns fatores como condições de cultivo, qualidade e quantidade de inóculo e tempo de exposição a altas temperaturas poderiam estar relacionados ao resultado obtido. No entanto, pelos resultados obtidos na condição de isolamento, considerou-se a cultura como capaz de formar esporos.

TABELA 5.1 - Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura FW1

Condição	Resultado	Observação Microscópica
Lactato + SO ₄ ²⁻	+	Muitos bacilos curvos e bacilos com extremidade afilada, ambos com movimento serpentina, alguns filamentos
Etanol + SO ₄ ²⁻	+/-	Raras células
Formiato + SO ₄ ²⁻	+/-	Raras células agregadas, presença de filamentos
Acetato + SO ₄ ²⁻	-	Não houve crescimento bacteriano
Malato + SO ₄ ²⁻	+	Muitos bacilos curvos com movimento serpentina
H ₂ /CO ₂ + SO ₄ ²⁻	+	Bacilos semelhantes ao visto na condição lactato
Condição marinha Lactato + SO ₄ ²⁻	++	Abundância de células, morfologia de bacilos curvos

10mM de SO₄²⁻, exceto condição marinha 37mM

40mM composto orgânico; H₂/CO₂ (80/20%)

+ com crescimento bacteriano - sem crescimento bacteriano +/- pouco crescimento

Ao comparar as Figuras 5.2 e 5.11a, verifica-se que as células dos bacilos curvos inicialmente observados na amostra, parecem mais saudáveis do que em cultura pura. Talvez a presença dos outros tipos morfológicos favoreça a formação de um consórcio metabólico que contribui para um melhor desenvolvimento dos bacilos no meio equivalente a água doce.

Dentre as características fenotípicas apresentadas pela cultura FW1, a capacidade de formar esporos e a ausência de desulfovirdina foram fundamentais para diferenciar a cultura isolada do gênero *Desulfovibrio*, morfologicamente semelhante, e aproximá-la do gênero *Desulfotomaculum*, o qual muitas vezes apresenta coloração de Gram variável (POSTGATE, 1979; WIDDEL, 1988).

Devido a sua resposta sob condições salinas (2,3% de NaCl), pode-se considerar que a cultura FW1 é uma espécie halófila. Com relação à salinidade, destacam-se entre as

espécies de *Desulfotomaculum* conhecidas, algumas culturas de *Desulfotomaculum acetoxidans* (1-2%), *D. reducens* (0-2%) e *D. halophilum* (1-14%), no entanto, a característica de oxidador incompleto (incapaz de utilizar acetato como fonte de energia) exclui a possibilidade da cultura FW1 ser similar a *D. acetoxidans*. Crescimento em malato foi constatado na cultura *D. halophilum* (TARDY-JACQUENOD *et al.*, 1998), mas não foi observado em *D. reducens* (TEBO e OBRAZTSOVA, 1998).

Uma característica importante é que, apesar de apresentar ótimas condições de crescimento em salinidade de 2,3%, a cultura FW1 foi isolada sob condições equivalentes a água doce, portanto capaz de crescer sob salinidade reduzida, neste caso 0,2%. *D. reducens* apresenta uma faixa de salinidade entre 0 e 2, sendo possível seu crescimento nas condições impostas para a cultura FW1. Não há evidências de que *D. reducens* esteja envolvida no processo corrosivo, uma vez que foi isolada de sedimentos marinhos contaminados por metais pesados (TEBO e OBRAZTSOVA, 1998).

A preferência pela utilização de malato, bem como o crescimento em alta salinidade (2,3%), não permitiria a classificação da cultura FW1 no gênero *Desulfotomaculum*. Contudo, estas e outras características obtidas são similares às encontradas para a recente espécie isolada de sistemas de produção de petróleo, *Desulfotomaculum halophilum* (DSM 11559), uma espécie mesófila, halófila, distinta das demais encontradas no gênero, capaz de crescer utilizando lactato, malato, formiato e etanol na presença de sulfato, além de reduzir também tiosulfato e sulfito, e incapaz de utilizar nitrato (TARDY-JACQUENOD *et al.*, 1998). O mesmo autor afirma que a cultura, classificada como *D. halophilum*, não foi capaz de crescer na ausência de NaCl, contudo, não menciona as condições de cultivo a qual foi exposta.

A conclusão da semelhança entre a cultura FW1 e a espécie *D. halophilum* está relacionada com a origem de ambas. *D. halophilum* foi isolada de uma amostra de água produzida durante a recuperação do petróleo, assim como a cultura FW1, a qual foi originada de um resíduo de corrosão no ducto condutor da indústria petrolífera nacional. A constatação de formação de biofilmes pela cultura FW1, vem ao encontro das demais características que relacionam sua atividade ao processo corrosivo.

A Tabela 5.2 apresenta as características da cultura FW1 que conduziram a sua classificação como similar a espécie *Desulfotomaculum halophilum*. Contudo, outras características de *D. halophilum* não foram determinadas para a cultura FW1. Sabe-se que essa espécie se desenvolve bem em uma faixa de salinidade que varia de 1-14%, apresentando valor ótimo entre 4-6%; a faixa de temperatura variou entre 30-40°C, contudo, a temperatura ótima foi de 35°C; são capazes de fermentar o ácido pirúvico e requerem extrato de levedura para o seu crescimento (TARDY-JACQUENOD *et al.*, 1998).

TABELA 5.2 – Características gerais e classificação da cultura FW1

Cultura	FW1
Origem	Amostras de resíduos de corrosão, água de rios e água produzida
Morfologia	Bacilos curvos 1,2 x 0,5 µm
Reação de Gram	Gram-negativos
Esporos	Formadores de esporos
Desulfoviridina	Não apresentam desulfoviridina
Salinidade	Bom crescimento com 2,3% de NaCl
Oxidação	Oxidação incompleta dos compostos orgânicos
Compostos orgânicos preferenciais	Lactato e Malato na presença de sulfato
Possível classificação	<i>Desulfotomaculum halophilum</i>

5.4.2 Cultura SW2

A cultura SW2, isolada de uma amostra de água produzida em plataforma de petróleo, incubada por 15 dias nas condições de isolamento, foi caracterizada como bacilos curvos pequenos (Figura 5.12), com dimensões médias de 0,9 µm de comprimento e 0,2 µm de espessura. A reação tintorial de Gram permitiu classificá-los como Gram-negativos. Os bacilos não foram capazes de formar esporos após a exposição à altas temperaturas e a enzima desulfoviridina não foi constatada na cultura. Biofilmes foram detectados aderidos à superfície dos frascos de cultivo e suspensos no meio de cultura.

O ensaio fisiológico I da cultura SW2, foi realizado utilizando um inóculo com 15 dias de incubação. As respostas fisiológicas apresentadas pela cultura SW2 após 30 dias de incubação, não foram acompanhadas por exames microscópicos. Na Tabela 5.3 estão os resultados obtidos pela análise do escurecimento do meio de cultivo.

De acordo com as características fenotípicas apresentadas pela cultura SW2, pode-se classificá-la como pertencente ao um gênero de BRS oxidadores completos, capazes de utilizar sob condições marinhas, acetato como fonte de carbono e energia durante a redução do sulfato a sulfeto. Outros compostos como lactato, etanol, formiato, malato e H₂/CO₂ foram utilizados igualmente pela cultura SW2.

TABELA 5.3 - Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura SW2

Condição	Resultado
Lactato + SO ₄ ²⁻	+
Etanol + SO ₄ ²⁻	+
Formiato + SO ₄ ²⁻	+
Acetato + SO ₄ ²⁻	+
Malato + SO ₄ ²⁻	+
H ₂ /CO ₂ + SO ₄ ²⁻	+
37mM de SO ₄ ²⁻	
40mM de composto orgânico; H ₂ /CO ₂ (80/20%)	
+ com crescimento bacteriano - sem crescimento bacteriano	

A capacidade de formar esporos exclui a possibilidade da cultura ser próxima ao gênero *Desulfotomaculum*, assim como a ausência de desulfoviridina exclui o agrupamento no gênero *Desulfovibrio*. A característica halófila da cultura (2,3% de NaCl) é muito similar ao encontrado nos gêneros *Desulfobacterium* e *Desulfobacter*, da família Desulfobacteriaceae, no entanto, não há relatos de espécies de *Desulfobacter* que utilizam lactato e malato como fonte de carbono e energia. Sendo assim, as características obtidas com a cultura SW2, nos permite indicar a sua proximidade ao gênero *Desulfobacterium*, apesar de morfologicamente envolverem bacilos retos a células ovais, diferentes da morfologia obtida com a cultura SW2.

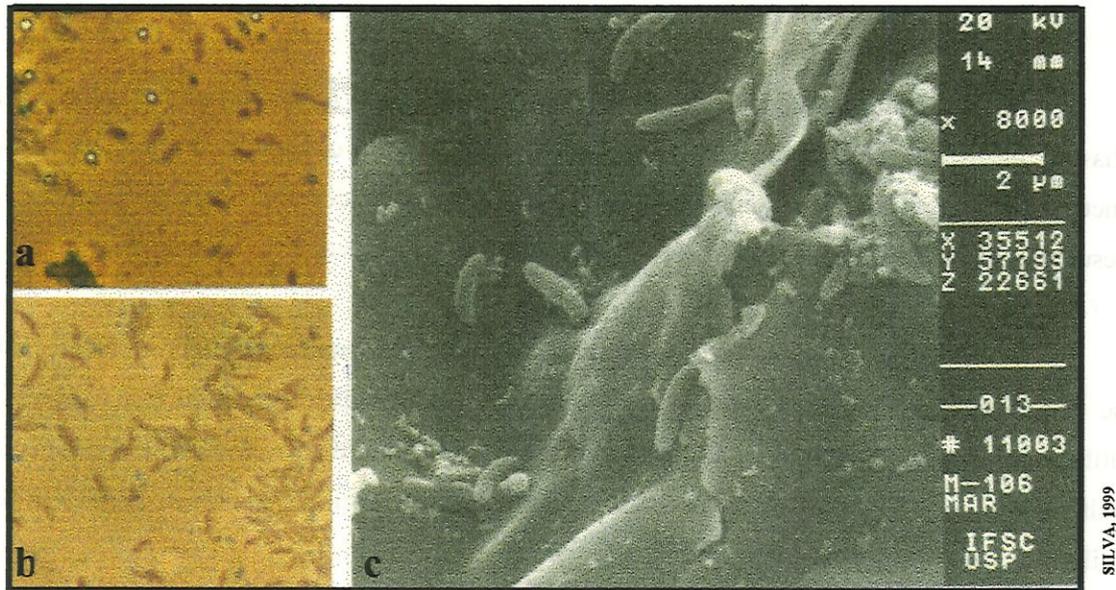


FIGURA 5.11 Bacilos curvos presentes na cultura FW1(a) sob condições não salinas; (b) e (c) sob condições salinas; (a, b observados sob microscopia de contraste de fase, ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto; c, observados sob MEV).

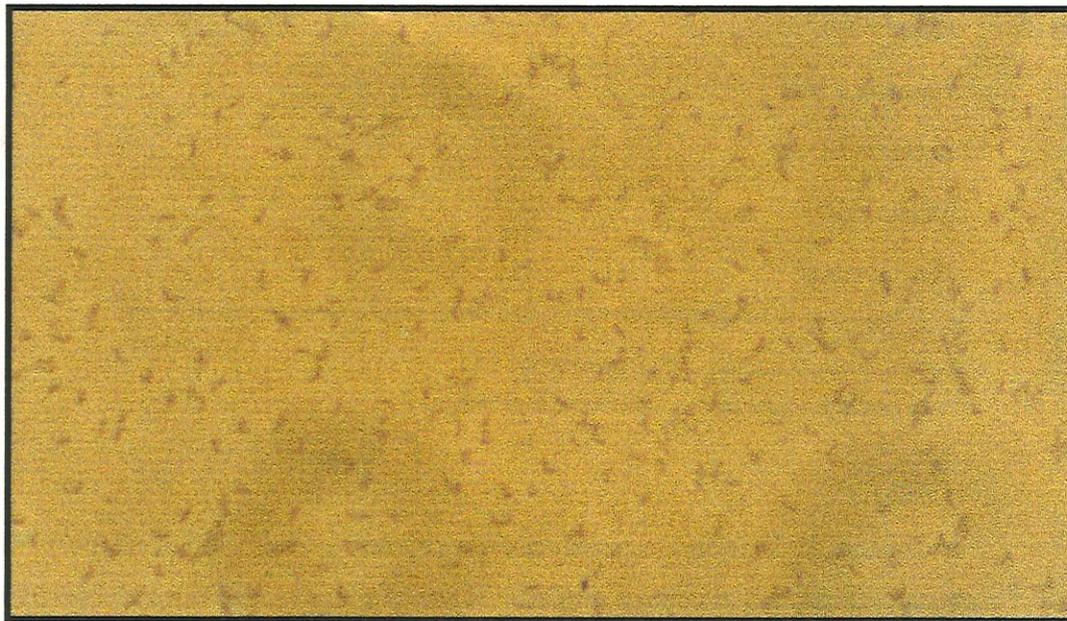


FIGURA 5.12 Bacilos curvos presentes na cultura SW2, observados sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).



É possível que os bacilos curvos pequenos, característicos da cultura SW2, estejam relacionados a um novo tipo morfológico dentro desse gênero. Não há relatos de que *Desulfobacterium* tenha envolvimento no processo corrosivo, porém suas espécies foram isoladas de sedimentos marinhos. A caracterização e classificação da cultura SW2 está apresentada na Tabela 5.4.

TABELA 5.4 – Características gerais e classificação da cultura SW2

Cultura	SW2
Origem	Amostra de água produzida em plataforma de petróleo
Morfologia	Bacilos curvos 0,9 x 0,2 µm
Reação de Gram	Gram-negativos
Esporos	Não formadores de esporos
Desulfovirdina	Não apresentam desulfovirdina
Salinidade	Isolamento sob condições marinhas (2,3% de NaCl)
Oxidação	Oxidação completa dos compostos orgânicos
Compostos orgânicos preferenciais	Lactato, Malato, Etanol, Formiato e Acetato na presença de sulfato
Possível classificação	<i>Desulfobacterium</i> sp

5.4.3 Cultura FW2

As células da cultura isolada FW2, originalmente de uma amostra de resíduo de corrosão, incubadas por 20 dias em meio P.E.m nas condições de isolamento, foram caracterizadas como bacilos curvos móveis, com dimensões médias de 1,6 µm de comprimento e 0,5 µm de espessura (Figura 5.13a), apesar de existirem alguns filamentos sésseis curtos e longos (5.14a). Macroscopicamente, foi observado a presença de biofilmes aderidos à superfície interna dos frascos de cultivo.

A técnica de coloração de Gram e KOH, aplicados para cultivos com 20 e 35 dias de incubação, não revelaram-se adequadas para auxiliar na caracterização celular pois não apresentaram resultados definidos. As células da cultura FW2, proveniente dos cultivos descritos acima, foram incapazes de formar esporos após o aumento gradual de temperatura. Em contato

com uma solução alcalina, colorações avermelhadas foram observadas em ambos os cultivos, características de resultado desulfoviridina positivo.

Utilizando um inóculo com 20 dias de incubação iniciou-se o ensaio de resposta fisiológica I, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.5. Na condição de isolamento, ou seja, em meio P.E.m preparado com água Milli-Q, a melhor resposta de crescimento ocorreu na presença de malato de sódio (40mM) e sulfato (10mM). Os substratos lactato de sódio e H₂/CO₂ proporcionaram pouco crescimento, enquanto que em acetato de sódio e formiato de sódio o crescimento não foi constatado. A incapacidade de utilizar acetato como fonte de carbono e energia indica que a cultura FW2 pertence a um gênero de BRS do grupo oxidador incompleto. A morfologia da cultura FW2, cultivada em malato de sódio, está apresentada na Figura 5.13b. Esta cultura apresentou bom crescimento quando cultivada em meio P.E.m com água do mar sintética. Biofilme também foi formado nesta condição.

TABELA 5.5 - Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura FW2

Condição	Resultado	Observação
Lactato + SO ₄ ²⁻	+	Presença de poucos bacilos curvos e poucos filamentos
Etanol + SO ₄ ²⁻	-	Não houve crescimento bacteriano
Formiato + SO ₄ ²⁻	-	Não houve crescimento bacteriano
Acetato + SO ₄ ²⁻	+/-	Raras células
Malato + SO ₄ ²⁻	+	Presença de bacilos curvos, bacilos com a extremidade afilada, mais concentrado do que a condição lactato
H ₂ /CO ₂ + SO ₄ ²⁻	+/-	Raros bacilos curvos
Condição marinha Lactato + SO ₄ ²⁻	+	Muitos bacilos curvos, às vezes aos pares

10mM de SO₄²⁻, exceto condição marinha 37mM
 40mM composto orgânico; H₂/CO₂ (80/20%)
 + com crescimento bacteriano - sem crescimento bacteriano +/- pouco crescimento

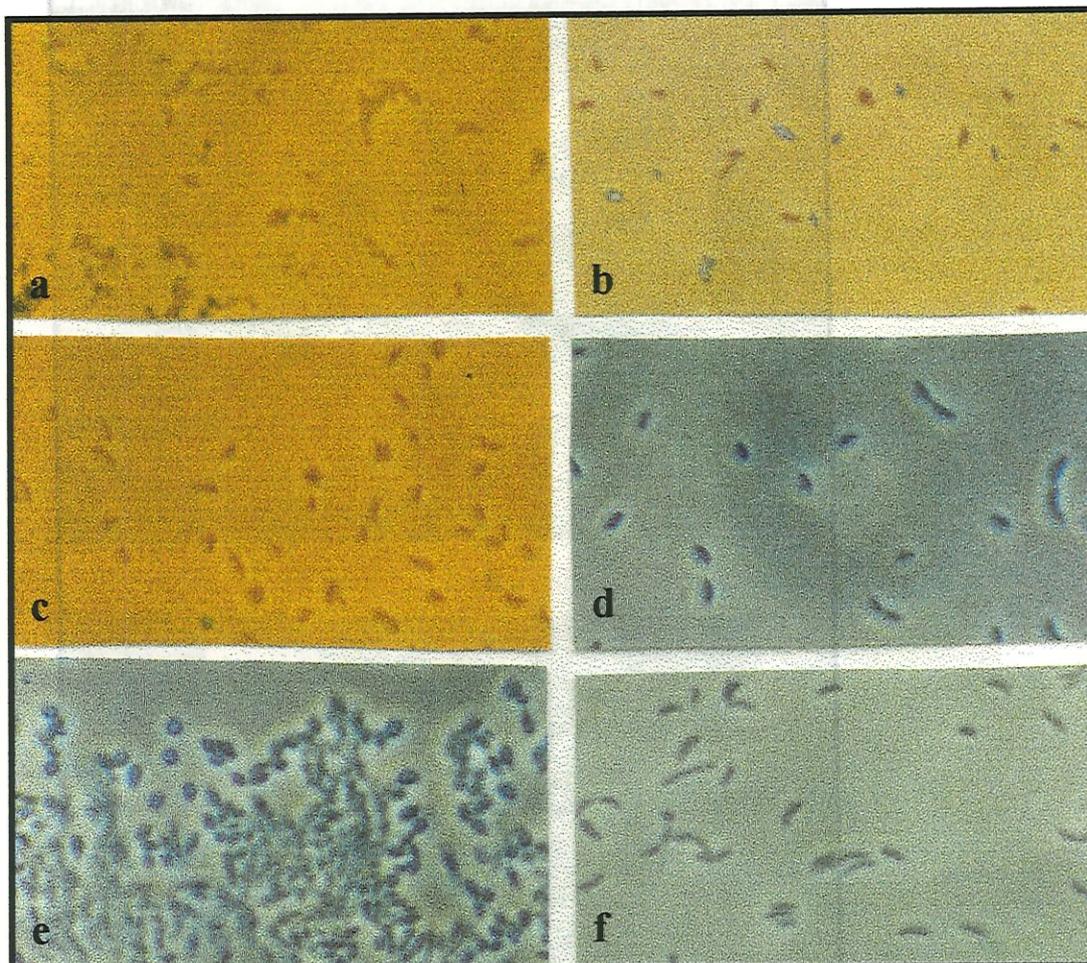


FIGURA 5.13 Diferenças morfológicas apresentadas pela cultura FW2, (a) cultivo sob condições não salinas em lactato, (b) cultivos sob condições não salinas em malato, (c) cultivo sob condições salinas em lactato, (d) cultivo sob condições salinas em sulfito, (e) cultivo sob condições salinas em tiosulfato, (f) cultivo sob condições salinas em 27mM de sulfato. Microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

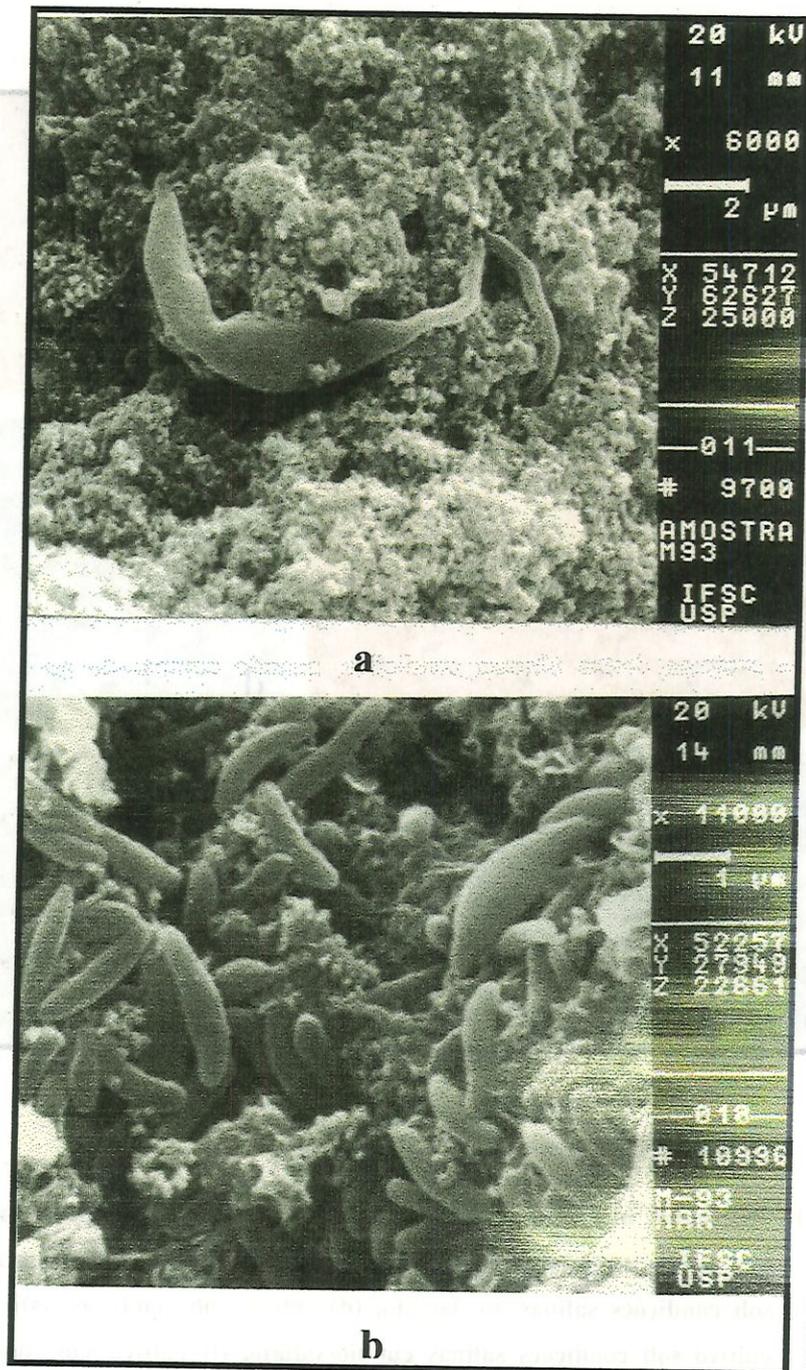


FIGURA 5.14 Diferença na morfologia celular verificada na cultura FW2, durante os cultivos na presença de sulfato e lactato; (a) cultivo em condições não salinas; (b) cultivo em condições salinas; (MEV).

A cultura FW2, após o cultivo por 27 dias em meio P.E.m em água do mar sintética, não apresentou filamentos, somente bacilos curvos com dimensões médias de 2,0 μm de comprimento e 0,5 μm de largura (Figuras 5.13c e 5.14b) foram vistos. O resultado da coloração de Gram, esporos e desulfoviridina foram os mesmos obtidos na condição não salina apresentados anteriormente.

Apesar de ter sido originada de resíduo de corrosão em oleodutos nos quais, provavelmente, utiliza-se fluxo de água de rios, a cultura FW2 apresentou bom crescimento sob condições salinas (2,3% de NaCl), podendo caracterizá-la como halotolerante ou levemente halófila.

O ensaio de resposta fisiológica II, que empregou a medida de concentração celular, foi realizado na condição de isolamento e em condições salinas, incubados a 30°C por 20 dias sob agitação constante de 175 rpm.

Na condição de isolamento (não salina), o ensaio iniciou-se com, aproximadamente, 10 mgSAB/L de inóculo, padronizado para as demais condições estudadas. Os valores médios obtidos nas diferentes fontes de carbono (desvios padrão inferiores a 10%) estão apresentados na Tabela 5.6, e indicaram, como constatado no ensaio de resposta fisiológica I, a preferência na utilização de malato (40mM), apresentando um valor médio de, aproximadamente, 115 mg SAB/L, valor este superior a segunda melhor condição lactato de sódio (20mM) com cerca de 94 mgSAB/L. Células pequenas e pouco crescimento ocorreu em etanol e formiato de sódio, 47 e 32 mgSAB/L, respectivamente. O valor médio obtido em acetato de sódio foi muito próximo ao obtido na condição controle (sem fonte de carbono), 19 e 18 mgSAB/L, respectivamente, indicando a incapacidade da cultura em utilizar este substrato. No entanto, o singelo aumento da concentração de proteína destas últimas condições, quando comparado ao valor do inóculo inicial (~10 mgSAB/L), pode ser explicada pela utilização do substrato residual, do cultivo que antecedeu o ensaio, introduzido juntamente com o inóculo.

Cabe informar que, os cultivos que antecederam a realização deste ensaio foram incubados com 40 mM de malato, e por isso esta concentração foi mantida. A concentração aplicada aos demais substratos orgânicos foram menores (20mM), a fim de evitar o

comprometimento do crescimento por altas concentrações de substrato. Isto posto, é possível que o valor médio de proteína total obtido para a condição malato de sódio (~115 mgSAB/L) maior que para as demais condições, seja em virtude da concentração aplicada. Usualmente, são empregados concentrações de substratos orgânicos de 10 ou 20mM para 10mM de sulfato (LAANBROEK e PFENNIG, 1981; DALSGAARD e BAK, 1994).

TABELA 5.6 – Respostas de crescimento da cultura FW2 sob condições não salinas. Conteúdo inicial de proteína igual a 10,12 mgSAB/L

CONDIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (mgSAB/L)			
	Frasco1	Frasco2	Média	Desvio padrão
Substratos orgânicos¹				
Malato (40mM)	113,30	116,0	114,65	± 1,35
Lactato (20mM)	91,73	95,62	93,67	± 1,94
Etanol (20mM)	45,19	49,24	47,21	± 2,02
Formiato (20mM)	31,03	32,38	31,70	± 0,66
Acetato (20mM)	17,54	20,24	18,89	± 1,35
Sem fonte de carbono	16,19	18,89	17,54	± 1,35
Malato (40mM) a 55°C	18,89	20,24	19,56	± 0,67
Substratos inorgânicos²				
Sulfato (10mM)	113,30	116,0	114,65	± 1,35
Tiosulfato (10mM)	105,89	107,9	106,89	± 1,00
Sulfito (10mM)	53,96	55,31	54,63	± 0,67
Sem acceptor final	16,19	17,54	16,86	± 0,67
Nitrato (10mM)	12,82	14,85	13,83	± 1,00

¹na presença de 10 mM de sulfato

²na presença de 40 mM de malato

Os resultados médios do crescimento celular (desvios padrão inferiores a 10%) da cultura FW2, obtidos nos testes com outros aceptores finais de elétrons sob condições não salinas, em meio contendo 40mM de malato de sódio e após 20 dias de incubação, estão também relacionados na Tabela 5.6. O valor médio final de proteína em meio com tiosulfato, 106,89

mgSAB/L, foi bastante próximo ao encontrado em meio de cultivo contendo o íon sulfato como acceptor final de elétrons, da ordem de 114,69 mgSAB/L. Em meio contendo sulfito, o cultivo celular apresentou em média 54,63 mgSAB/L, cerca da metade da proteína final determinada para os meios com o tiosulfato ou sulfato. Considerando que o valor inicial de proteína foi cerca de 10 mgSAB/L, foram baixos os valores médios de proteína final determinados para o meio de cultivo com nitrato e o controle (sem acceptor final de elétrons).

Os frascos para o teste das fontes orgânicas e aceptores finais de elétrons preferenciais das células FW2, sob condições salinas, foram todos inoculados com uma massa celular contendo aproximadamente 22 mgSAB/L. Os valores médios finais de proteína (desvio padrão, em sua maioria, inferior a 10%), após 20 dias de incubação foram de 79,49; 52,48; 33,85; 32,39 mgSAB/L para meios contendo malato de sódio, lactato de sódio, formiato de sódio e etanol, respectivamente (Tabela 5.7). O frasco controle não apresentou crescimento celular, como verificado pela quantidade de proteína determinada e ligeiramente inferior a quantidade inoculada, 15,24 mgSAB/L. A preferência pelo substrato orgânico não diferiu daquela verificada sob condições de isolamento (não salina), ou seja, as células de BRS FW2 se desenvolveram bem em malato de sódio, seguido pelo lactato de sódio. A quantidade de sulfato de sódio no meio, em todas as condições discutidas acima, foi igual àquela em geral encontrada na água do mar, 37 mM.

A razão pela qual utilizou-se 40mM de lactato de sódio e 20mM para os demais compostos, foi a mesma discutida no ensaio sob condições não salinas. Contudo, o valor de proteína foi maior no substrato com concentração menor, no caso do malato de sódio (20mM), cujo valor médio foi de 79,49 mgSAB/L, superior à condição lactato de sódio (40mM), com valor médio de 52,48 mgSAB/L.

Os valores médios de proteína final total (desvio padrão, em sua maioria, inferior a 10%) resultantes dos ensaios com a cultura FW2 cultivada em diferentes aceptores de elétrons sob condições salinas, com 27mM de sulfato e 40mM de lactato como fonte de carbono, estão apresentados na Tabela 5.7. A interpretação dos resultados desse teste deve levar em conta que, devido a não retirada do sulfato da água do mar sintética, geralmente encontrado em concentrações elevadas em ambiente marinho, é provável que o crescimento celular deva-se apenas a presença desse íon.

Pode-se inferir que os resultados encontrados revelaram que a cultura FW2 cresceu na presença de todos os compostos inorgânicos testados, no entanto, a ocorrência de alterações morfológicas foi evidenciada nos cultivos com sulfito e tiosulfato, como pode ser visto nas Figuras 5.13d e 5.13e, contudo, não é possível afirmar sobre um possível efeito negativo às células pela presença desses dois compostos inorgânicos. A Tabela 5.7 mostra que o cultivo em sulfato nas duas concentrações, 27 e 37 mM não resultou em diferentes quantidades de proteína total, porém microscopicamente as células foram maiores a 27 mM de sulfato. Os exames microscópicos foram realizados após 20 dias de incubação.

Não se sabe ao certo qual a razão das células cultivadas em 27 mM de sulfato serem morfológicamente maiores (Figura 5.13f) daquelas cultivadas em meio contendo 37mM de sulfato (Figura 5.13c). A redução na concentração da ordem de 10mM de sulfato favoreceu, sob o ponto de vista morfológico, o crescimento da cultura FW2.

Finalmente, em relação aos testes da cultura FW2 realizados com diferentes aceptores finais de elétrons, pode-se afirmar que sob condições não salinas a preferência das células foi pelos compostos inorgânicos sulfato e tiosulfato, na presença do malato de sódio. Essa característica auxilia na classificação da cultura, assim como a resposta negativa de crescimento em nitrato. Os resultados do cultivo sob condições salinas, nesse caso, não seriam relevantes, considerando-se a origem da amostra, bem como a não retirada do sulfato do meio durante os experimentos.

A cultura quando cultivada em lactato de sódio (40mM) e sulfato (10mM), com um inóculo inicial de, aproximadamente 10 mgSAB/L, sob temperatura de 55°C, apresentou um valor médio de proteína celular cerca de 20 mgSAB/L, relativamente inferior ao obtido com o cultivo a 30°C, (~115 mgSAB/L), indicando a preferência por temperaturas mesófilas. Sob condições marinhas, e com um valor inicial de 21 mgSAB/L, a cultura FW2 também se desenvolveu melhor sob temperatura mesófilas, apresentado valores médios cerca de 60 mgSAB/L a 30°C e de 21,44 mgSAB/L a 55°C.

TABELA 5.7 – Respostas de crescimento da cultura FW2 sob condições salinas. Conteúdo inicial de proteína igual a 21,81 mgSAB/L

CONDIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (mgSAB/L)			
	Frasco1	Frasco2	Média	Desvio padrão
Substratos orgânicos¹				
Malato (20mM)	75,11	83,87	79,49	± 4,38
Lactato (40mM)	51,75	53,21	52,48	± 0,72
Formiato (20mM)	32,03	35,68	33,85	± 1,82
Etanol (20mM)	29,11	35,68	32,39	± 3,28
Acetato (20mM)	18,16	20,35	19,25	± 1,10
Sem fonte de carbono	14,51	15,97	15,24	± 0,72
Lactato (40mM) a 55°C	18,16	24,73	21,44	± 3,28
Substratos inorgânicos²				
Nitrato (10mM)	66,77	71,50	69,13	± 2,36
Sulfato	66,35	69,27	67,81	± 1,46
Tiosulfato (10mM)	54,63	60,03	57,33	± 2,70
Sulfato (a)	51,75	53,21	52,48	± 0,72
Sulfito (10mM)	47,22	55,31	51,26	± 4,04
Com FeCl ₂	66,35	69,27	67,81	± 1,46
Sem FeCl ₂	10,13	12,32	11,22	± 1,10

¹na presença de 10 mM de sulfato

²na presença de 40 mM de malato e 27mM de sulfato; exceto em (a) 37 mM de sulfato

Sabe-se que o ferro é um constituinte indispensável para a formação de algumas enzimas, como as hidrogenases, e que sua ausência poderia provocar baixos valores de crescimento. Os estudos sobre a influência do íon ferro no crescimento celular foram realizados sob condições salinas, na concentração de 1,8 mM de cloreto ferroso, com valor proteína inicial da ordem de 21 mgSAB/L. Revelaram que o conteúdo médio (desvio padrão inferior a 10%) final de proteína foi de aproximadamente 11,22 e 67,81 mgSAB/L, respectivamente na ausência e na presença do composto (Tabela 5.7). Estes valores mostram que o crescimento celular na presença de 27 mM de sulfato e 40 mM de lactato de sódio foi afetado pela ausência do cloreto ferroso, havendo diminuição na quantidade de proteína no final do tempo de incubação, 20 dias, quando o ferro fo suprimido do meio.

Após os constantes exames microscópicos foi possível inferir que alguns formatos celulares encontrado, inicialmente relacionados como contaminantes da cultura, eram alterações da morfologia dos bacilos curvos, provavelmente como resposta a alguma condição não ideal de crescimento. O existência de pleomorfismo nas condições de isolamento pode ser explicado pela baixa concentração de íons essenciais como Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , e Mg^{2+} (1,28; 0,53; 1,27 e 0,22 g/L, respectivamente), presentes em maior quantidade na água do mar sintética (11,94; 1,06; 18 e 1,50 g/L, respectivamente).

A importância de alguns sais para as BRS pode ser exemplificada pela atividade da enzima malato desidrogenase dependente de cátions divalentes Mn^{2+} ou Mg^{2+} , bem como é estimulada por íons K^+ (KREMER *et al.*, 1992). No entanto, as condições de cultivo em água do mar aumentam em muito a presença desses íons, indicando que a atividade enzimática da FW2 pode não apenas ter sido estimulada, mas adequada às suas melhores condições. Outra fundamental importância de certos íons relaciona-se ao transporte de sulfato. Sabe-se que culturas em meio com alta concentração de sulfato realizam importação de sulfato utilizando 2 íons Na^+ (HANSEN, 1994), enquanto que sob baixas concentrações, a importação é realizada pela presença de 3 prótons (WIDDEL e HANSEN, 1992; HANSEN, 1994).

O pleomorfismo é considerado um aspecto comum das BRS, como observado nos gêneros oxidadores incompletos *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (WIDDEL e PFENNIG, 1984). Muitas vezes, é relacionado ao acúmulo de H_2S no meio ou mesmo por altas concentrações de compostos doadores de elétrons ou de sais minerais (POSTGATE, 1979; PFENNIG e WIDDEL, 1981). Estequiometricamente, a relação lactato/sulfato ideal para o crescimento de BRS é de 0,6 (observada pela reação apresentada na Tabela 3.6), e uma possível causa do pleomorfismo da cultura FW2, poderia ser também relacionada a relação empregada nas condições de isolamento. A concentração do doador de elétrons foi utilizada em excesso na condição de isolamento não salina em relação ao sulfato (acceptor de elétrons), ou seja, de valor igual a 4, diferentemente da condição salina que foi aproximadamente 1.

Para fins de classificação, as características fenotípicas como a morfologia de bacilos curvos e a existência da desulfovirdina, apresentadas pela cultura FW2, sugerem a sua inclusão no gênero *Desulfovibrio*. As sulfato redutoras desulfovirdina positiva não pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* são espécies de *Desulfococcus*, *Desulfomonile* sp, *Desulfonema limicola*

(WIDDEL e HANSEN, 1992) e *Desulfomonas* sp. No entanto as demais características como morfologia e motilidade da cultura FW2, suportaram a sua classificação no gênero *Desulfovibrio*.

Os resultados não conclusivos das células FW2 submetidas ao método de coloração de Gram podem ser comuns. POSTGATE (1979) e WIDDEL (1988) relataram que o gênero *Desulfotomaculum*, formador de esporos e com crescimento celular a 55°C, também não apresenta resposta a essa técnica de coloração celular. As principais características que distanciaram a cultura FW2 do gênero *Desulfotomaculum* foram: presença de desulfovirdina, não formação de esporos e lento crescimento a 55°C.

A boa resposta sob condições salinas, salinidade de 2,3%, permite classificar a cultura FW2 como halófila (OLLIVIER *et al.*, 1994). Contudo, a cultura FW2 também é capaz de crescer em meio equivalente a água doce (salinidade de 0,2%). Neste sentido, as espécies de *Desulfovibrio* que mais se aproximam da cultura isolada são. *D. desulfuricans*, *D. salexigens*, *D. halophilus* e *D. giganteus*. Segundo PANKHURST (1971), *D. desulfuricans* e *D. vulgaris* se adaptam rapidamente na ausência e na presença de NaCl, exceto *Desulfovibrio desulfuricans* subsp *aestuarii* que não cresce em meio com água destilada (LAANBROEK e PFENNIG, 1981).

No que se refere aos substratos orgânicos, a preferência por malato e lactato reforçam a proximidade da cultura FW2 com as espécies *D. desulfuricans* e *D. salexigens*, contudo, a utilização de tiosulfato e sulfito sugere a inclusão da cultura FW2 na espécie *D. desulfuricans*. Não há referências literárias que confirmem que *D. salexigens* pode utilizar outros compostos inorgânicos como acceptor final de elétrons.

Além das características morfológicas e fisiológicas que assemelham a cultura FW2 à espécie *Desulfovibrio desulfuricans*, o isolamento a partir de resíduos de corrosão indica o seu envolvimento no processo corrosivo, assim como relatado na literatura por OKABE *et al.* (1992), LEE e CHARACKLIS (1993) e FONSECA *et al.* (1996), para esta espécie. A capacidade de formar biofilmes reforçam ainda mais a sua participação na corrosão.

A Tabela 5.8 reúne as características da cultura FW2, bem como apresenta a sua classificação entre as BRS conhecidas.

TABELA 5.8 – Características gerais e classificação da cultura FW2

Cultura	FW2
Origem	Amostra de resíduo de corrosão
Morfologia	Bacilos curvos 1,6 x 0,5 µm
Reação de Gram	Variável
Esporos	Não formadores de esporos
Desulfovirdina	Apresentam desulfovirdina
Crescimento a 55°C	Ausente
Salinidade	Bom crescimento a 2,3% de NaCl
Oxidação	Oxidação incompleta dos compostos orgânicos
Compostos orgânicos preferenciais	Malato e Lactato na presença de sulfato
Outros compostos aceptores finais de elétrons	Tiosulfato e Sulfito
Possível classificação	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>

5.4.4 Cultura SW1

A cultura SW1, isolada de amostra de água do mar produzida em plataforma de petróleo, apresentou bacilos curvos móveis, com aproximadamente 2,5 µm de comprimento e 0,4 µm de diâmetro (Figura 5.15). Os resultados da coloração de Gram e KOH confirmam a cultura como pertencentes ao grupo dos microrganismos Gram-negativos. Observações microscópicas não evidenciaram esporos após a exposição da cultura a um gradual aumento de temperatura. O contato das células com a solução alcalina NaOH revelou, sob microscopia comum, a presença da bisulfite redutase desulfovirdina, devido à reação desta solução com o pigmento da enzima, produzindo uma coloração avermelhada. Essas características foram obtidas a partir de um cultivo de 15 dias de incubação.

Foi observado durante os cultivos da cultura SW1, a formação de biofilmes aderidos à superfície interna dos frascos de cultivo. O isolamento sob condições marinhas, com 2,3% de salinidade, permite classificá-la como uma espécie halófila.

Na Tabela 5.9 são apresentados os resultados de crescimento celular da cultura SW1, ensaio I, nos quais foi utilizado como inóculo uma cultura mantida a 37 dias de incubação, em meio P.E.m. O melhor crescimento ocorreu em lactato de sódio (40mM) e malato de sódio (40mM), ambos com 37mM de sulfato. Em etanol (40mM), formiato de sódio (40mM) e sob atmosfera de H₂/CO₂ (80/20%) a massa celular foi menor quando comparada com as condições lactato e malato de sódio. Esta cultura não apresentou crescimento em acetato de sódio.

O ensaio II sobre as condições de crescimento da cultura SW1 foi iniciado com um inóculo aproximadamente a 12 mgSAB/L. As respostas fisiológicas da cultura SW1 em relação aos compostos orgânicos utilizados como fonte de carbono e energia foi a mesma obtida no ensaio I, ou seja, melhor crescimento ocorreu na condição com lactato de sódio (40mM), cujo valor médio de proteína celular foi de 92 mgSAB/L (desvio padrão inferior a 2%), seguida pelo crescimento em malato de sódio (20mM), com em média 81 mgSAB/L (desvio padrão inferior a 3%). O cultivo em formiato de sódio resultou no valor médio de 42,82 mgSAB/L (desvio padrão inferior a 6%). O valor absoluto do crescimento em etanol foi aproximadamente 27 mgSAB/L, revelando baixo crescimento celular. A cultura foi incapaz de crescer em acetato de sódio como fonte de carbono e energia, indicando um possível gênero do grupo das BRS oxidadoras incompletas. Estes resultados estão demonstrados na Tabela 5.10.

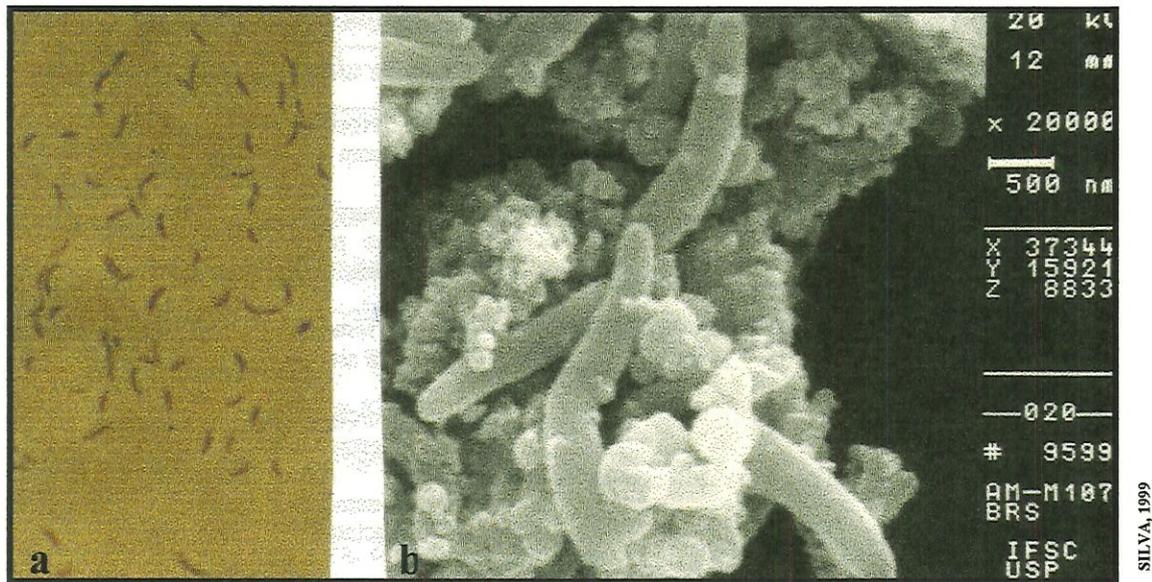


FIGURA 5.15 Bacilos curvos presentes na cultura SW1, observados sob (a) microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto) e (b) MEV.

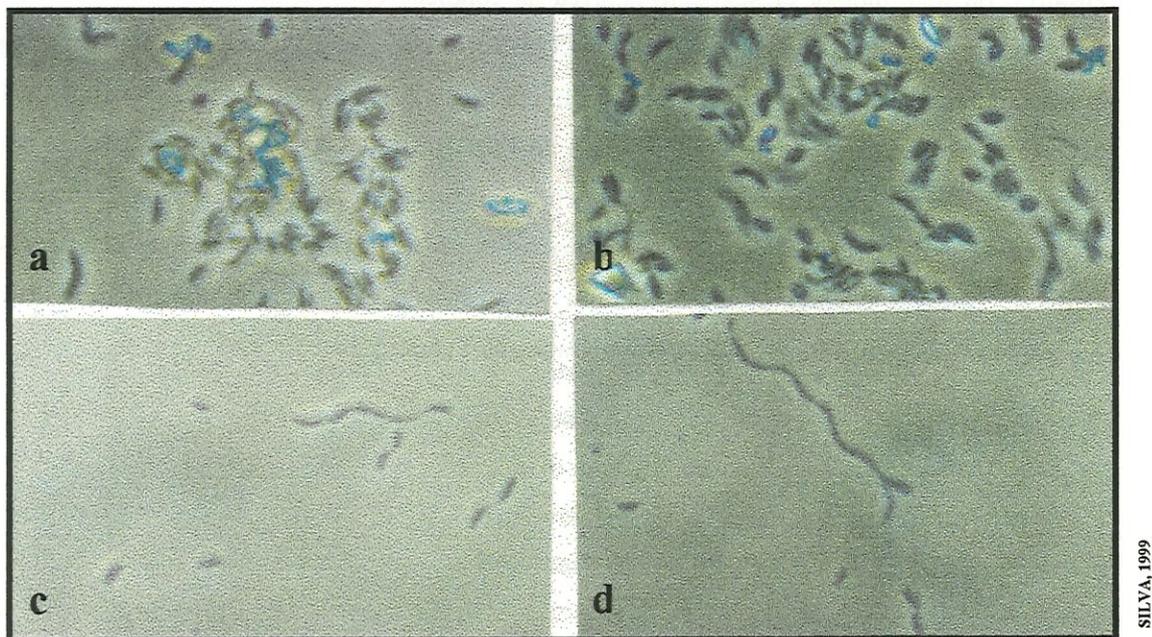


FIGURA 5.16 Diferença morfológica apresentada pela cultura SW1; (a) tiosulfato e (b) sulfito, ambos na presença de 27 mM de sulfato c) e d) formação de um filamento na ausência de ferro; todas observadas sob microscopia de contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

TABELA 5.9 – Resultados do ensaio de resposta fisiológica I para a cultura SW1

Condição	Resultado	Observação
Lactato + SO ₄ ²⁻	+	Bacilos curvos, as vezes aos pares, numerosos, com movimento serpentiforme
Etanol + SO ₄ ²⁻	+	Bacilos curvos com movimento serpentiforme porém em menor número, presença de bacilos curvos menores
Formiato + SO ₄ ²⁻	+	Morfologia semelhante ao encontrado em etanol, porém ainda mais escassa
Acetato + SO ₄ ²⁻	-	Não houve crescimento bacteriano, após 8 dias o meio estava oxidado
Malato + SO ₄ ²⁻	+	Morfologia semelhante ao encontrado na condição Lactato, mesma concentração de células
H ₂ /CO ₂ + SO ₄ ²⁻	+	Bacilos curvos com movimento serpentiforme, alguns com estrutura brilhante interna, baixa concentração celular

37mM de SO₄²⁻
40mM de composto orgânico; H₂/CO₂ (80/20%)
+ com crescimento bacteriano - sem crescimento bacteriano

A Tabela 5.10 mostra também que o crescimento celular ocorreu em todos os aceptores de elétrons, nitrato, sulfito, tiosulfato de sódio, bem como em sulfato de sódio nas duas concentrações estudadas (27 e 37 mM). Os valores médios (desvio padrão inferior a 5%) foram de 99,14 mgSAB/L para nitrato, 97,79 mgSAB/L para sulfito, 92,40 mgSAB/L para sulfato (37mM), 96,45 mgSAB/L para sulfato (27mM) e 81,61 mgSAB/L para tiosulfato, após 20 dias de incubação. Exames microscópicos revelaram que na presença de tiosulfato e sulfito nos meios de cultivo, aumento no tamanho das células, como pode ser visto nas Figuras 5.16a, 5.16b. Apesar da capacidade oxidante do nitrato, não houve alteração morfológica nessa condição, os valores de proteína final total indicaram que em nitrato o crescimento da cultura foi ligeiramente maior.

Contudo, este ensaio foi realizado na presença de 27 mM de sulfato, quantidade constituinte da água do mar sintética. Com isso, a sua interpretação deve levar em conta a possibilidade do crescimento nos diferentes compostos inorgânicos, ter ocorrido pela utilização do sulfato presente no meio. As respostas obtidas nos diferentes compostos inorgânicos pode ter ocorrido em função do uso do sulfato.

Foi observado que o valor médio de proteína celular em condição de ausência de ferro, 45,19 mgSAB/L (desvio padrão inferior a 10%) foi baixo em relação ao meio contendo 1,8 mM de cloreto ferroso, cujo valor médio foi de 96,45 mgSAB/L (desvio padrão inferior a 5%, como pode ser observado na Tabela 5.10. Além de apresentar uma baixa concentração de células, o que correspondeu a 53% de decréscimo do crescimento na ausência de ferro, foram observadas alterações morfológicas nessa condição. Exames microscópicos revelaram que os filamentos formados nesta condição iniciam-se como associações de bacilos curvos até constituírem uma cadeia única, como pode ser visto na Figura 5.16c e 5.16d. De fato, espécies de *Desulfovibrio* são sensíveis à limitação de ferro (POSTGATE, 1979), uma vez que este íon é um constituinte indispensável de algumas enzimas.

As respostas obtidas nas duas concentrações de sulfato indicam que o crescimento desta cultura independe da concentração de sulfato, já que os valores de proteína, bem como a morfologia, foram similares tanto a 27mM quanto a 37mM. SMITH e KLUG (1981b) comentam que, em ambiente marinhos naturais com concentrações de sulfato acima de 10mM, as taxas de redução de sulfato são independentes da sua concentração.

Comparando-se as respostas de crescimento da cultura SW1 cultivada sob temperatura de 55°C e 30°C, foi possível inferir que trata-se de uma cultura mesofílica. O valor médio de proteína total a 55°C foi de 19,21 mgSAB/L, enquanto que a 30°C foi de 83,63 mgSAB/L, ambos partindo de um valor inicial médio de proteína de 12,15 mgSAB/L.

Através dos resultados dos exames microscópicos, foi possível indicar a cultura SW1 como pertencente ao gênero *Desulfovibrio* (POSTGATE, 1979; WIDDEL e PFENNIG, 1984; WIDDEL e BAK, 1992). A morfologia de bacilo curvo, motilidade e presença de desulfoviridina permitiram diferenciar esta cultura dos gêneros *Desulfomonas*, *Desulfobacter*,

Desulfococcus, *Desulfobulbus* e *Desulfosarcina*, enquanto que a não resistência ao calor, diferenciar do gênero *Desulfotomaculum* (WIDDEL e PFENNIG, 1984).

TABELA 5.10 – Respostas de crescimento da cultura SW1, cultivada na condição de isolamento (sob condições salinas). Conteúdo inicial de proteína igual a 12,15 mgSAB/L

CONDIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (mgSAB/L)			
	Frasco1	Frasco2	Média	Desvio padrão
Substratos orgânicos¹				
Lactato (40mM)	91,05	93,75	92,40	± 1,35
Malato (20mM)	79,59	82,96	81,27	± 1,69
Formiato (20mM)	41,15	44,52	42,82	± 1,70
Etanol (20mM)	24,96	26,98	25,97	± 1,01
Acetato (20mM)	11,47	12,82	12,14	± 0,68
Lactato (40mM) 55°C	17,52	20,91	19,21	± 1,69
Substratos inorgânicos²				
Nitrato (10mM)	97,80	100,49	99,14	± 1,35
Sulfito (10mM)	96,45	99,14	97,79	± 1,35
Sulfato	93,75	99,15	96,45	± 2,70
Sulfato (a)	91,05	93,75	92,40	± 1,35
Tiosulfato (10mM)	80,26	82,96	81,61	± 1,35
Com FeCl ₂	93,75	99,15	96,45	± 2,7
Sem FeCl ₂	42,50	47,89	45,19	± 2,7

¹na presença de 37 mM de sulfato

²na presença de 40mM de lactato e 27 mM de sulfato; exceto em (a) 37 mM de sulfato

As respostas fisiológicas apresentadas pela cultura SW1, referente à fonte de carbono utilizada, não deixam dúvidas quanto a sua classificação dentro do gênero *Desulfovibrio*, principalmente pela preferência no uso de lactato e malato, excelentes substratos para o cultivo deste gênero; bem como pela incapacidade de crescer em acetato de sódio (WIDDEL e BAK, 1992) e lento crescimento em etanol (POSTGATE, 1979; HANSEN, 1994).

Estas respostas, em adição ao crescimento com 2,3% de NaCl, permitiram indicar a proximidade da cultura SW1 com as espécies *D. salexigens* e *D. desulfuricans* subsp. *aestuarii*. Além disso, há evidências de que estas duas espécies estejam relacionadas ao processo corrosivo, principalmente na presença de água do mar (CZECHOWSKI *et al.*, 1990; OKABE *et al.*, 1992; LEE e CHARACKLIS, 1993; FONSECA *et al.*, 1996).

Desulfovibrio desulfuricans pode utilizar sulfito e tiosulfato. A redução do nitrato à amônia por *Desulfovibrio desulfuricans*, segundo STEENKAMP e PECK *apud* McCREADY *et al.* (1983) só ocorre se sulfato esta presente em baixas concentrações; na ausência de sulfato ou mesmo em concentrações maiores que 35 mM não há redução de nitrato, o que pode ter ocorrido com a cultura SW1.

A Tabela 5.11 apresenta as características da cultura isolada SW1 as quais indicaram a sua proximidade das espécies *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio salexigens*.

TABELA 5.11 – Características gerais e classificação da cultura SW1

Cultura	SW1
Origem	Amostra de água do mar produzida em plataforma de petróleo
Morfologia	Bacilos curvos 2,5 x 0,4 µm
Reação de Gram	Gram-negativos
Esporos	Não formadores de esporos
Desulfovirdina	Apresentam desulfovirdina
Crescimento a 55°C	Ausente
Salinidade	Isolamento sob condições marinhas (2,3% de NaCl)
Oxidação	Oxidação incompleta dos compostos orgânicos
Compostos orgânicos preferenciais	Lactato e Malato na presença de sulfato
Possível classificação	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ou <i>Desulfovibrio salexigens</i>

5.5. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA CULTURA SW1 SOB CONDIÇÕES SALINAS

Foram realizados ensaios de crescimento com a cultura isolada SW1, identificada neste trabalho como uma linhagem do gênero *Desulfovibrio*. O acompanhamento do crescimento foi feito através de análises periódicas de proteínas, sulfatos, sulfetos, ácidos láctico e acético, em um período de 23 dias.

Os parâmetros para avaliação do crescimento celular foram escolhidos com base no metabolismo das BRS pertencentes ao gênero *Desulfovibrio*, uma vez que a cultura SW1 foi previamente classificada no referido gênero. O lactato de sódio é a fonte de carbono oxidada a acetato, uma vez que trata-se de um gênero de BRS oxidador incompleto, e o sulfato é utilizado como acceptor preferencial de elétrons durante a redução desassimilativa do íon sulfato a sulfeto. A determinação de proteína foi escolhida como método analítico do crescimento da massa bacteriana.

O inóculo da cultura SW1 foi previamente cultivado nas mesmas condições do ensaio de crescimento, com 20 dias de incubação. As alíquotas a serem inoculadas foram retiradas do meio nesse período, pois, supôs-se que a cultura encontrava-se na fase exponencial de crescimento. O meio inoculado com amostras na fase exponencial pode reduzir ou evitar o período de adaptação (fase lag) da cultura. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em solução salina (0,9% de solução fisiológica). Este procedimento foi similar ao aplicado por VARESCHE (1995) e SONNE-HANSEN *et al.* (1999).

Os ensaios foram realizados em duplicata, com agitação de 200 rpm e sem agitação, a 30°C. Os valores de μ_{\max} foram determinados a partir do coeficiente angular da reta equivalente a fase exponencial de crescimento, obtida pela determinação do \ln da concentração de proteína em função do tempo. Os valores de tempo de geração foram obtidos pela equação 3.1. As velocidades de consumo de substrato orgânico (ácido láctico) e do acceptor final de elétrons (sulfato), bem como da produção de sulfeto e ácido acético, foram obtidas a partir da divisão das velocidades pela concentração de proteína nos tempos correspondentes.

5.5.1 Valores de velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração da cultura SW1

A Tabela 5.12 apresenta os valores médios das concentrações de proteína total nos frascos incubados sem agitação. A curva de crescimento está apresentada na Figura 5.17. Os dados mostram que o ensaio partiu com um valor médio de inóculo de 5,41 mgSAB/L, atingindo 37,75 mgSAB/L ao final do experimento. O intervalo considerado como a fase exponencial de crescimento foi de 4 a 18 dias, e o valor de μ_{\max} calculado foi de $0,13 \text{ d}^{-1}$, com o Tg igual a 5,33 d.

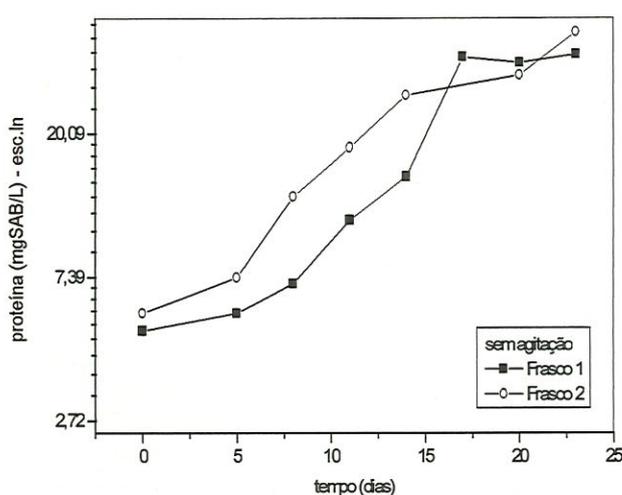
A Tabela 5.13 apresenta os valores médios de proteína total obtidos com os frascos incubados sob agitação. O valor médio de proteína que correspondeu ao inóculo inicial foi de 5,08 mgSAB/L, atingindo 45,7 mgSAB/L após o período de incubação. O valor de μ_{\max} foi de $0,28 \text{ d}^{-1}$ e o Tg foi 2,47 d, determinados na fase exponencial considerada no intervalo entre 2 e 8 dias. A curva de crescimento está apresentada na Figura 5.18.

Pela análise das curvas de crescimento observa-se que os frascos sem agitação apresentaram uma maior fase de adaptação em relação ao ensaio realizado com agitação dos frascos. A fase exponencial dos ensaios sob agitação ocorreu em intervalo de tempo menor, porém, ao final do ensaio os valores de proteína total em ambos os cultivos foram semelhantes. Observa-se que a agitação contribuiu para acelerar a fase exponencial de crescimento. A agitação resultou em um aumento de aproximadamente 20% na concentração final de proteína em relação ao ensaio sem agitação.

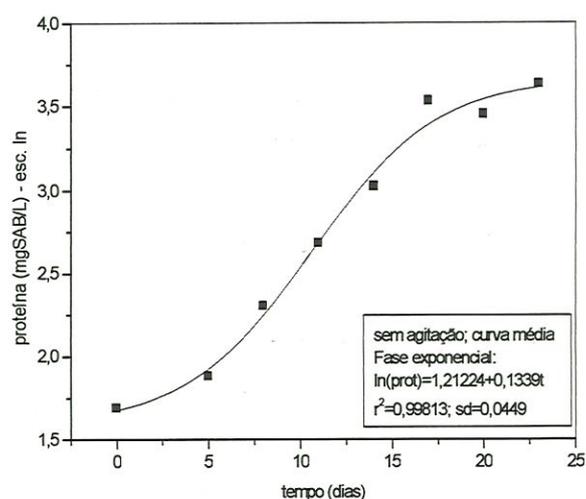
Ao comparar-se os valores de μ_{\max} e Tg obtidos com os valores apresentados na Tabela 3.8, observa-se que a cultura SW1 é bem mais lenta que as demais BRS descritas na literatura, contudo esta comparação deve considerar as condições de cultivo para cada estudo. Dentre as espécies de *Desulfovibrio* apresentadas na Tabela, apenas duas culturas de *D. desulfuricans* (OKABE *et al.*, 1992) foram cultivadas com lactato e sulfato, sob temperatura mesófila, mas em sistema contínuo. Nestas condições apresentaram valores de μ_{\max} entre 0,35-0,55 h^{-1} , o que correspondeu a 8,4-13,2 d^{-1} . Esses valores indicam que as duas culturas cresceram muito mais rápido que a cultura SW1, estudada neste trabalho (0,13-0,28 d^{-1}).

TABELA 5.12 - Valores da concentração de proteína total (mgSAB/L) em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sem agitação

Tempo (d)	Concentração de		Concentração de proteína total média (mgSAB/L)	Desvio padrão
	Proteína total			
	(mgSAB/L) Frasco 1	(mgSAB/L) Frasco 2		
0	5,08	5,74	5,41	± 0,30
5	5,74	7,38	6,56	± 0,82
8	7,06	13,0	10,0	± 2,95
11	11,02	18,28	14,56	± 3,63
14	14,98	26,20	20,6	± 5,62
17	34,12	-	34,1	-
20	32,80	30,15	31,5	± 1,32
23	34,78	40,72	37,75	± 4,20



(a)



(b)

FIGURA 5.17 Curvas de crescimento em escala logarítmica da cultura SW1, pertencente ao gênero *Desulfovibrio*, cultivada sem agitação (a) curvas obtidas para cada réplica; (b) curva média das réplicas; a fase exponencial da qual foi obtido o coeficiente linear da reta situou-se entre $t = 4$ e $t = 18$ dias.

TABELA 5.13 - Valores da concentração de proteína total (mgSAB/L) em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sob agitação (200 rpm)

Tempo (d)	Concentração de Proteína total (mgSAB/L) Frasco 1	Concentração de Proteína total (mgSAB/L) Frasco 2	Concentração de proteína total média (mgSAB/L)	Desvio padrão
0	4,42	5,74	5,08	± 0,6
2	5,74	-	5,74	-
5	20,92	9,04	14,98	± 5,94
8	32,14	31,48	31,81	± 0,33
11	34,78	33,46	34,12	± 0,66
14	40,72	37,42	39,07	± 1,65
17	42,03	43,35	42,69	± 0,66
20	40,72	-	40,72	-
23	46,0	45,33	45,66	± 0,33

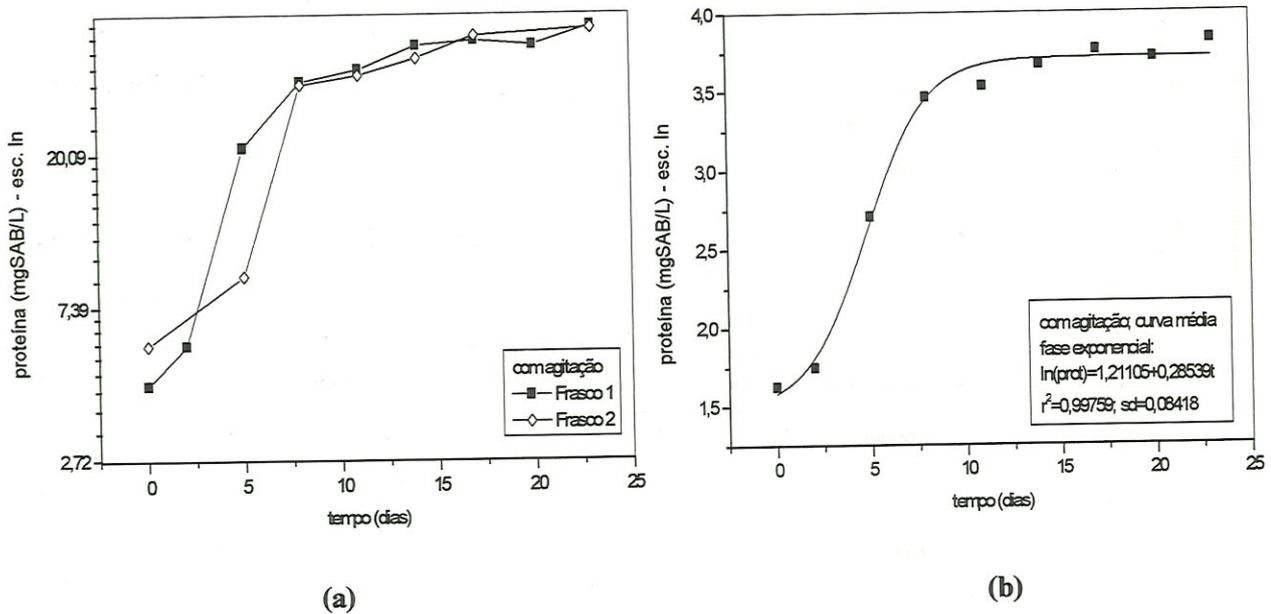


FIGURA 5.18 Curvas de crescimento em escala logarítmica da cultura SW1, pertencente ao gênero *Desulfovibrio*, cultivada sob agitação (a) curvas obtidas para cada réplica; (b) curva média das réplicas; a fase exponencial da qual foi obtido o coeficiente linear da reta situou-se entre $t=2$ e $t=8$ dias.

Velocidades maiores foram também verificadas para uma cultura de *Desulfovibrio desulfuricans* cultivada em sistema descontínuo com sulfato, H₂ e acetato de sódio (acetato apenas como fonte de carbono). O valor do μ_{\max} foi de 0,06 h⁻¹ (1,44 d⁻¹), sendo que a biomassa foi calculada pela técnica do carbono marcado. REIS *et al.* (1992) determinaram que *Desulfovibrio* sp cultivada com 50 g/L de lactato de sódio e 20-26 g/L de sulfato de potássio, em pH 6,6 e sob agitação constante, apresentaram valor de μ_{\max} em torno de 0,33 h⁻¹. A massa bacteriana foi monitorada por densidade ótica (660 nm).

Velocidades de crescimento mais lentas, na ordem de dias, foram observadas por OUDE ELFERINK *et al.* (1995) para a espécie *Desulfoharbodus amnigenus* cultivada em acetato (20mM) e sulfato (20mM) a 37°C em sistemas descontínuos (0,5 d⁻¹).

Mesmo não sendo exatamente as mesmas condições de cultivo, observa-se que as células da cultura SW1, são mais lentas que as demais apresentadas na literatura. Dentre os fatores que poderiam influenciar na taxa de crescimento pode-se destacar a proporção de compostos doadores e aceptores de elétrons e a toxicidade do sulfeto no processo de redução do sulfato, e com isso ocorrer a diminuição das velocidades de crescimento. Ambos os casos serão discutidos nos próximos itens, juntamente com os estudos do consumo de ácido láctico e sulfato e produção de ácido acético e sulfeto.

5.5.2 Avaliação do consumo de sulfato e produção de sulfeto pela cultura SW1

Na Tabela 5.14 são apresentados os valores médios das dosagens de sulfato e sulfeto total realizadas nas amostras dos ensaios de crescimento celular sem agitação. O valor médio de concentração de sulfato no início e no final do experimento foi de 3,12 e 2,72 g/L, respectivamente, o que corresponde a um consumo apenas de 13% do sulfato presente no meio. A concentração média de sulfeto total no início do experimento foi de 1,05 mg/L e no final do experimento foi de 121,60 mg/L. O gráfico da Figura 5.19 apresenta a distribuição dos valores médios de sulfato e sulfeto dos ensaios sem agitação.

Os valores médios do consumo de sulfato e produção de sulfeto nos ensaios com agitação estão mostrados na Tabela 5.15. As concentrações médias inicial e final de sulfato no

foram 3,24 e 2,38 g/L, respectivamente, correspondendo a 27% de consumo do sulfato presente no meio. A concentração de sulfeto no início do experimento foi de 1,53 mg/L atingindo um valor de 275,36 mg/L. O gráfico da Figura 5.20 apresenta a distribuição dos valores médios de sulfato e sulfeto dos ensaios com agitação.

Comparando-se os frascos com e sem agitação pode-se concluir que a produção de sulfeto foi 2 vezes maior nos experimentos com agitação. No entanto, mesmo maior do que no cultivo sem agitação, o consumo de sulfato no ensaio sob agitação foi apenas de 27%.

Observa-se nos gráficos de utilização de sulfato e produção de sulfeto (Figura 5.19) e o gráfico de crescimento bacteriano (Figura 5.17b), nos cultivos sem agitação, que ao final do experimento o metabolismo das bactérias ainda não havia cessado. No entanto, os cultivos sob agitação, tanto o sulfeto quanto o sulfato tendem a uma estabilização no final do experimento (Figura 5.20), bem como a produção de biomassa (Figura 5.18b).

Assim, pode-se inferir que a redução do sulfato, bem como o crescimento bacteriano, ocorre com velocidades maiores sob agitação. Observa-se que, nos cultivos sob agitação, a fase de adaptação (fase lag) foi muito reduzida, como indicado na curva obtida pelas dosagens de proteína durante o crescimento celular (Figura 5.18b), ou no gráfico de utilização do sulfato e produção de sulfeto (Figura 5.20).

Sabe-se que a redução do sulfato pode ser afetada por altas concentrações de sulfeto. Isso poderia explicar a baixa eficiência na assimilação do sulfato (13 e 27%). OKABE *et al.* (1992), mostraram que a respiração da cultura *Desulfovibrio desulfuricans* cultivada em sistemas contínuos foi 50% inibida pela adição de 15 mM de sulfeto ao meio de cultura. REIS *et al.* (1992), por sua vez, encontraram que a inibição é 100% da atividade de *D. desulfuricans*, cultivada em sistemas descontínuos com lactato e sulfato, quando a produção de 16 mM de sulfeto pela cultura foi alcançada. Os resultados de REIS *et al.* (1992) indicaram que o consumo de sulfato era maior após a remoção do sulfeto do meio de cultura, indicando que esse produto metabólico é um inibidor de BRS e que esta inibição é reversível.

TABELA 5.14 - Valores das concentrações de sulfato e sulfeto em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sem agitação

Tempo (dias)	Concentração de sulfato (g/L)			Concentração de sulfeto (mg/L)		
	Frasco 1	Frasco 2	Média - desvio padrão	Frasco 1	Frasco 2	Média - desvio padrão
0	3,22	3,01	3,12 ±0,1	1,15	0,96	1,05 ±0,09
5	3,21	-	3,21	3,52	5,12	4,32 ±0,8
8	-	3,22	3,22	-	5,44	5,44
11	3,24	3,11	3,18 ±0,06	20,48	24,64	22,56 ±2,08
14	3,07	2,99	3,03 ±0,04	39,36	56,96	48,16 ±8,8
17	3,12	2,98	3,05 ±0,07	66,24	83,84	75,04 ±8,8
20	2,92	2,71	2,82 ±0,10	88,0	127,04	107,4 ±20,0
23	2,84	2,59	2,72 ±0,12	94,72	148,48	121,6 ±26,8

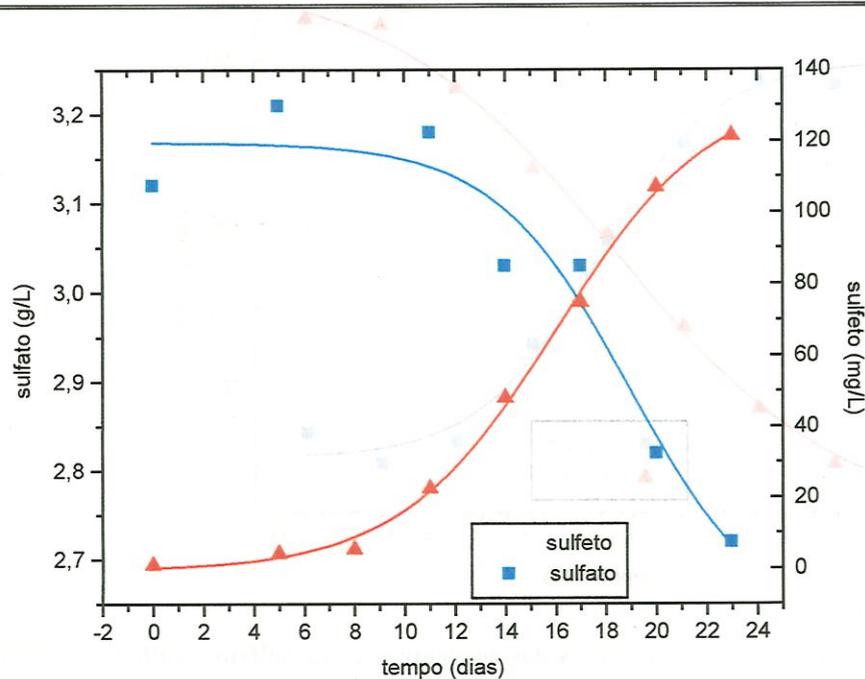


FIGURA 5.19 Distribuição dos valores médios das concentrações de sulfato e sulfeto no cultivo sem agitação da cultura SW1. No início do experimento as concentrações de sulfato e sulfeto foram 3,12 g/L e 1,05 mg/L, respectivamente, e após 23 dias de incubação a concentração de sulfato diminuiu para 2,72 g/L e de sulfeto aumentou para 121,6 mg/L.

TABELA 5.15 - Valores das concentrações de sulfato e sulfeto em função do tempo, durante o crescimento da cultura SW1 cultivada sob agitação (200rpm)

Tempo (dias)	Concentração de sulfato (g/L)			Concentração de sulfeto (mg/L)		
	Frasco 1	Frasco 2	Média – desvio padrão	Frasco 1	Frasco 2	Média – desvio padrão
0	3,16	3,31	3,24 ± 0,08	1,98	1,08	1,53 ± 0,45
2	3,16	-	3,16	4,80	-	4,8
5	2,99	3,35	3,17 ± 0,18	56,96	20,16	38,56 ± 18,4
8	2,93	3,13	3,03 ± 0,10	105,28	71,68	88,48 ± 16,8
11	2,75	2,86	2,81 ± 0,06	168,64	120,32	144,48 ± 24,16
14	2,55	2,60	2,58 ± 0,03	206,40	161,92	184,16 ± 22,24
17	-	2,35	2,36	244,16	221,44	232,80 ± 11,36
20	-	2,31	2,31	264,64	279,36	272,0 ± 7,36
23	2,44	2,31	2,38 ± 0,05	271,36	279,36	275,36 ± 4,0

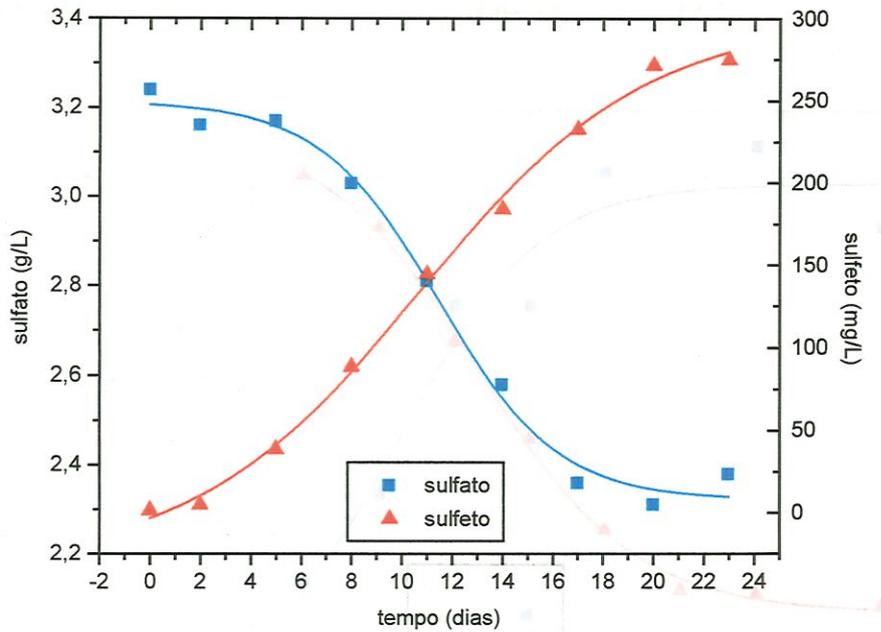


FIGURA 5.20 Distribuição dos valores médios das concentrações de sulfato e sulfeto no cultivo com agitação da cultura SW1. No início do experimento as concentrações de sulfato e sulfeto foram 3,24 g/L e 1,53 mg/L, respectivamente, e após 23 dias de incubação a concentração de sulfato diminuiu para 2,38 g/L e de sulfeto aumentou para 275,36 mg/L.

Contudo, não pode-se afirmar que a baixa assimilação do íon sulfato pela BRS SW1 seja devida às quantidades de sulfeto produzidas no final do experimento, de 4,0 mM e 8,43 mM, nas condições com e sem agitação, respectivamente. Porém, deve-se levar em conta essa possibilidade nas condições de ensaio. O baixo consumo do sulfato, ainda, pode ser justificado pelo excesso do mesmo no meio de cultivo em relação a concentração da fonte de carbono (lactato) empregada.

Estequiometricamente, a literatura aponta que durante a oxidação incompleta do lactato, sulfato é reduzido a sulfeto na proporção de 1:1 (Tabela 3.6). Convertendo os valores obtidos de sulfeto (mg/L) e sulfato (g/L) para molaridade tem-se que, com e sem agitação a proporção foi a indicada na literatura, ou seja 1 mol de sulfato consumido produziu 1 mol de sulfeto. Assim, constata-se que o metabolismo do sulfato pela BRS SW1 foi de acordo com o esperado. Mais uma vez, cabe lembrar, que a elevada concentração residual de sulfato pode ser consequência de um excesso utilizado desse composto no meio de cultivo.

As velocidades de consumo de sulfato e produção de sulfeto e proteína (biomassa) correspondentes aos cultivos sob agitação, cujos valores estão apresentados nos gráficos da Figura 5.21a, indicaram maior atividade no início do experimento. As velocidades de produção de proteína e sulfeto aumentaram desde o início até o quinto e oitavo dia, respectivamente. A partir do quinto dia houve um decréscimo da velocidade de produção de massa celular, com um aumento na velocidade de consumo de sulfato (por se tratar de velocidades de consumo, os valores nas Figuras são negativos) e do lactato, como será visto mais adiante (Figura 5.24b). O aumento na velocidade de utilização do sulfato coincide com o aumento na velocidade de produção de sulfeto, que por sua vez corresponde ao período de queda da velocidade de crescimento de massa celular da cultura. Esse comportamento indicou uma maior atividade da BRS SW1 nos primeiros 5 dias de cultivo, correspondendo à fase exponencial de crescimento. Os resultados indicam que no período entre o quinto e oitavo dia de incubação, as velocidades de produção celular e consumo de sulfato diminuem e aumentam, respectivamente, variando de forma diferente até o 18º dia, e apresentando o comportamento inicial no 20º dia, quando os valores de sulfeto atingem 120 mg/L. Ao observar-se a Figura 5.18, o crescimento celular a partir do quinto dia desacelera, entrando em fase estacionária. O aumento das velocidades de consumo de substrato orgânico e acceptor final de elétrons nesse período pode significar metabolismo endógeno, ou seja, a energia necessária para manutenção das células vivas. Um

ponto importante é que além da concentração residual do produto sulfeto (130 mg/L ao final do ensaio), que existe no meio desde o quinto dia de incubação em concentração da ordem de 40 mg/L, há a disponibilidade de cerca de 40 mg/L de ácido acético (Tabela 5.17) no mesmo período, atingindo valores de até 550 mg/L ao final do ensaio. A ação no meio dos produtos, a partir do quinto dia, pode ter regulado a atividade celular, pois somente o acúmulo do ácido acético influenciaria através do declínio do pH do meio de cultivo, com o conseqüente prejuízo ao desenvolvimento da cultura SW1, apesar da existência de cerca de concentrações expressivas de lactato de sódio e sulfato de sódio.

Nos cultivos sem agitação, as velocidades de produção de sulfeto e de biomassa foram baixas no início do experimento, até o 5^o dia, correspondendo a fase de adaptação da cultura SW1. No entanto, a velocidade de consumo de sulfato aumentou a partir do primeiro dia até aproximadamente o décimo dia, a partir do qual se manteve-se em valores próximos até o 18^o dia, com um ligeiro aumento no 20^o dia de incubação (Figura 5.21). Observa-se que a velocidade de produção de sulfeto aumentou, consideravelmente, do quinto ao décimo quarto dia de incubação, assim como a concentração de proteína celular, correspondente à fase exponencial de crescimento (Figura 5.17), e após este período iniciou-se um declínio dessas velocidades. A utilização de sulfato ainda foi constatada, provavelmente, pela disponibilidade do substrato orgânico (Tabela 5.16) como fonte de energia de manutenção celular, pois ainda existia nesse período, no sistema de reação, cerca de 50% de ácido láctico a ser consumido. Novamente, a desaceleração do crescimento celular ainda na presença de fontes energéticas pode ser devida ao acúmulo de produtos, que ocorre nos ensaios sem agitação em valores da ordem de 20 mg/L de sulfeto e 30 mg/L de ácido acético a partir do 11^o dia de incubação.

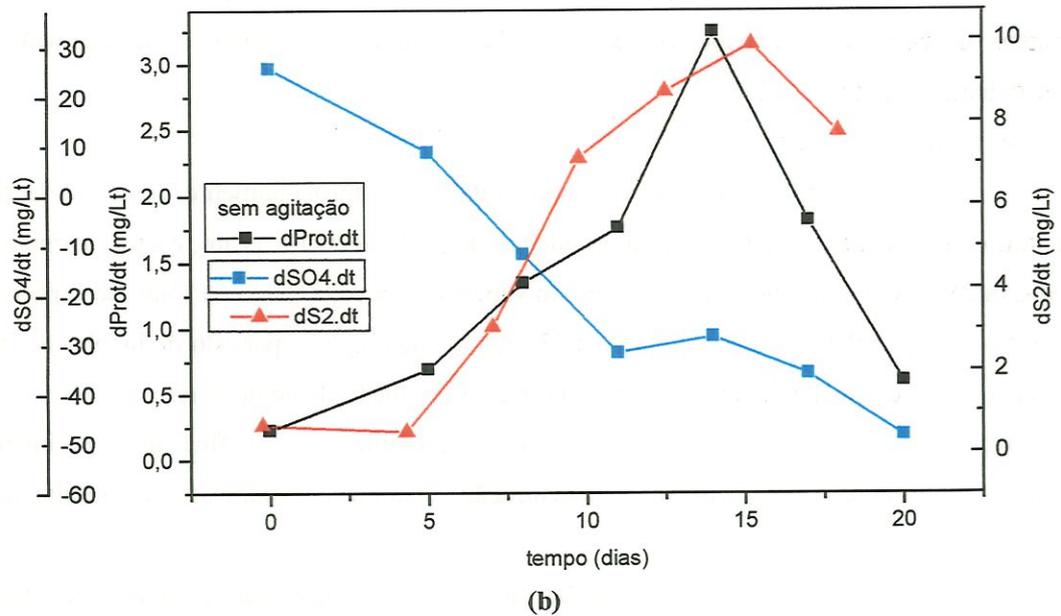
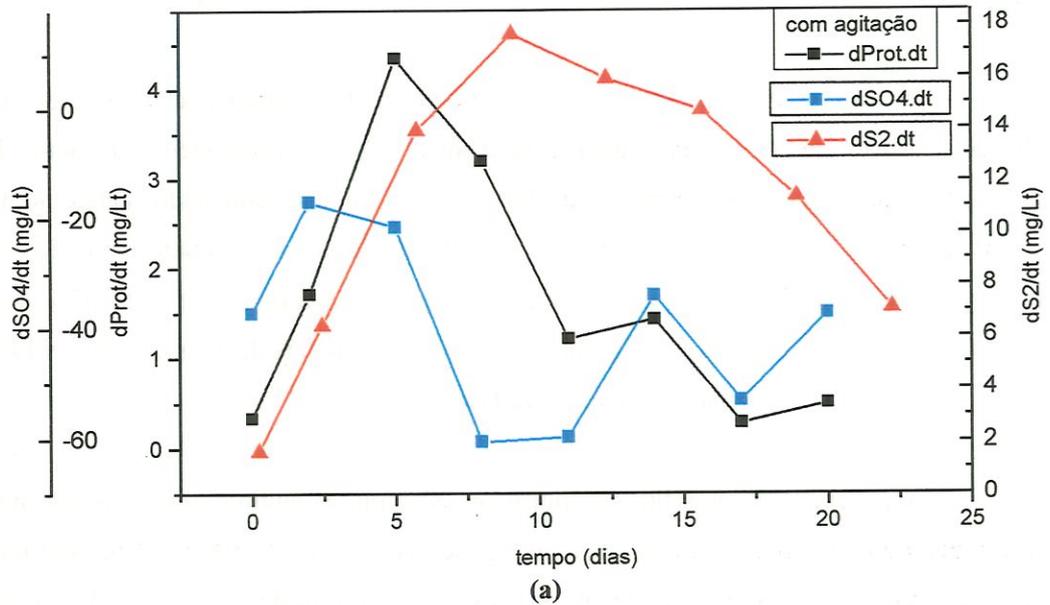


FIGURA 5.21 Gráficos da velocidade de consumo de sulfato, produção de sulfeto e de proteína celular pela cultura SW1; (a) cultivos com agitação (b) cultivos sem agitação. As velocidades indicadas como negativas, por se tratar de consumo, devem ser analisadas em valor absoluto

5.5.3 Avaliação do consumo do ácido láctico e produção do ácido acético pela cultura SW1

Os valores obtidos nas determinações dos ácidos láctico e acético para a cultura cultivada sem agitação estão apresentados na Tabela 5.16. O valor médio de ácido láctico determinado no início do experimento foi de 3,4 g/L e não foi detectado ácido acético no período amostrado. Após o período de incubação os valores de ácidos láctico e acético foram, respectivamente, 1,5 g/L e 274 mg/L, o que correspondeu a um consumo de 55% do ácido láctico presente no meio. A Figura 5.22 apresenta as curvas médias de consumo de ácido láctico e produção de ácido acético dos cultivos sem agitação.

A Tabela 5.17 apresenta os valores obtidos com as cultura cultivadas sob agitação. O ensaio iniciou com um valor médio de ácido láctico de 2,93 g/L e não foi detectada presença de ácido acético. Após o período de incubação, os valores foram de 0,41 g/L de ácido láctico e 552 mg/L de ácido acético, correspondendo a um consumo de 85% de ácido láctico. As curvas médias de consumo de ácido láctico e produção de ácido acético, nesta condição, estão apresentadas na Figura 5.23.

Estes valores indicam que, sob agitação, o aproveitamento do ácido láctico foi maior, com o conseqüente aumento na produção de ácido acético. Assim, é certo afirmar que os experimentos sob agitação resultaram em um superior aproveitamento da fonte de carbono pelas células de BRS SW1. As Figuras 5.22 e 5.23 indicam que, após o período de incubação, há uma tendência dos cultivos não agitados em continuar a produção de ácido acético, após o 22^o dia de incubação, apesar do uso do ácido láctico estar se estabilizando. Ao final do experimento sob agitação, há uma tendência para que a concentração de ambos os compostos se estabilizem.

A estequiometria da oxidação incompleta do ácido láctico a acético, durante a redução do sulfato, indica uma proporção de 1:1 entre reagente e produto, ou seja, a oxidação de 2 moles de ácido láctico produzem 2 moles de ácido acético (Tabela 3.6). Os valores obtidos no presente trabalho, indicam que, guardadas as perdas e/ou erros devidas a determinação analítica, 2 moles de ácido láctico produziram 1 mol de ácido acético nos ensaios sem agitação e 3 moles de ácido láctico produziram 1 mol de ácido acético nos ensaios com agitação, ou seja, parece não

TABELA 5.16 - Valores das concentrações de ácidos láctico e acético em função do tempo durante o crescimento de *Desulfovibrio* sp cultivada sem agitação

Tempo (dias)	Concentração de ácido láctico (g/L)			Concentração de ácido acético (mg/L)		
	Frasco 1	Frasco 2	Média – desvio padrão	Frasco 1	Frasco 2	Média – desvio padrão
0	-	3,38	3,38	-	0	0
5	2,75	2,77	2,76 ± 0,01	14,10	19,09	11,60 ± 10,6
8	3,0	2,75	2,88 ± 0,13	19,60	27,33	23,46 ± 5,47
11	2,26	2,47	2,37 ± 0,1	42,36	16,45	29,40 ± 18,32
14	1,61	1,93	1,80 ± 0,13	66,85	108,75	87,80 ± 29,63
17	-	1,86	1,86	-	158,69	158,69
20	1,7	1,53	1,65 ± 0,12	165,25	224,50	194,87 ± 41,90
23	1,68	1,29	1,49 ± 0,19	228,65	319,07	273,86 ± 63,94

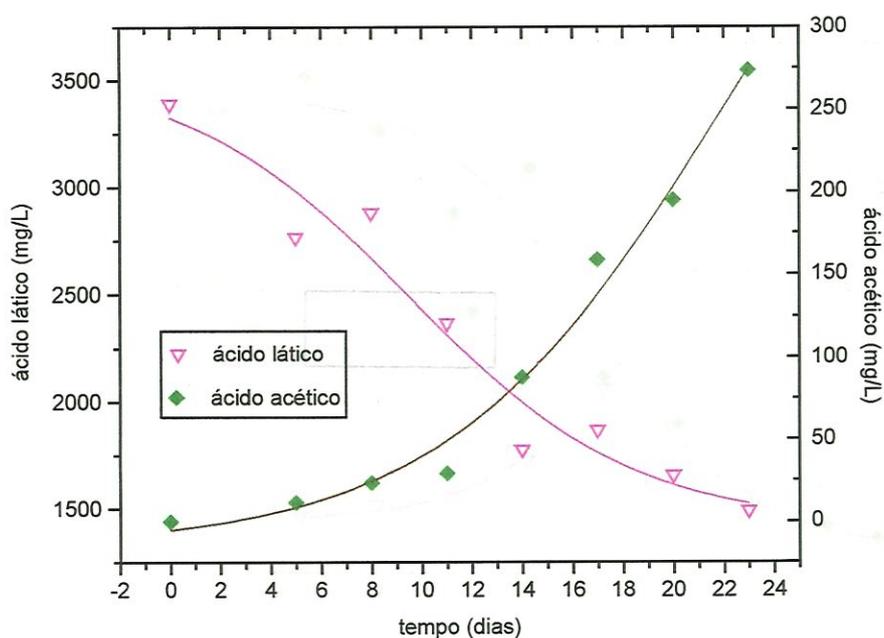


FIGURA 5.22 Distribuição dos valores médios das concentrações de ácido láctico e ácido acético cultivo sem agitação da cultura SW1. No início do experimento as concentrações de ácido láctico foi 3389 mg/L; após 23 dias de incubação a concentração de ácido láctico diminuiu para 1493 mg/L e a de ácido acético aumentou para 273,86 mg/L.

TABELA 5.17 - Valores das concentrações de ácidos láctico e acético em função do tempo durante o crescimento de *Desulfovibrio* sp cultivada com agitação (200 rpm)

Tempo (dias)	Concentração de ácido láctico (g/L)			Concentração de ácido acético(mg/L)		
	Frasco 1	Frasco 2	Média – desvio padrão	Frasco 1	Frasco 2	Média – desvio padrão
0	3,34	2,51	2,92 ± 0,41	0	0	0
2	3,44	0	3,44	12,61	0	12,61
5	2,45	2,08	2,27 ± 0,19	36,88	24,13	30,46 ± 6,33
8	2,82	2,02	2,42 ± 0,4	212,31	60,04	136,17 ± 76,13
11	1,77	1,03	1,40 ± 0,37	187,08	199,0	193,04 ± 5,96
14	1,09	0,62	0,85 ± 0,23	598,50	290,77	444,63 ± 153,86
17		0,57	0,57		388,78	388,78
20	0,73	0,28	0,50 ± 0,22	578,55	398,21	488,38 ± 90,17
23	0,50	0,33	0,41 ± 0,08	624,67	480,45	552,56 ± 72,11

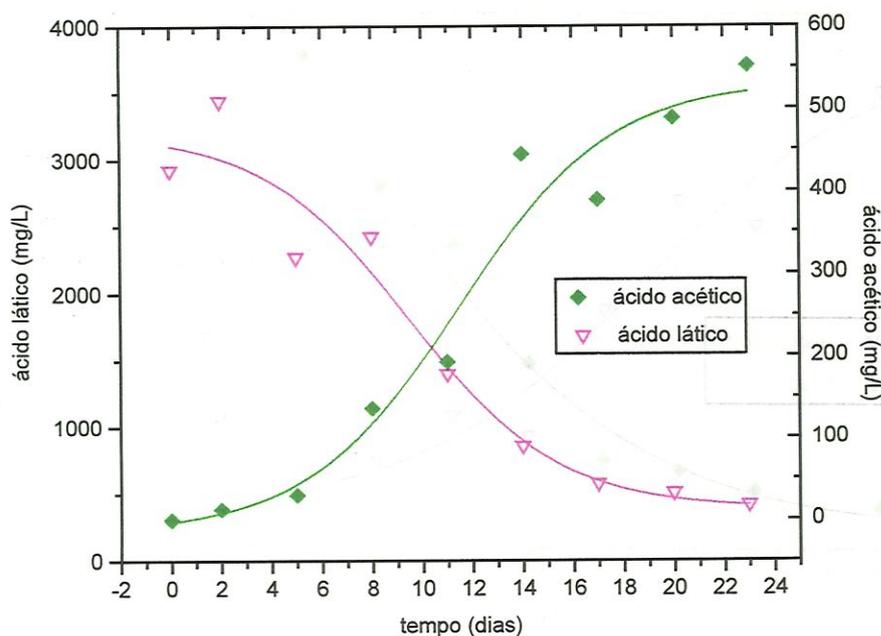


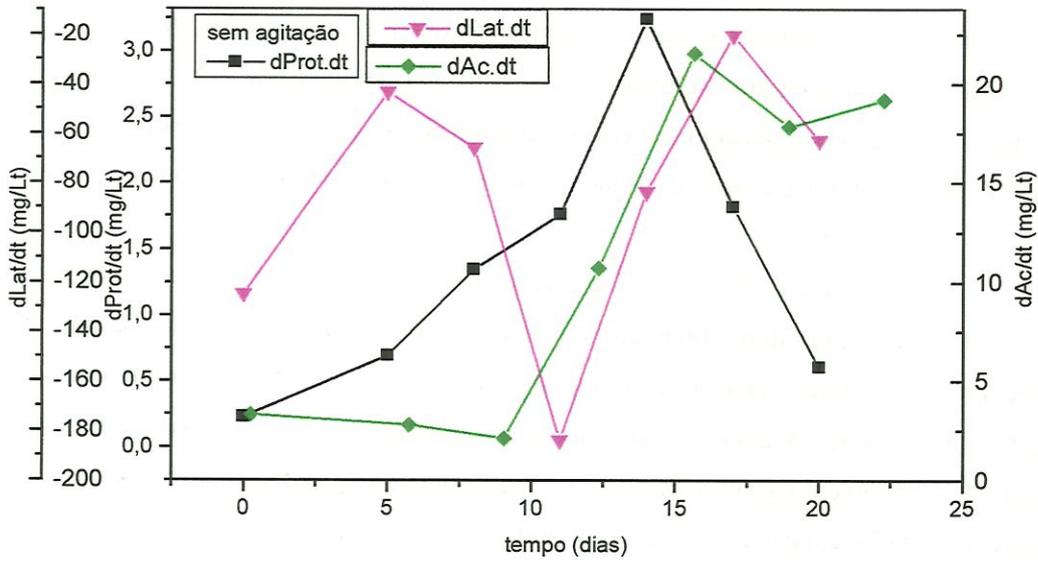
FIGURA 5.23 Distribuição dos valores médios das concentrações de ácido láctico e ácido acético cultivo sem agitação da cultura SW1. No início do experimento as concentrações de ácido láctico foi 2927 mg/L; após 23 dias de incubação a concentração de ácido láctico diminuiu para 418 mg/L e a de ácido acético aumentou para 552 mg/L.

haver um balanço das reações segundo a estequiometria indicada. Porém, não deve-se apontar para o sucesso dessa comparação, uma vez que a presença acumulada do produto ácido acético nos ensaios com e sem agitação esteve, respectivamente, em valores médios e aproximados de 555 e 280 mg/L, valores elevados do ácido que poderiam influenciar o metabolismo celular.

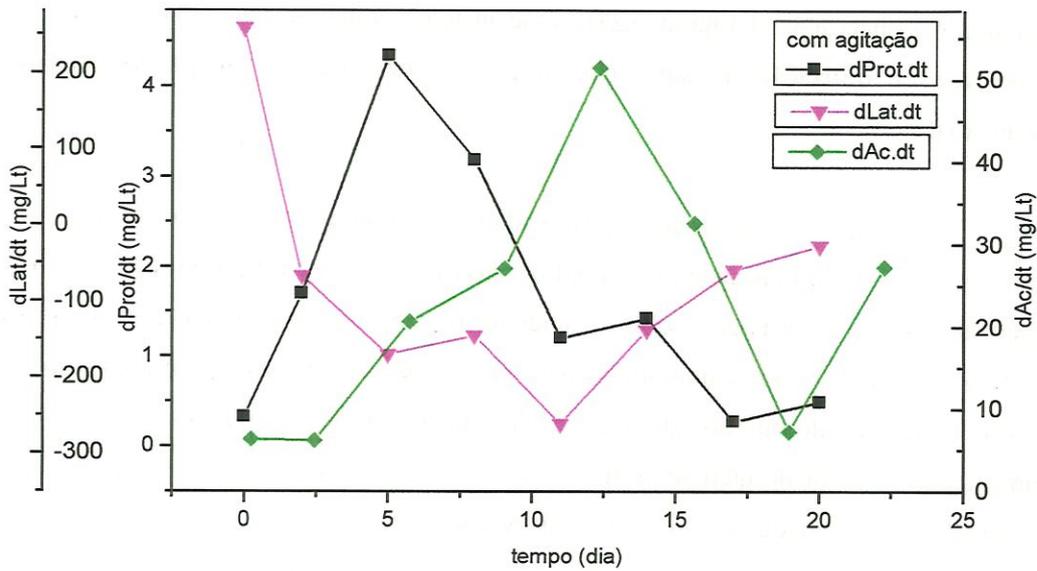
A velocidade de consumo do ácido láctico cresceu até o 11^o dia do ensaio sem agitação (Figuras 5.24a), diminuindo até o final do ensaio, talvez em função do acúmulo no meio de reação dos produtos formados, sulfeto e ácido acético. Assim, fatores relacionados aos produtos no meio influenciaram as velocidades de crescimento celular, apesar da disponibilidade de fonte de carbono e do aceptor de elétrons. A ausência de agitação desfavorece as trocas entre as células e o meio reagente, e isso pode prejudicar o crescimento celular. No entanto, apesar da diminuição na velocidade de consumo da fonte de carbono a partir do 11^o dia, a velocidade do crescimento celular ($d_{prot}.dt$) se manteve crescente por mais três dias, diminuindo após esse período. Ao observar-se a Figura 5.21b, esse instante coincide com uma leve diminuição da velocidade de utilização do sulfato, com a ocorrência de decréscimo nas velocidades de produção de sulfeto.

No ensaio sob agitação, a velocidade de consumo do ácido láctico cresceu até o 11^o dia (Figura 5.24b), diminuindo até o final do ensaio, talvez em função do acúmulo no meio de reação dos produtos formados, sulfeto e ácido acético. Nesse ponto, salienta-se novamente, que a partir do quinto dia ocorre a diminuição nas velocidades determinadas para o crescimento celular ($d_{prot}.dt$), lembrando que do quinto ao décimo primeiro dia, a concentração celular continuou aumentando, a partir do qual se estabiliza, com o consumo de lactato e sulfato ocorrendo para assegurar as necessidades energéticas de manutenção das células.

A partir desse período (11^o dia), começa a diminuir a velocidade de produção de ácido acético, período em que a velocidade de consumo de ácido láctico diminui. A Figura 5.21^a ilustra, graficamente, que no 11^o dia há uma diminuição da velocidade de consumo de sulfato.



(a)



(b)

FIGURA 5.24 Gráficos da velocidade de consumo de ácido láctico, produção de ácido acético e de proteína celular pela cultura SW1; (a) cultivos sem agitação (b) cultivos com agitação. As velocidades indicadas como negativas, por se tratar de consumo, devem ser analisadas em valor absoluto

5.5.4 Avaliação geral do metabolismo da cultura SW1

A avaliação do metabolismo da cultura SW1 pertencente ao gênero *Desulfovibrio* foi realizada com base nos resultados obtidos no ensaio de cinética de crescimento. Como já abordado anteriormente, esse ensaio contou com o cultivo em meio P.E.m com 40mM de lactato e 37 mM de sulfato com e sem agitação constante.

Para os cultivos sob agitação, os dados revelaram que 83% da concentração inicial do ácido láctico foi utilizada durante a fase de crescimento da cultura, o que correspondeu a aproximadamente 33 mM. No entanto, apenas 27% do sulfato foi utilizado (10mM). Isto nos permite inferir que sob esta condição de cultivo, a concentração de sulfato foi aproximadamente 3,7 vezes maior ao que a bactéria poderia necessitar.

Seguindo o mesmo raciocínio para os cultivos sem agitação, o consumo de ácido láctico foi de 55% (~22mM) e do sulfato foi de 13% (~5mM). Assim, houve o emprego de quase o dobro da concentração de fonte de carbono necessária para o metabolismo da BRS SW1, considerando-se as concentrações iniciais de células, e que a concentração de sulfato empregada foi 7 vezes maior.

Contudo, esta concentração de sulfato foi utilizada e mantida de acordo com as condições dos cultivos realizados anteriormente a este trabalho, que por sua vez correspondiam as condições ambientais da origem da cultura. Com base nos resultados discutidos acima, talvez o ideal seja que, para 40mM de lactato de sódio aplicado como fonte de carbono, utilize-se 20 mM de sulfato no meio de cultivo.

FINSTER *et al.* (1998) empregaram 5 mM de lactato e 10 mM de sulfato durante os cultivos com BRS marinhas. Usualmente, são empregados concentrações de 10 ou 20 mM de substrato orgânico e 10mM de sulfato (LAANBROEK e PFENNIG, 1981; DALSGAARD e BAK; 1994).

Sabe-se que cultivos em ensaios descontínuos estão sujeitos à ação dos produtos metabólicos acumulados no meio de reação. Assim, a presença de sulfeto e de ácido acético podem ter influenciado o metabolismo da cultura SW1, nos ensaios com e sem agitação, como

mencionado anteriormente, mais especificamente nas velocidades de consumo de substrato e produção de biomassa.

Com base nos valores obtidos de ácido láctico, ácido acético, sulfato e sulfeto, foi possível propor uma reação metabólica genérica realizada pela cultura SW1. Os valores utilizados na equação correspondem a média aritmética das réplicas de cada parâmetro, corrigidos pelas respectivas molaridades. Sendo assim, tem-se que:

Sob agitação: 3 ácido láctico + 1 sulfato \rightarrow 1 ácido acético + 1 sulfeto

Sem agitação: 2 ácido láctico + 1 sulfato \rightarrow 1 ácido acético + 1 sulfeto

Pode-se observar que as reações propostas não estão balanceadas. Isso implica em que não estão aqui considerados outros produtos do metabolismo das BRS, como o bicarbonato (HCO_3^-). Sabe-se que durante a oxidação de 2 moles de ácido láctico são produzidos 2 moles de ácido acético e 2 moles do íon bicarbonato (Tabela 3.6). Outro aspecto comentado por POSTGATE (1979), refere-se que alguns hidrocarbonetos e mucina podem ser eliminados como produtos do metabolismo, principalmente por *Desulfovibrio desulfuricans*.

Ao analisar os cromatogramas dos ácidos voláteis observa-se, após oito dias de cultivo, o surgimento de picos em tempos de retenção desconhecidos. Dois cromatogramas estão apresentados na Figura 5.26, originados da análise de um dos frascos cultivados sob agitação constante, correspondentes ao tempo inicial e após 23 dias de incubação. Os demais cromatogramas apresentaram os mesmos picos desconhecidos.

Os tempos de retenção 11,186/11,280 minutos, correspondem ao ácido láctico, enquanto que 13,533/13,891 minutos correspondem ao ácido acético. O pico apresentado no tempo 5,816 pode indicar a presença de sulfato. Pode-se observar a presença de picos de origem desconhecida nos tempos de retenção 7,587/7,698 e 12,508 minutos.

Alguns testes foram realizados com a finalidade de determinar os compostos correspondentes aos tempos de retenção desconhecidos (cromatogramas apresentados no Anexo B). Alguns resultados indicaram que os picos poderiam estar relacionados ao ácido pirúvico

(Figura B.3), cujo tempo de retenção foi de 7,7 minutos, e ao ácido fórmico (Figura B.2), cujo tempo de retenção foi de 12,833 minutos. De fato, ácido pirúvico é um intermediário do metabolismo (POSTGATE, 1979), mas não há evidências de que seja eliminado pela célula. Outros compostos como resazurina, ácido bórico, ácido ascórbico e EDTA, constituintes do meio P.E.m, não foram detectados cromatograficamente. O próprio meio de cultura P.E.m não apresentou picos correspondentes aos desconhecidos (Figura B.1).

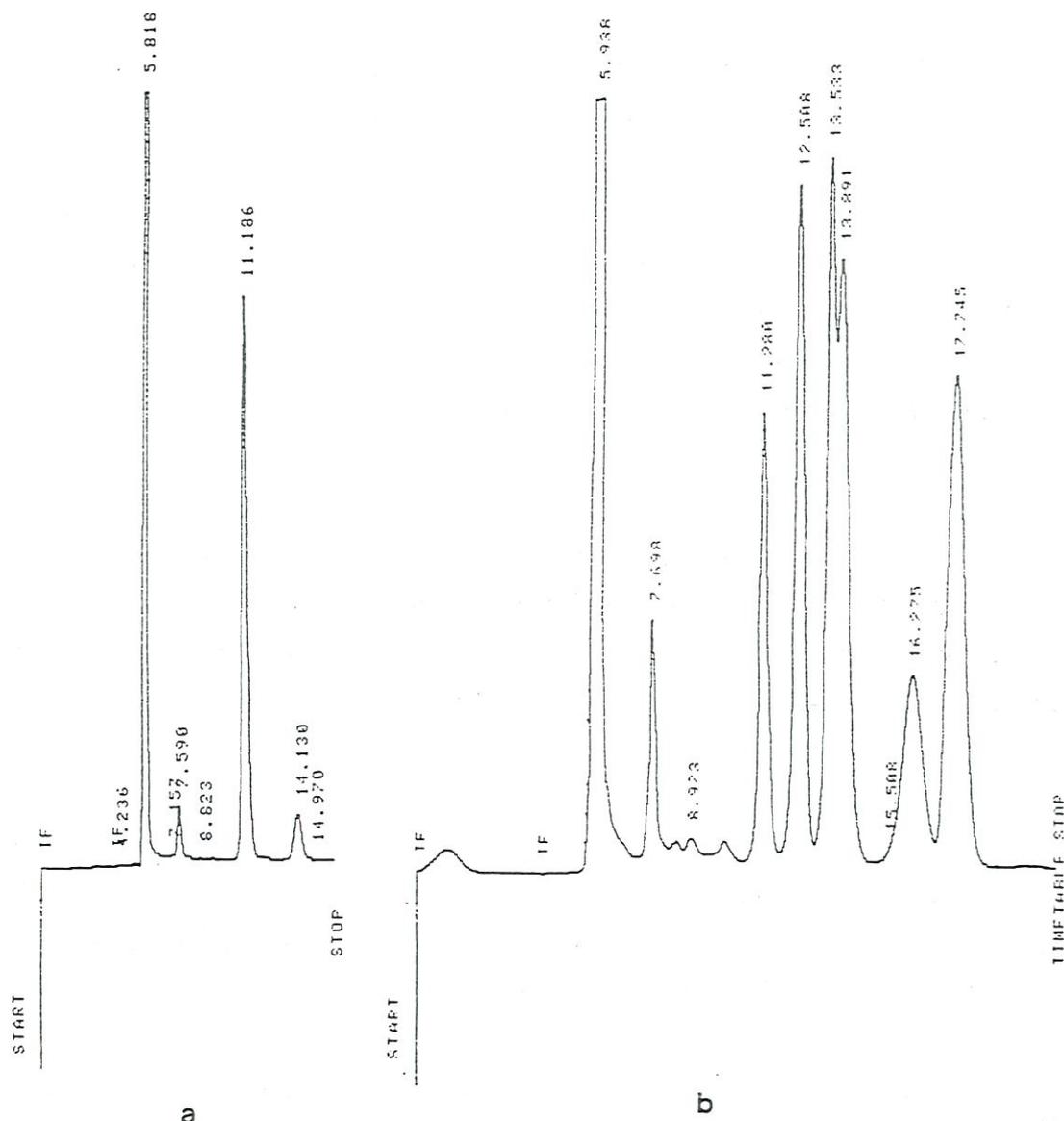


FIGURA 5.26 Cromatogramas obtidos durante as análises dos ácidos voláteis em uma das réplicas da cultura SW1 cultivada sob agitação constante; (a) no tempo inicial ($t=0$ d) (b) no tempo final ($t=23$ d).

6 – CONCLUSÕES

Os trabalhos experimentais da presente Dissertação de Mestrado permitiram as seguintes conclusões:

- O meio de cultura empregado, Postgate E modificado, bem como as técnicas de isolamento sob anaerobiose estrita, diluições decimais seriadas e “Roll-Tube”, foram eficazes para o cultivo e obtenção de culturas puras de BRS presentes nas quatro amostras estudadas.
- As quatro culturas isoladas foram caracterizadas segundo aspectos morfo-fisiológicos e classificadas segundo a similaridade com as espécies de BRS relatadas na literatura:
 - cultura FW1: bacilos curvos; Gram-negativos; esporulantes; sem desulfovirdina; bom crescimento sob condição salina; oxidação incompleta dos compostos orgânicos; na presença de sulfato, lactato e malato foram os substratos preferenciais; cultura similar a *Desulfotomaculum halophilum*.
 - cultura FW2: bacilos curvos; resposta irregular da coloração de Gram; não formadores de esporos; com desulfovirdina; bom crescimento sob condições salinas; oxidação incompleta dos compostos orgânicos; na presença de sulfato, malato e lactato foram os substratos preferenciais; cultura similar a *Desulfovibrio desulfuricans*.

- cultura SW1: bacilos curvos; Gram-negativos; não formadores de esporos; com desulfovirdina; halófilos; oxidação incompleta dos substratos orgânicos; na presença de sulfato, lactato e malato foram os substratos preferenciais; cultura similar a *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio salexigens*.

- cultura SW2: bacilos curvos, Gram-negativos, não esporulantes; sem desulfovirdina; halófilos; oxidação completa dos substratos orgânicos; na presença de sulfato, lactato, malato etanol, formiato e acetato foram utilizados; cultura similar a *Desulfobacterium* sp.

- Na presença de sulfato, a concentração média de proteína da BRS FW2, após o período de incubação, revelou melhor crescimento nos substratos orgânicos malato e lactato (114,65 e 93,67 mgSAB/L respectivamente). Nos cultivos em etanol e formiato o crescimento foi menor e não houve crescimento em acetato e na ausência de fonte de carbono. A concentração de proteína encontrada nos cultivos com diferentes aceptores de elétrons, revelou que na presença de malato, os melhores valores foram para sulfato (114,65 mgSAB/L) e tiosulfato (106,89 mgSAB/L), indicando serem os melhores compostos aceptores de elétrons na condição estudada. Pouco crescimento da cultura FW2 ocorreu na presença de sulfito, e foram incapazes de crescer com nitrato e sem aceptor de elétrons.
- Os valores da concentração de proteína obtidos no ensaio em diferentes fontes de carbono da BRS SW1 revelaram que as melhores compostos orgânicos na presença de sulfato foram em lactato (92,40 mgSAB/L) e em malato (81,27 mgSAB/L). O crescimento foi menor em formiato e etanol, e ausente em acetato.
- Os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento da cultura SW1, nos ensaios realizados sob agitação constante, foram: $\mu_{\max} = 0,28 \text{ d}^{-1}$ e $T_g = 2,47 \text{ d.}$; 27% do sulfato foi consumido, o que proporcionou uma produção de 275 mg/L

de sulfeto. O consumo de ácido láctico foi de 85% com produção de 552 mg/L de ácido acético. Com estes valores, a reação metabólica realizada pela cultura SW1 foi: 3 ácido láctico + 1 sulfato \rightarrow 1 ácido acético + 1 sulfeto.

- Sob as mesmas condições, mas sem agitação, os valores dos parâmetros cinéticos foram: $\mu_{\max} = 0,13 \text{ d}^{-1}$ e $T_g = 5,33 \text{ d}$. O consumo de sulfato e ácido láctico foram, respectivamente, 13 e 55%, e as produções de sulfeto e ácido acético alcançaram valores de 121 e 274 mg/L. Nesta condição, a reação metabólica foi: 2 ácido láctico + 1 sulfato \rightarrow 1 sulfeto + 1 ácido acético.
- Constatou-se no ensaio cinético, que as culturas em meio sob agitação cresceram com velocidade duas vezes maior do que no cultivo sem agitação. A agitação do meio de cultura também favoreceu as células em relação ao consumo dos substratos e formação de produtos.
- Pode-se inferir que a concentração de sulfato empregada nos ensaios de crescimento foi maior que a necessária para os cultivos com e sem agitação, já que as porcentagens utilizadas em cada condição foram, respectivamente, de 27 e 13%, na presença de 40 mM de lactato de sódio.
- O método de determinação de proteína total aplicado neste trabalho foi efetivo para a avaliação do crescimento celular de BRS.



7 – RECOMENDAÇÕES

Os trabalhos experimentais da presente Dissertação de Mestrado permitiram as seguintes recomendações:

- Realizar cultivos de BRS marinhas em meio Postgate E na concepção original, em que NaCl é adicionado ao meio sem o emprego da água do mar sintética, a fim de verificar o seu comportamento, já que nesta condição a concentração de sulfato diminui para 10mM.
- Efetuar ensaios com as culturas de BRS marinhas em concentrações de NaCl e de lactato e sulfato, determinando deste modo a salinidade e a relação lactato/sulfato ideal para o cultivo das mesmas.
- Os ensaios para avaliar a cinética do crescimento microbiano devem ser preferencialmente realizados sob agitação constante, para isso sugere-se a determinação das melhores condições de agitação;
- Em adição aos estudos sobre a classificação taxonômica das culturas de BRS, realizados nesse trabalho, e que utilizaram técnicas tradicionais para a identificação de culturas bacterianas, deve-se empregar as técnicas de Ecologia Molecular para identificação e classificação taxonômica das espécies isoladas.

- A fim de associar o envolvimento das culturas de BRS isoladas no processo biocorrosivo, sugere-se que sejam realizados ensaios específicos de corrosão com as mesmas, associando esses resultados aos obtidos neste trabalho e propondo um mecanismo eficaz de minimização dos efeitos desta atividade.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.C. (1995). *Caracterização e Evolução do Biofilme em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado alimentado com Esgoto Sanitário Sintético*. São Carlos, SP. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 158p.
- BADZIONG, W.; DITTER, B.; THAUER, R.K. (1979). Acetate and Carbon Dioxide Assimilation by *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg), Growing on Hydrogen and Sulfate as Sole Energy Source. *Archives of Microbiology*. v. 123, p. 301-305.
- BADZIONG, W.; THAUER, R.K. (1978). Growth Yields and Growth Rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) Growing on Hydrogen plus Sulfate and Hydrogen plus Tiosulfate as the Sole energy Sources. *Archives of Microbiology*. v. 117; p.209-214.
- BALE, S.J.; GOODMAN, K.; ROCHELLE, P.A.; MARCHESI, J.R.; FRY, J.C.; WEIGHTMAN, A.J.; PARKES, R.J. (1997). *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a Novel Barophilic Sulfate-Reducing Bacterium from Deep Sediment Layers in the Japan Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 47; n. 02; p. 515-521.
- BHADURI, S.; DEMCHICK, P.H. (1983). Simple and Rapid Method for Disruption of Bacteria from Protein Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 46; p. 941-943.
- BORZANI, W. (1972). O método turbidométrico na medida de concentrações e de velocidades de reprodução de microrganismos. *Review of Microbiology*. v. 3, p. 153-156

- BORZANI, W. (1975). Corrosão por Microrganismos. *In: Biotecnologia: Tópicos de Microbiologia Industrial*. Ed(s) Eugênio Aquarone, Walter Borzani e Urgel de Almeida Lima. v. 2, 231p.
- BORZANI, W. (1986). Cinética de Processos Fermentativos. *Revista Brasileira de Engenharia*. v. 3; p. 1-51.
- BORZANI, W. (1990). Definições e Cálculos de Velocidades em Processo Fermentativos. *Revista de Ensino em Engenharia – São Paulo*. v. 9(1/2), p. 33-40.
- BRANDIS-HEEP, A.; GEBHARDT, N.A.; THAUER, R.K.; WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1983). Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei* – 1-Demonstration of all enzymes required for the operation of the citric acid cycle. *Archives of Microbiology*. v. 136, p. 222-229.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1994). *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, New Jersey; 909p.
- CAMPBELL, L.L.; POSTGATE, J.R. (1965). Classification of the spore-Forming Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriological Reviews*. v. 29, n. 3, p. 359-363.
- CENPES (1995). Estudo de causas prováveis de dano do riser de PCH-2 relacionadas à deposição de sulfato de bário e a ação localizada da bactéria redutora de sulfato, projeto 04.05.40 DITER/SEBIO
- CENPES (1996). *Relatório Start – Histórico das Culturas*. Coord. Fátima Cristina M. Magalhães.
- CORD-RUWISCH, R.; WIDDEL, F. (1986). Corroding Iron as a Hydrogen Source for Sulphate Reduction in Growing Cultures of Sulphate-Reducing Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 25, p. 169-174.

- CZECHOWSKI, M.H.; CHATELUS, C.; FAUQUE, G.; LIBERT-COQUEMPOT, M.F.; LESPINAT, P.A.; BERLIER, Y.; LeGALL, J. (1990). Utilization of cathodically-produced hydrogen from mild steel by *Desulfovibrio* species with different types of hydrogenases. *Journal of Industrial Microbiology*. v. 6, p. 227-234.
- DALSGAARD, T.; BAK, F. (1994) Nitrate Reduction in a Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, Isolated from Rice paddy Soil: Sulfide Inhibition, Kinetics, and Regulation. *Applied Environmental Microbiology*. v. 60, n. 1, p. 291-297.
- ✓ DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). *Degradação de Pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 176p
- DEVEREUX, R.; DELANEY, M.; WIDDEL, F. STAHL, D.A. (1989). Natural relationships among Sulfate-Reducing Eubacteria. *Journal of Bacteriology*. v. 171, n. 12, p. 6689-6695.
- DEVEREUX, R.; SHAO-HUA, H.; DOYLE, C.L.; ORKLAND, S.; STAHL, D.A.; LeGALL, J.; WHITMAN, W.B. (1990). Diversity and Origin of *Desulfovibrio* Species: Phylogenetic Definition of a Family. *Journal of Bacteriology*. v. 172, n.7, p. 3609-3619.
- DILLING, W.; CYPIONKA, H. (1990). Aerobic Respiration in Sulfate-Reducing Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. v. 71, p. 123-128.
- DREWELLO, R.; WEISSMANN, R. (1997). Microbially Influenced Corrosion of Glass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 47, p. 337-346.
- DSM (1991). Scientific Services of Culture Collections. Curso Ministrado na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas.
- DUQUETTE, D.J; RICKER, R.E. (1986). Electrochemical Aspects of Microbiologically Induced Corrosion. In: *International Conference on Biologically Induced Corrosion*. Gaythersburg. NACE. p.121-130

- EDYVEAN, R.G.J.; VIDELA, H.A. (1994). Biological Corrosion. *In: Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*. Ed(s) K.L. Garg, Neelima Garg, K.G. Mukerjii. v.2, p. 81-116.
- ENGLERT, G.E.; MÜLLER, I.L. (1996). The Corrosion Behavior of Mild and Stainless Steel in na Anaerobic Biodigester. *In: LABS 2 - BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION IN LATIN-AMERICAN – ANAIS*; p. 51-54.
- FINSTER, K.; LIESACK, W.; THAMDRUP, B. (1998). Elemental Sulfur and Thiosulfate Disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a New Anaerobic Bacterium Isolated from Marine Surface Sediment. v .64, n. 1, p. 119-125.
- FINSTER, K.; LIESACK, W.; TINDALL, B.J. (1997). *Desulofospira joergensenii*, gen. Nov., sp. nov., a new Sulfate-reducing Bacterium Isolated from Marine Surface Sediment. *Systematic Applied of Microbiology*. v. 20, p. 201-208.
- √ FONSECA, I.T.E.; LINO, A.R.; RAINHA, V.L. (1996). As Bactérias Redutoras de Sulfato e a Biocorrosão de Aços. *Corrosão e Proteção de Materiais*. v. 15, n.2, p. 6-14.
- GAYLARDE, C.C. (1992). Corrosion Associated with Sulfate-Reducing Bacteria of the Genera *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* and *Desulfobulbus*. *In: I LATIN-AMERICAN BIODETERIORATION SYMPOSIUM*; p. 185-191.
- GAYLARDE, C.C.; GLYN MORTON, L.H. (1997). The Importance of Biofilms in Microbial Deterioration of Constructional Materials. *Revista de Microbiologia*. v. 28, p. 221-229.
- GOMES, L.P. (1995). Avaliação da Atividade Bacteriana Anaeróbia Celulolítica do Chorume Originado em Sistema de Disposição de Resíduos Sólidos Urbanos à Céu Aberto. Tese (doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 210p.
- √ HAMILTON, W.A. (1985). Sulphate-Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion. *Annual Review Microbiology*. v. 39, p. 195-217.

- HAMILTON, W.A.; MAXWELL, S. (1986). Biological and Corrosion Activities of Sulphate-Reducing Bacteria Within Natural Biofilms. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICALLY INDUCED CORROSION*. Gaythersburg. NACE. p.131-136.
- HANSEN, T.A. (1994). Metabolism of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 66, p. 165-185.
- HUNGATE, R.E. (1969). A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *In: Methods in Microbiology*. Ed(s) O.R. Norris, D.W. Ribboivs. Vol. 3b New York Academic; p. 117-132.
- ISAKSEN, M.F.; JØRGENSEN, B.B. (1996). Adaptation of Psychrophilic and psychrotrophic Sulfate- Reducing Bacteria to Permanently Cold Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 2, p. 408-414.
- ✓ JOHANSEN, S.S.; LICHT, D.; ARVIN, E.; MOSBAEK, H. (1997). Metabolic pathways of quinoline, indole and their methylated analogs by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 47, p. 292-300.
- JØRGENSEN, B.B. (1990). A Thiosulfate Shunt in the Sulfur Cycle of Marine Sediments. *Science*. v. 249, p. 152-154.
- JØRGENSEN, B.B. (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxid interface environments. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B.*; v. 298, p. 543-561.
- JØRGENSEN, B.B.; BAK, F. (1991). Pathways and Microbiology of Thiosulfate Transformations and Sulfate Reduction in a marine Sediment (Kattegat, Denmark). *Applied and Environmental Microbiology*. v. 57, n. 3, p. 847-856.

- KLEMPES, R.; CYPIONKA, H.; WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1985). Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Archives of Microbiology*. v. 143, p. 203-208.
- KNOBLAUCH, C.; SAHM, K.; JORGENSEN, B.B. (1999). Psychrophilic Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from Permanently Cold Arctic Marine Sediments: Description of *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov. sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov. sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 49; p. 1631-1643.
- KREMER, D.R.; NIENHUIS-KUIPER, H.E.; TIMMER, C.J.; HANSEN, T.A.(1989). Catabolism of malate and related dicarboxylic acids in various *Desulfovibrio* strains and the involvement of an oxygen-labile NADPH dehydrogenase. *Archives of Microbiology*. v. 151; p.34-39.
- LAANBROEK, H. J.; PFENNIG, N. (1981). Oxidation of Short-Chain Fatty Acids by Sulfate-Reducing Bacteria in Freshwater and in Marine Sediments. *Archives of Microbiology*. v. 128, p. 330-335.
- LAANBROEK, H.J.; GEERLIGS, H.J.; SIJTSMA, L.; VELDKAMP, H. (1984). Competition for Sulfate and Ethanol Among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* Species Isolated from Intertidal Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 47, n. 2, p. 329-334.
- LEE, W.; CHARACKLIS, W.G. (1993). Corrosion of Mild Steel Under Anaerobic Biofilm. *Science*. v. 49, n. 03, p. 186-199.
- LEU, J-Y; McGOVERN-TRAA, C.P.; JR PORTER, A.; HAMILTON, W.A. (1996). Thermophilic Sulfate Reducers Present In Production Waters from North Sea Oil Field. <<http://sol.oc.ntu.edu.tw/aot/1996/354/354p395.htm>>



LIU, C.; PECK JR., H.D. (1981). Comparative Bioenergetics of Sulfate Reduction in *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* spp. *Journal of Bacteriology*. v. 145, n. 2, p. 966-973.

LIU, Y. (1998). Energy uncoupling in microbial growth under substrate-sufficient conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 49. p. 500-505.

LOVLEY, D.R.; WIDMAN, P.K.; WOODWARD, J.C.; PHILLIPS, E.J.P. (1993). Reduction of uranium by Cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 59, n. 11, p. 3572-3576.

LOWE, S.E.; JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G. (1993). Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity or Substrates. *Microbiological Reviews*. v. 57, n. 2, p. 451-509.

MAGALHÃES, F.C.M.; SOUZA JR., H.A.; PENNA, M.O.; SEBASTIÁN, G.V.; SILVA, E.D.; OLIVEIRA, H.B.; ANDRADE, C.A. (1996). Biofouling and Sulfate Scale in Oil Production Systems Effects on Biocorrosion. *In: LABS 2 - BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION IN LATIN-AMERICAN*. p. 111-113.

MANAHAN, S.E. (1994). *Environmental Chemistry*. 811p

McCREADY, R.G.L.; GOULD, W.D.; COOK, F.D. (1983). Respiratory Nitrate Reduction by *Desulfovibrio* sp. *Archives of Microbiology*. v. 135, p. 182-185.

MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. (1974). A Serum bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating obligate Anaerobes. *Applied Microbiology*. v. 27, n. 05, p. 985-987.

MIN, H.; ZINDER, S.H. (1990). Isolation and Characterization of a Thermophilic Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* sp. nov. *Archives of Microbiology*. v. 153, p. 399-404.

MOAT, A. G.; FOSTER, J.W. (1988). *Microbial Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.; 597p.



- MONTENEGRO, M.A.P. (1994). *Avaliação da Comunidade Microbiana em reator Anaeróbio de manta de Lodo (UASB) Submetido a Aumentos Progressivos da Concentração do Íon Sulfato.* São Carlos, SP. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 186p.
- MORT, S.L.; DEAN-ROSS, D. (1994). Biodegradation of Phenolic Compounds by Sulfate-Reducing Bacteria from Contaminated Sediments. *Microbial Ecology*. v. 28, p. 67-77.
- OKABE, S.; NIELSEN, P.H.; CHARACKLIS, W.G. (1992). Factors Affecting Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in Continuous Culture: Limiting Nutrients and Sulfide Concentration. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 40, p. 725-734.
- VOLLIVIER, B.; CAUMETTE, P.; GARCIA, J.L.; MAH, R.A. (1994). Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. *Microbiological Reviews*. v. 58, n. 1, p. 27-38.
- OMIL, F.; LENS, P.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. (1998). Long-Term Competition Between Sulfate Reducing and Methanogenic Bacteria in UASB Reactors Treating Volatile Fatty Acids. *Biotechnology and Bioengineering*. v.57, n. 6, p. 676-685.
- OREN, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 63; n.02; p. 334-348.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; MAAS, R.N.; HARMSEN,H.J.M.; STAMS, A.J.M. (1995). *Desulfoharbdus amnigenus* gen. nov. sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. *Archives of Microbiology*. v. 164, p. 119-124.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VORSTMAN, W.J.C.; SOPJES, A.; STAMS, A.J.M. (1998). Characterization of the Sulfate-Reducing and Syntrophic Population in Granular Sludge from a Full-Scale Anaerobic Reactor Treating Papermill Wastewater. In: *Sulfate-Reducing Bacteria in Anaerobic Bioreactors*. Ed. S. J.W.H.Oude Elferink. p. 87-101.

- PAERL, H.W.; PINCKENY, J.L. (1996). A Mini-review of Microbial Consortia: Their roles in Aquatic Production and Biogeochemical Cycling. *Microbial Ecology*. v. 31, p. 225-247.
- PANKHURST, E.S. (1971). The Isolation and Enumeration of Sulphate-Reducing Bacteria. In: Isolation of Anaerobes. (Eds) D.A. Shapton, R.G. Board. Academic Press London-NY. p. 223-240.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. (1993). *Microbiology: Concepts and Applications*. McGraw Hill, N.Y.; 896p.
- PENG, C; PARK, J.K. (1994). Electrochemical Mechanisms of Corrosion Influenced by Sulfate-Reducing Bacteria in Aquatic Systems. *Water Research*. v. 28, n.08, p. 1681-1692.
- PETERSON, G.L. (1977). A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry *et al.* Which is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry*. v.83, p.346-356.
- POSTGATE, J.R. (1979). *The Sulphate-Reducing Bacteria*. Cambridge University Press. 145p.
- REIS, M.A.M.; ALMEIDA, J.S.; LEMOS, P.C.; CARRONDO, M.J.T. (1992). Effect of Hydrogen Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 40, p. 593-600.
- SANDERS, P.F.; HAMILTON, W.A. (1986). Biological and Corrosion Activities of Sulphate-Reducing Bacteria in Industrial Process Plant. In: *International Conference on Biologically Induced Corrosion*; Gaythersburg; NACE; 47-68p
- USHELTON, D.R.; TIEDJEI, J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. v.48; p.840-848.
- SMITH, R.L.; KLUG, M.J. (1981a). Electron Donors Utilized by Sulfate-Reducing Bacteria in Eutrophic Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 42, n. 1, p. 116-121.

- SMITH, R.L.; KLUG, M.J. (1981b). Reduction of Sulfur Compounds in the Sediments of a Eutrophic Lake Basin. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 41, p. 1230-1237.
- SONNE-HANSEN, J.; WESTERMANN, P.; AHRING, B.K. (1999). Kinetics of Sulfate and Hydrogen Uptake by the Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria *Thermodesulfobacterium* sp. Strain JSP and *Thermodesulfovibrio* sp. Strain R1Ha3. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 03, p. 1304-1307.
- SPEECE, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press. 394p.
- SPORMANN, A.M.; THAUER, R.K. (1988). Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans*. Demonstration of enzymes required for the operation of an oxidative acetyl-CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway. *Archives of Microbiology*. v. 150; p.374-380.
- STANDART METHODS (1992) For the Examination of Water and Wastewater. Ed(s) Arnold E. Greenberg, Leonore S. Clesceri, Andrew d. Eaton; AWWA-WEF; 18ª edição.
- ✓ STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. (1987). *General Microbiology*; 5ª edição; 689p.
- STARKEY, R. (1986). Anaerobic Corrosion – Perspectives about Causes. In: *International Conference on Biologically Induced Corrosion*. Gaythersburg. NACE. p.3-7.
- TARDY-JACQUENOD, C.; MAGOT, M.; PATEL, B.K.C.; MATHERON, R.; CAUMETTE, P. (1998). *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 48, p. 333-338.
- TEBO, B.M.; OBRAZTSOVA, A.Y. (1998). Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV) and Fe (III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*. v. 162, n. 1, p. 193-198.

- TERRY, T.M. (1998). Animation of the Sulfur Cycle.
<<http://virtual.class.uconn.edu/~terry/229sp99/Scycleanim.html>>
- TILLER, A.K (1986). A Review of the European Research Effort on Microbial Corrosion Between 1950 and 1984. In: *International Conference on Biologically Induced Corrosion*. Gaythersburg. NACE. p.8-28.
- VAN NIEL, E.W.J.; GOTTSCHALL, J.C. (1998). Oxygen consumption by *Desulfovibrio* Strains with and without Polyglucose. *Applied Environmental Microbiology*.v. 64, n. 03, p. 1034-1039.
- VARESCHE, M.B. (1997). *Estudo com Bactérias Fototróficas anoxigênicas: Enriquecimento, Isolamento, Caracterização e Cinética de Crescimento*. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Carlos; 343p
- VAZOLLER, R.F.(1993). *Avaliação do Ecossistema Microbiano de um Biodigestor Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo, Operado com Vinhaça sob Condições Termofílicas*. Tese (doutorado); Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 295p.
- VIDELA, H.A. (1981). *Biocorrosão Microbiológica*. Editora Edgard Blücher Ltda. 62p.
- VIDELA, H.A. (1996). *Manual of Biocorrosion*. CRC Press, Inc., 272p.
- VIDELA, H. A. (1995). *Corrosão Microbiológica e Biofouling em Sistemas Industriais*. In: *Manual prático de Biocorrosão e Biofouling para a Indústria*. Ed(s) M.D. Ferrari; M.F.L. de Mele; H.A. Videla. p. 4-26.
- VOORDOUW, G. (1995). The Genus *Desulfovibrio*: The Centennial. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 61, n. 8, p. 2813-2819.

WESTLAKE, D.W.S., SEMPLE, K.M., OBUEKWE, C.O. (1986). Corrosion by Ferric iron-Reducing Bacteria isolated from Oil Production Systems. In: International Conference on Biologically Induced Corrosion. Gaythersburg. NACE. p.193-200.

WHITE, D. (1995). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, Inc. 1 ed. 378p.

WIDDEL, F.; BAK, F. (1992). Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In: *The Prokaryotes*. Ed(s). A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer; v.2; p. 3352-3378.

WIDDEL, F.; HANSEN, T.A. (1992). The Dissimilatory Sulfate and Sulfur-Reducing Bacteria. In: *The prokaryotes*. Ed(s). A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer; v.1p. 583-616.

✓ WIDDEL, F. (1988). Microbiology and Ecology of Sulfate and Sulfur-Reducing Bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. Alexander J. B. Zehnder. p. 469-585.

WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1984). Dissimilatory Sulfate or Sulfur-Reducing Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Ed(s) N.R. Krieg and J.G. Holt. P.663-679.

ZEHNDER, A.J.B.; STUM, W. (1988). Geochemistry and Biochemistry of Anaerobic Habitats. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. Alexander J.B.Zehnder. John Wiley & Sons. p.1-38.

ANEXO A

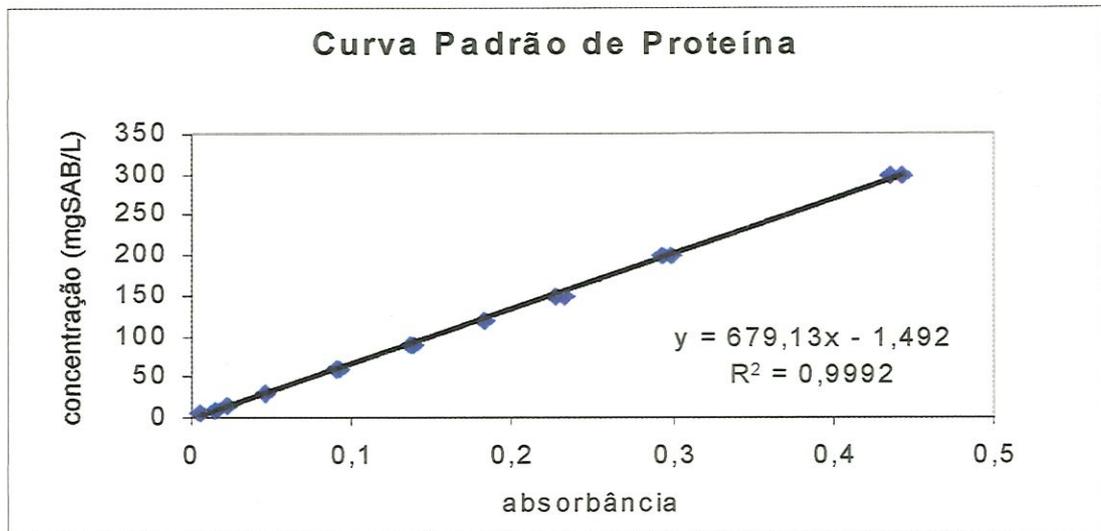


FIGURA A.1 - Curva padrão de proteína total

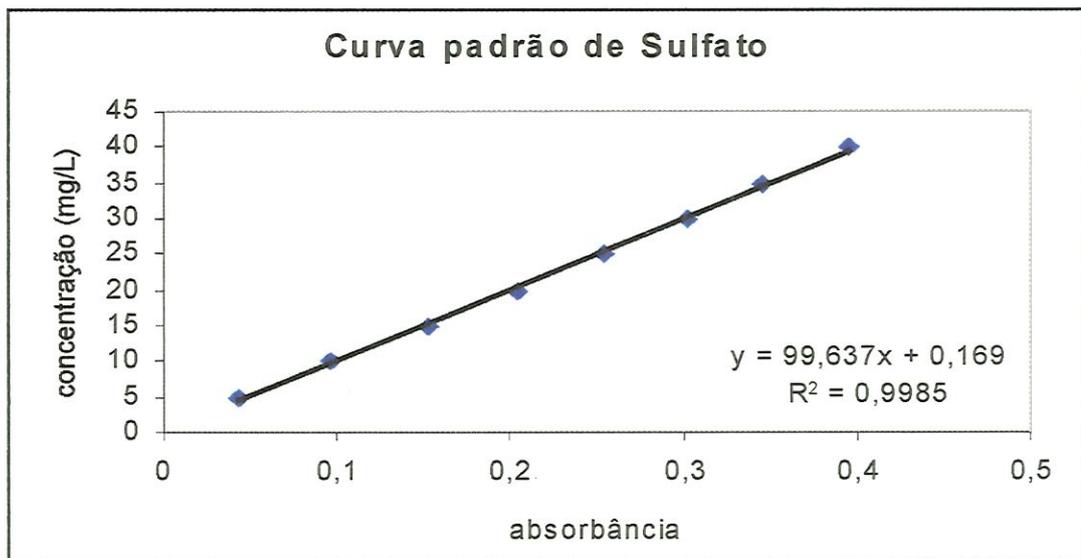
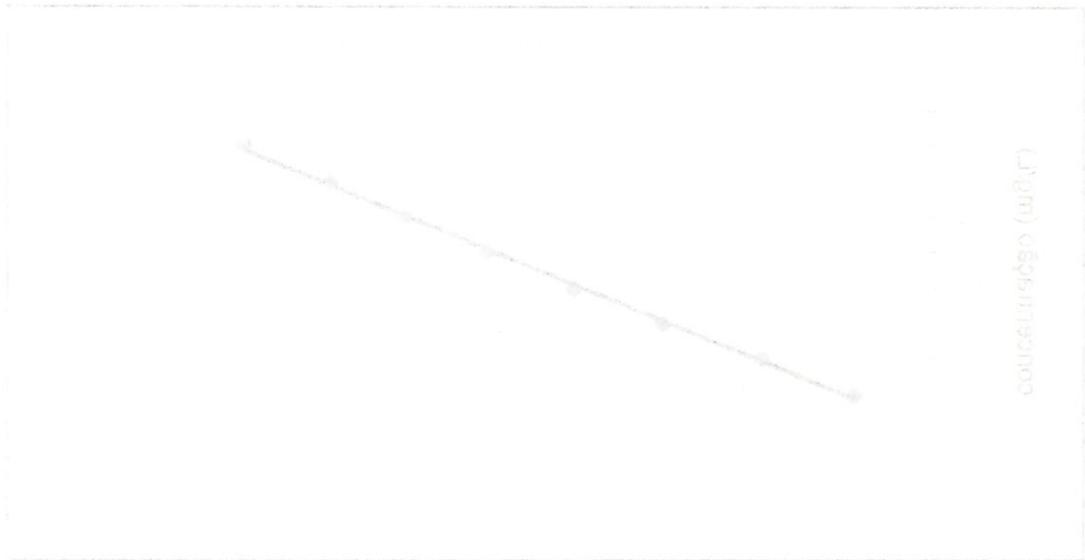


FIGURA A.2 – Curva padrão de sulfato



концентрация (µg/L)

концентрация (µg/L)

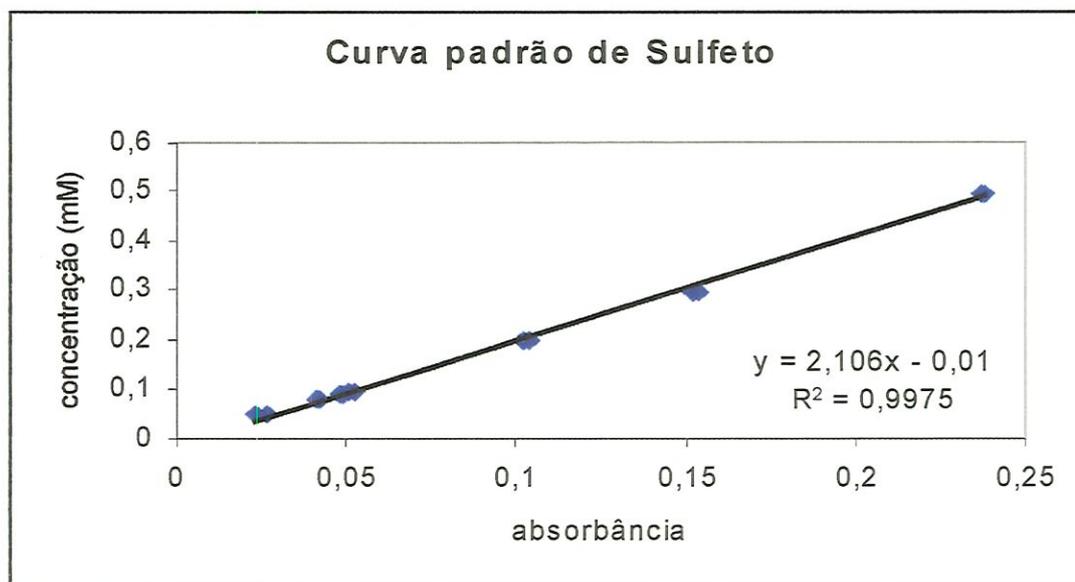


FIGURA A.3 – Curva padrão de sulfeto

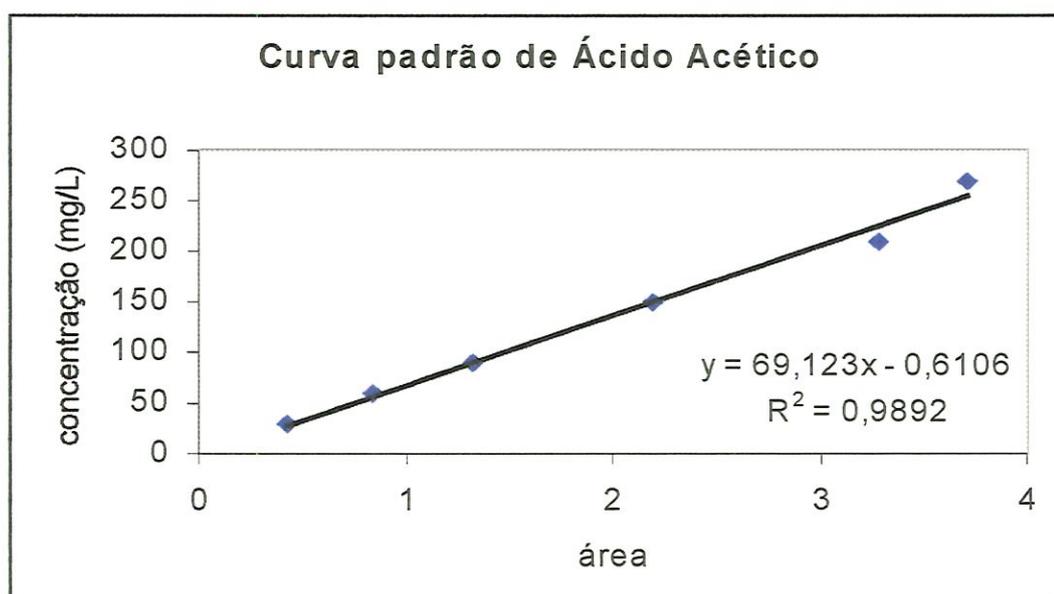


FIGURA A.4 – Curva padrão de ácido acético

(Mm) οξυαίματινος



(Mm) οξυαίματινος



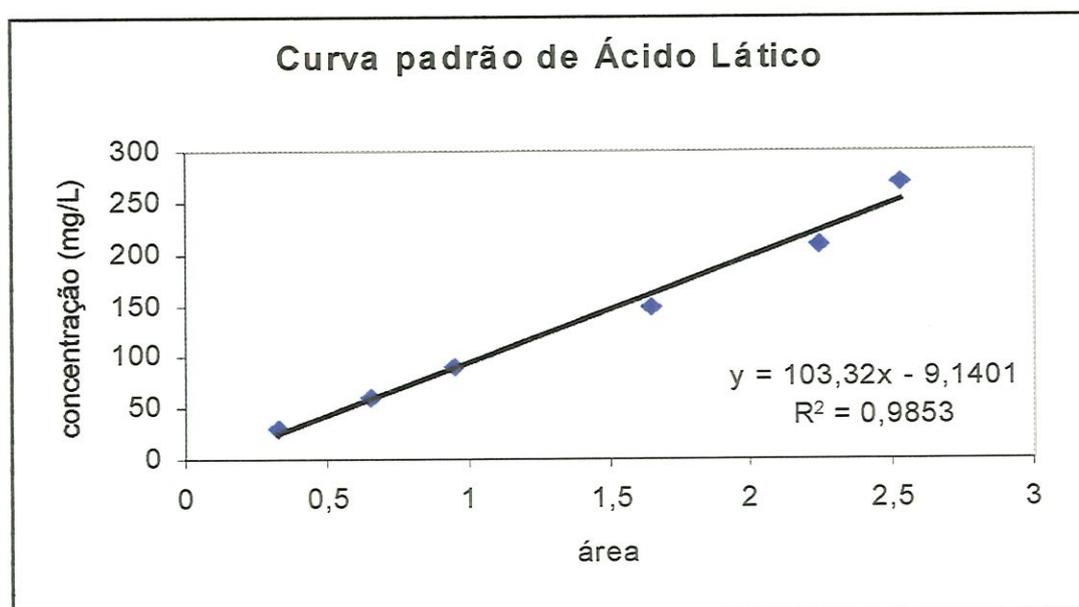
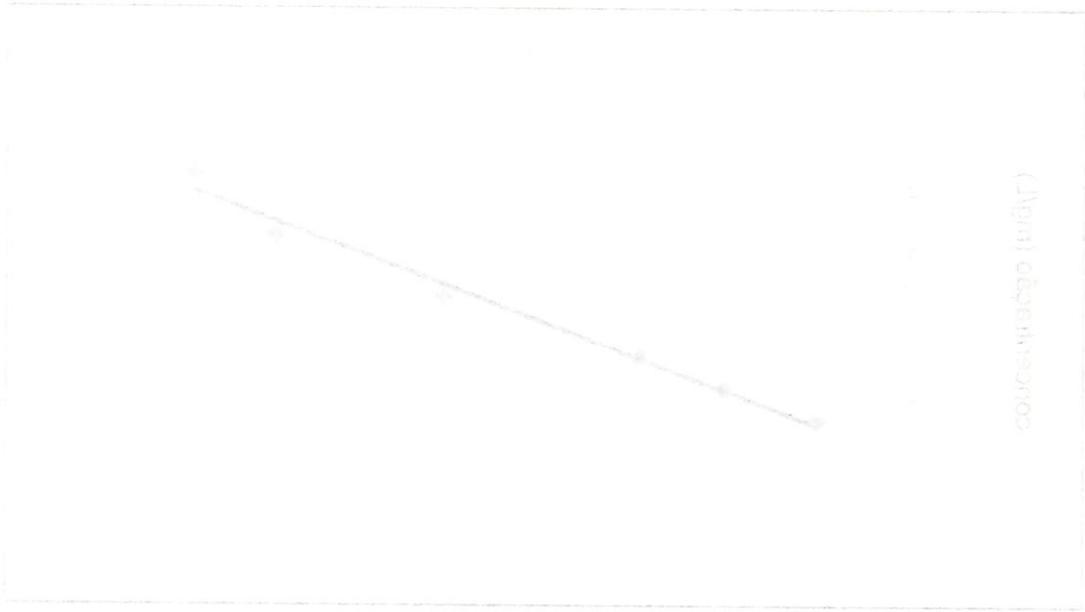


FIGURA A.5 – Curva padrão de ácido láctico



ANEXO B



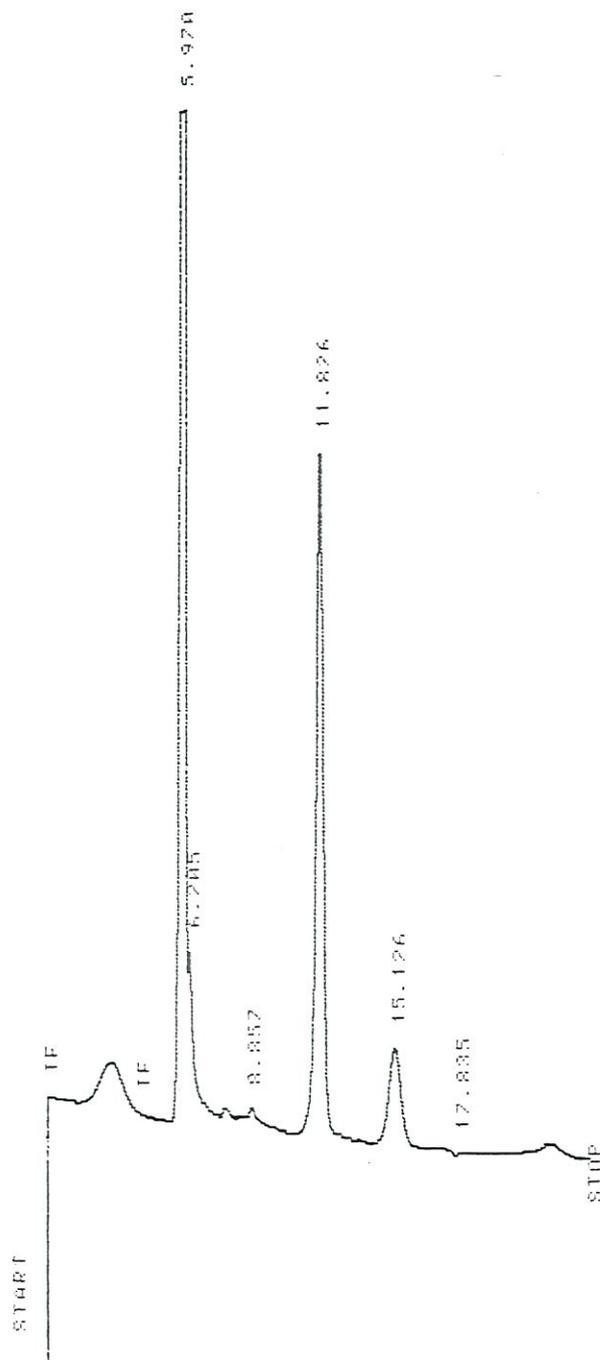


FIGURA B.1 Cromatograma obtido pela injeção do meio de cultura P.E.m, esterilizado e acrescido das soluções estoque. O tempo de retenção 5.970 corresponde ao sulfato presente tanto no meio de cultura quanto na fase móvel; o tempo de retenção 11.826 corresponde ao ácido láctico; o tempo de retenção 15.126 pode estar relacionado ao tioglicolato; os demais são desconhecidos.

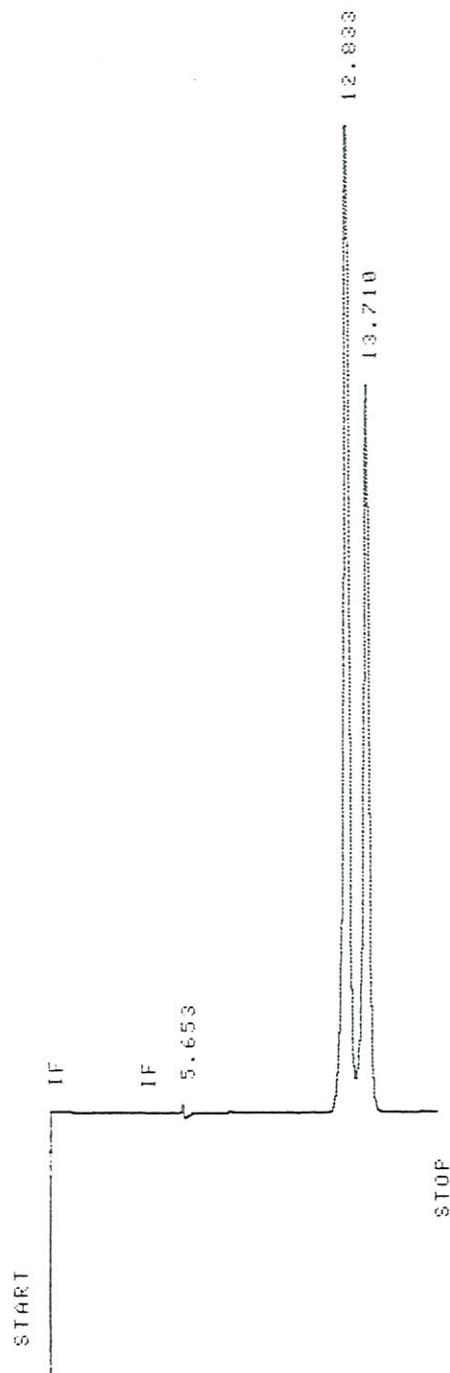


FIGURA B.2 Cromatograma obtido pela injeção de uma solução de ácido fórmico e acético. O tempo de retenção 13.710 corresponde ao ácido acético e o tempo de retenção 12.833 pode estar relacionado ao ácido fórmico.

1. The first part of the document is a list of names and titles, including the names of the authors and the titles of their works. This list is organized in a structured manner, likely serving as a table of contents or a reference list for the document.

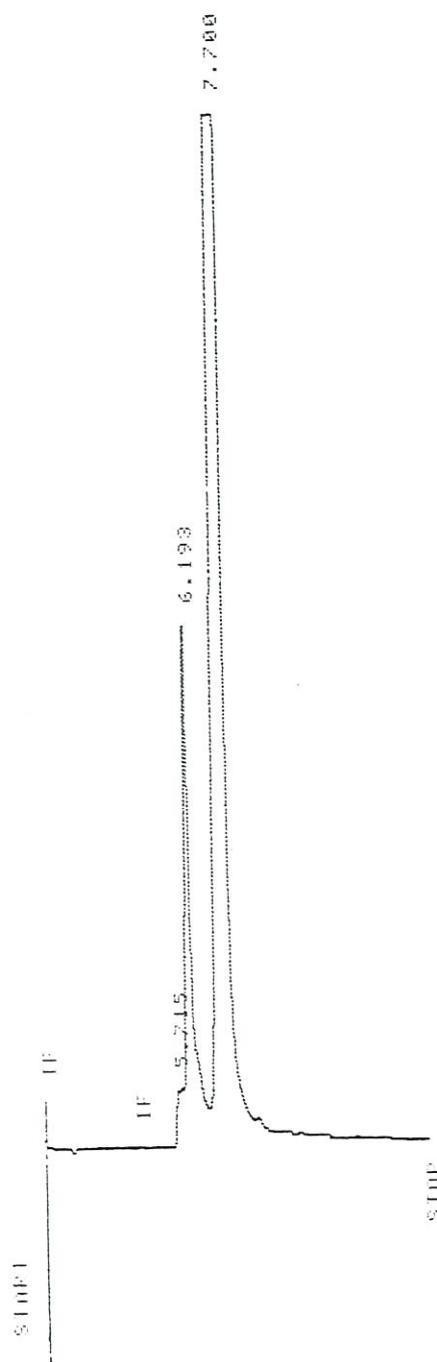


FIGURA B.3 Cromatograma obtido pela injeção de uma solução de ácido pirúvico. O tempo de retenção 6.193 corresponde ao sulfato presente na fase móvel e o tempo de retenção 7.700 pode estar relacionado ao ácido pirúvico.



APÊNDICE





Rio de Janeiro, 11.03.97.

Aos Professores do LPA-SHS-EESC-USP
Drº Eugênio Foresti e Drª Rosana Filomena Vazoller

Ref.: Projeto CENPES/PETROBRAS - FIPAI/USP.

Prezados Eugênio e Rosana,

Quanto à Dissertação de Mestrado da Bióloga Silvana de Queiroz Silva, consideramos ser de extrema importância, já que consolidará a capacitação técnica na área. Seria interessante, discutir-se a possibilidade de existir algum tipo de oficialização por parte das duas entidades (PETROBRAS/CENPES E USP/ LPA- SHS-EESC-USP). Para tal, numa primeira etapa, deveria ser apresentado o plano de ação da tese em questão.

Atenciosamente,

Fátima C. M. Magalhães

Fátima C. M. Magalhães

Mônica de O. Penna

Mônica de O. Penna



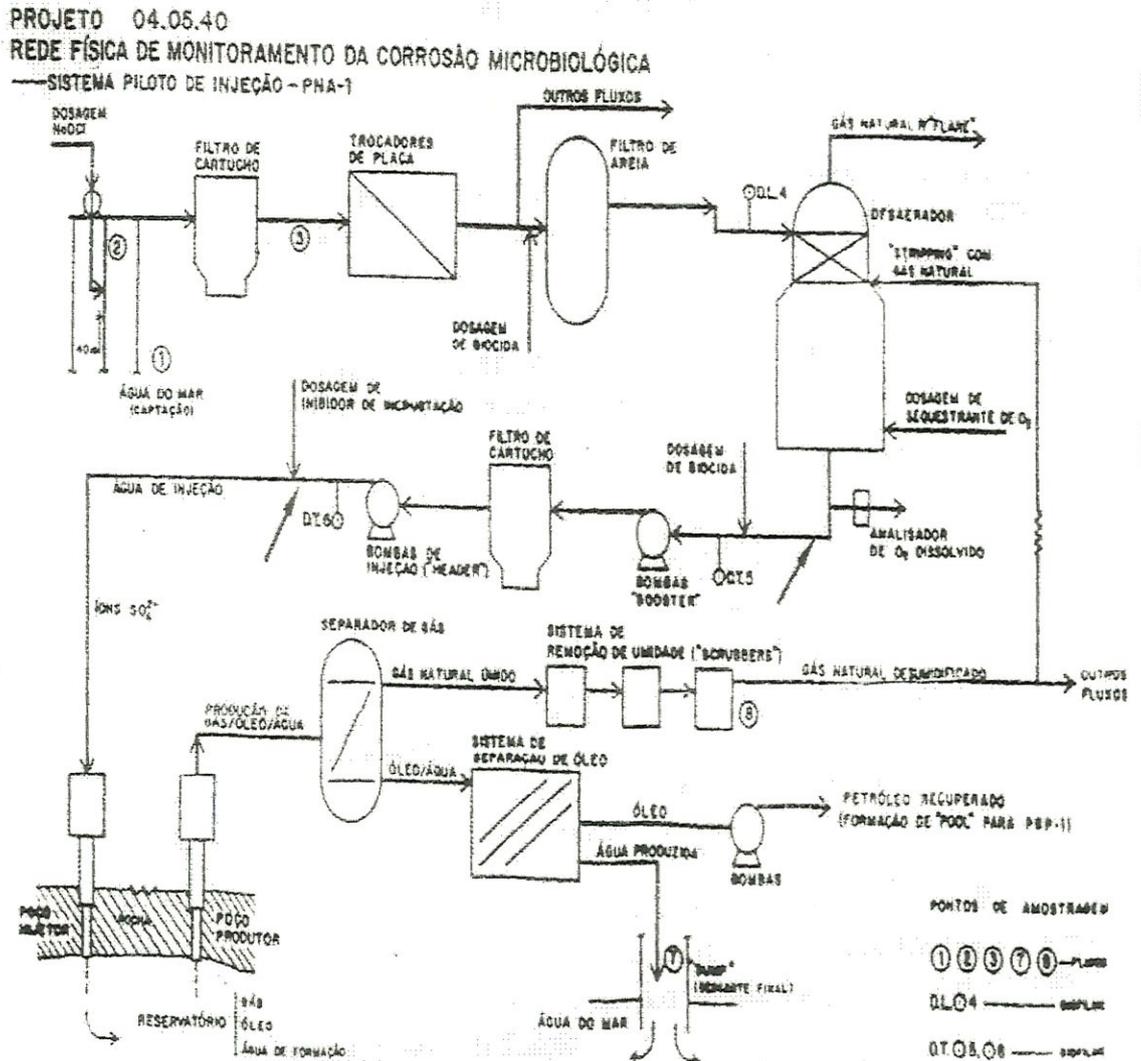


FIGURA C.2 - Origem da amostra SW1 (CENPES, 1996)

PROJETO DE MONITORAMENTO DE PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS
 SISTEMA DE CONTROLE DE QUALIDADE

