

Copyright 2012, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2012, em Salvador/BA no mês de maio de 2012.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NOS POTENCIAIS ELETROQUÍMICOS DO AÇO CARBONO, EM AMBIENTE MARINHO

Dauton L. F. Menezes^a, Caio T. C. C. Rachid^b, Raquel S. Peixoto^c,
Ricardo Coutinho^d, L. de Miranda^e, Selma G. F. Leite^f

Abstract

This work studied the influence of microorganisms in the electrochemical corrosion process, emphasizing the nature of biofilms in seawater. Assays were performed in the Baía dos Anjos, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. The material studied was SAE 1005 steel in the form of coupons. Samples were immersed in sea water of the bay and removed after 3, 5, 7, 11 and 15 days. It was observed regions with and without corrosion on the surface of the coupons, even after 15 days of immersion. The bacterial structure was studied by isolation and PCR-DGGE of the DNA adhered on the surface of the coupons. It was possible to detect a gradual community structure of the biofilm over the period of incubation, but no significant differences between the areas with and without corrosion apparent at the end of 15 days. Among the organisms isolated it were identified the genera *Vibrio* and *Pseudoalteromonas*.

Keywords: corrosion, biocorrosion, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*.

Resumo

A presente pesquisa visou estudar a influência de micro-organismos no processo de corrosão eletroquímica, enfatizando a natureza dos biofilmes formados em água do mar. Os ensaios foram realizados na Baía dos Anjos, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. O material estudado foi o aço SAE 1005 na forma de cupons. Amostras foram imersas na água da baía e retiradas após 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias. Foi visualmente verificada a existência de regiões com e sem corrosão na superfície dos cupons, mesmo após o último dia de imersão. A estrutura bacteriana foi estudada por isolamento e também por PCR-DGGE do DNA da superfície dos cupons. Foi possível detectar uma estruturação gradual da comunidade do biofilme ao longo do período de incubação, porém sem diferenças significativas entre as áreas com e sem corrosão aparente, ao final dos 15 dias. Entre os isolados foram identificados organismos pertencentes aos gêneros *Vibrio* e *Pseudoalteromonas*.

Palavras-chave: corrosão, biocorrosão, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*.

^a Doutorando, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

^{b,c} Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro

^d Ph.D., Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira - Marinha do Brasil,
Pesquisador

^e Doutor, COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro

^f Doutora, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Introdução

Corrosão metálica em um meio aquoso oxigenado é um fenômeno eletroquímico consistindo de uma reação anódica, envolvendo a oxidação do metal, e uma reação catódica baseada na redução de uma espécie química (1). Essas reações podem ser influenciadas por agentes microbianos, quando a participação de micro-organismos e/ou os produtos de atividades metabólicas são capazes de iniciar, facilitar ou acelerar a reação de corrosão, sem alterar sua natureza eletroquímica. Neste caso, o fenômeno passa a ser designado de Biocorrosão (2).

As superfícies metálicas, quando expostas a um ambiente marinho, correspondem a importantes habitats microbianos, uma vez que os nutrientes podem se adsorver a estas; como consequência, a quantidade de micro-organismos e suas atividades são normalmente muito superiores nas superfícies que no meio (3).

Os microrganismos são uma fonte abundante de metabólitos bioativos estruturalmente diferentes (4). A formação de um biofilme e as reações resultantes da interação entre os metabólitos bacterianos e os metais são consideradas as principais causas relativas à corrosão microbiológica (5,6,7,8). Outro fator significativo é o pH na interface metal/solução eletrolítica, possuindo importante papel na formação de depósitos calcários e biofilme (9).

Nos últimos anos, bactérias gram-negativas, heterotróficas têm atraído a atenção de pesquisadores, por sua produção de vários compostos fisiologicamente ativos (10). Inúmeras bactérias heterotróficas marinhas são conhecidas por produzirem substâncias antibacterianas, as quais matam ou inibem a fixação de outras bactérias (11,12).

Em um estudo prévio, sobre a dinâmica da corrosão, Menezes e colaboradores (13) verificaram alterações nos potenciais eletroquímicos sob a superfície de cupons em aço carbono SAE 1005 logo a partir do terceiro dia de incubação em ambiente marinho. Contudo, foi observada a formação e a transformação de sais de enxofre, somente a partir do quinto dia de imersão. Esse fenômeno foi associado à provável presença de micro-organismos. Desta forma, o presente estudo, objetiva avaliar a formação da comunidade microbiana nos cupons, assim como identificar potenciais agentes no processo de biocorrosão.

Metodologia

Foram utilizados cupons em aço carbono SAE 1005 de dimensões 50 mm x 50 mm x 2mm e composição nominal verificada segundo método ASTM E415 (%pp; C:0,049; S:0,013; P:0,013; Mn: 0,290; Si:0,018; Cr:0,027; Ni:0,024; Mo:0,004; Fe: balanço).

As chapas foram submetidas à limpeza de superfície por jateamento abrasivo seco com granalha de aço, grau Sa 3 (metal branco) da Norma Sueca SIS 05 59 00. Fios de cobre recobertos com capa isolante foram soldados nas bordas superiores das chapas, tendo suas extremidades soldadas recobertas com massa epóxi; as bordas foram recobertas com tinta anticorrosiva epóxi de dois componentes e alta espessura, livre de alcatrão, alto conteúdo de sólidos e secagem rápida (3,5 horas).

Em seguida, os cupons (10 peças) foram colocados em dessecador, até a imersão nos tanques de 250 litros, de água salgada, para início dos ensaios. A água do mar no interior dos tanques foi mantida em recirculação durante os 15 dias de ensaios, a uma vazão aproximada de 2 litros/minuto. Retiradas dos cupons, em duplicata, foram efetuadas nos seguintes tempos de incubação: 3, 5, 7, 11 e 15 dias. Ao final do 15º dia, os cupons ainda mostravam áreas visualmente distintas, com e sem a presença de corrosão aparente.

Análises físico-químicas da água do mar foram realizadas em cada tanque com medição da temperatura da água do mar empregada, pH, concentração de O₂ e salinidade, não sendo possível o controle abiótico do ambiente, por se trata de um sistema aberto, simulando o ambiente real, o mar aberto. Assim, seus parâmetros variaram conforme o fluxo natural da água do mar.

Análises microbianas foram compostas pela avaliação da estrutura da comunidade bacteriana, através de reação de polimerização em cadeia (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) - e isolamento bacteriano, através de meio específico para detecção qualitativa de bactérias sulfato redutoras (BRS) - Postgate E, conforme descrito por HARRISON (1982) e POSTGATE (1984). Deve ser ressaltado que foi adotado como critério de envio para o seqüenciamento apenas um isolado de cada morfotipo detectado.

Para se proceder à extração do DNA total, para avaliação da estrutura da comunidade bacteriana dos cupons, foi feita primeiramente, raspagem cuidadosa da superfície dos cupons com espátula estéril em solução salina estéril, a fim de retirar o produto aderido na superfície metálica, oriundo de processo corrosivo e biofilme. No cupom metálico incubado no tempo 15 dias, foram retirados produtos das duas áreas definidas em análise visual – área com corrosão e área sem corrosão – separadamente. O DNA total foi extraído com o auxílio do kit de isolamento UltraClean Microbial DNA[®] (MoBio Laboratories), de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação da diversidade de bactérias, o DNA extraído das placas metálicas foi submetido a uma reação PCR para seleção e amplificação de um gene específico desse grupo. Para isso, foi utilizado o par de iniciadores U968-GC (5'- **CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC** – 3') e L1401 (5' - **GCG TGT GTA CAA GAC CC** – 3') que codificam para as regiões V6 até a V8 do gene 16S rRNA (*rrs*) (16). Um grampo rico em bases CG foi adicionado á extremidade de um primer de cada par para melhorar o comportamento desnaturante dos fragmentos amplificados (17).

O produto de PCR foi obtido com uma desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C e um ciclo de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados pela técnica de DGGE (18), com a utilização do equipamento Dcode[™] Universal Mutation Detection System (Bio-Raid), em géis de poliacrilamida (6%) preparados com a mistura de acrilamida/bisacrilamida na proporção 37,5:1 (m:m) em tampão TAE 1X (10 mmol/L tris-acetato, 0,5 mmol/L EDTA pH 8,0), com gradiente de 40 % a 70 %.

Aproximadamente 30 µl do produto de PCR foram aplicados em cada slot do gel. A eletroforese foi desenvolvida com 75 V a 60 °C por 16 horas. Após a corrida, os géis foram

corados com SybrGreen® (Molecular Probes) e escaneados com o scanner Storm® (GE Healthcare).

A estrutura das comunidades bacterianas foi avaliada com base no perfil de bandas do gel de DGGE, com o auxílio do programa BioNumerics 6.5 (Applied Maths NV). O perfil das bandas foi transformado em matrizes qualitativas, a partir da qual foi montado o dendograma de similaridade, utilizando-se o coeficiente de Jaccard como coeficiente de similaridade e Ward como método de agrupamento. As matrizes ainda foram utilizadas para determinação do índice de Shannon, com o auxílio do programa Past V2.04 (19).

Já para a identificação molecular dos isolados, o DNA genômico foi extraído e o gene rrs de cada isolado foi amplificado com a utilização dos iniciadores universais para o domínio Bacteria, 27f (5'- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG - 3') e 1492r (5' – GTT TAC CTT GTT ACG ACT T – 3') (LANE, 1991), foram utilizados para a amplificação do gene 16S rRNA, a partir de uma reação de PCR em uma mistura de 50 µl contendo 5 µl de tampão 10X (fermentas), 2,0 mmol/L MgCl₂, 0,2 mmol/L dNTP, 5 µmol/L de cada primer, 10 ng da amostra de DNA, e 2,5 U de Taq DNA polymerase (Fermentas). O produto (aproximadamente 1480 pb) foi obtido com uma desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 50 °C por 1 min., 72 °C por 2,5 min. e um ciclo de extensão final de 10 min a 72 °C. O gene amplificado foi purificado em gel de agarose com o auxílio do kit de purificação “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). O sequenciamento foi executado com a utilização de um sequenciador de capilar automático ABI-3730 (Applied Biosystems), a partir de uma reação de sequenciamento utilizando os dois iniciadores da extremidade 27f e 1492r, assim como dois iniciadores de regiões intermediárias da sequência nas posições 532 (5' – CGT GCC AGC AGC CGC GGT AA – 3') e 907 (5' – CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT – 3') (20).

Os eletroferogramas de sequenciamento foram processados utilizando o programa Phred (21) a partir da pipeline Stingray (22), para a definição das sequências e trimagem das sequências de baixa qualidade (Phred < 20). Os contigs foram montados e as sequências orientadas com a utilização do programa Bioedit 7.0.5.3 (23).

Para a montagem da árvore filogenética, as sequências de organismos Tipo mais similares foram obtidas a partir da ferramenta SeqMatch na pipeline do Ribossomal Database Project (24), e para a determinação dos vizinhos mais próximos, as sequências dos isolados foram submetidas ao Align da pipeline Greengenes (25). Os dados foram reunidos em um único arquivo fasta, que foi realinhado e editado manualmente com a utilização da ferramenta ClustalW, disponível no programa MEGA 5.0 (26). Os filogramas foram construídos e editados com a utilização do MEGA 5.0 com o método Maximum Likelihood, Jukes Cantor (27) e valor de bootstrap de 1000.

Resultados e discussão

Durante o período de observações, o valor médio da temperatura da água do mar nos tanques foi de $25.36 \pm 1,02$ °C; com $\text{pH} = 8.39 \pm 0,09$; concentração de $\text{O}_2 = 4.53 \pm 0,09$ ml/l; e salinidade = $35,23 \pm 0,66$ ‰.

Muito embora nenhum processo corrosivo tenha sido visualizado a olho nu em áreas bem definidas de vários cupons (figura 1), as curvas de polarização dos cupons realizadas, e não apresentadas integralmente aqui, exemplificadas na figura 2, indicaram início de processo clássico de dissolução anódica já no terceiro dia de imersão, embora com velocidades bem distintas. Nestas curvas, observou-se a existência de uma característica redutora acentuada, em maior grau nas áreas que visualmente não houve indício de corrosão.

Outrossim, a faixa de potencial na qual as curvas de polarização encontram-se inseridas é de -300 mV (SCE) a -1000 mV (SCE). Esta é a faixa mais redutora da região de estabilidade da água do mar (28). Pode-se assim inferir que as reações existentes no meio em estudo estão relacionadas provavelmente com os mecanismos de síntese de produtos biológicos, com características redutoras, protegendo estas áreas, sem a participação da água.

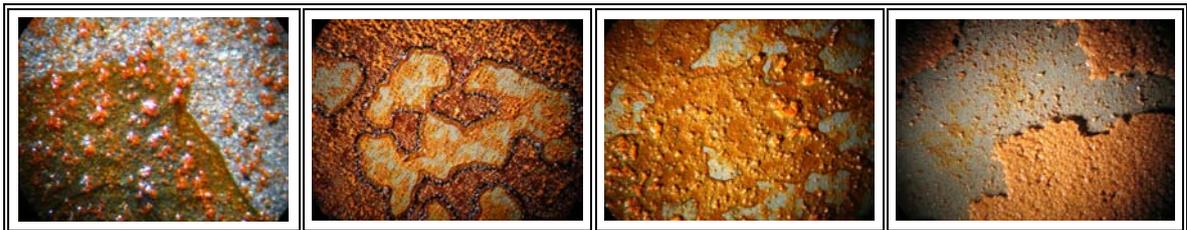


Figura 1 - Fotografias exemplificativas das superfícies de cupons apresentando áreas delimitadas, onde não foram observadas visualmente ocorrências de corrosão.

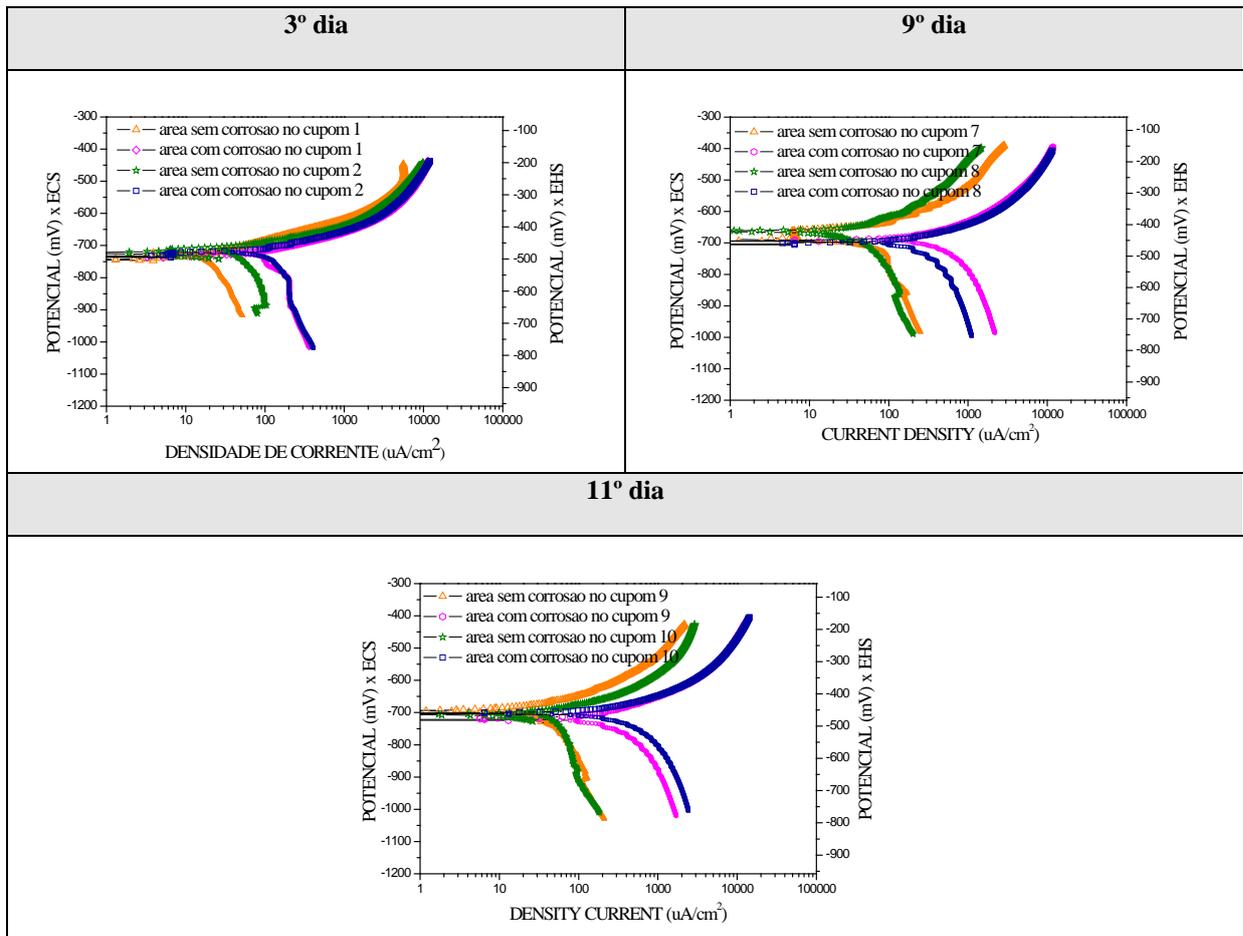


Figura 2 – Diagramas exemplificativos mostrando as curvas de polarização ao longo do tempo (dias de imersão), para áreas com corrosão (curvas rosa e azul) e sem corrosão (curvas verde e laranja) em um mesmo cupom. A cada dia foram retirados cupons em duplicata.

Embora tenham sido detectadas alterações no potencial eletroquímico dos cupons metálicos já no terceiro dia de incubação (13), a reação de PCR para o gene *rrs* foi negativa neste mesmo período, sugerindo que: (i) Não há comunidade bacteriana estabelecida na placa neste estágio inicial de colonização; (ii) A comunidade bacteriana estabelecida é muito pequena, e não pode ser detectada pela técnica de extração e amplificação de DNA utilizada.

Somente a partir das amostras incubadas por cinco dias foi possível detectar a presença do gene *rrs*. A análise de DGGE (Figura 3) mostra uma formação gradual da comunidade, ao longo do processo de incubação. O aumento de complexidade se evidencia pelo gradual acréscimo do número de bandas, e conseqüente aumento na diversidade da comunidade como expresso pelo índice de Shannon (Figura 4).

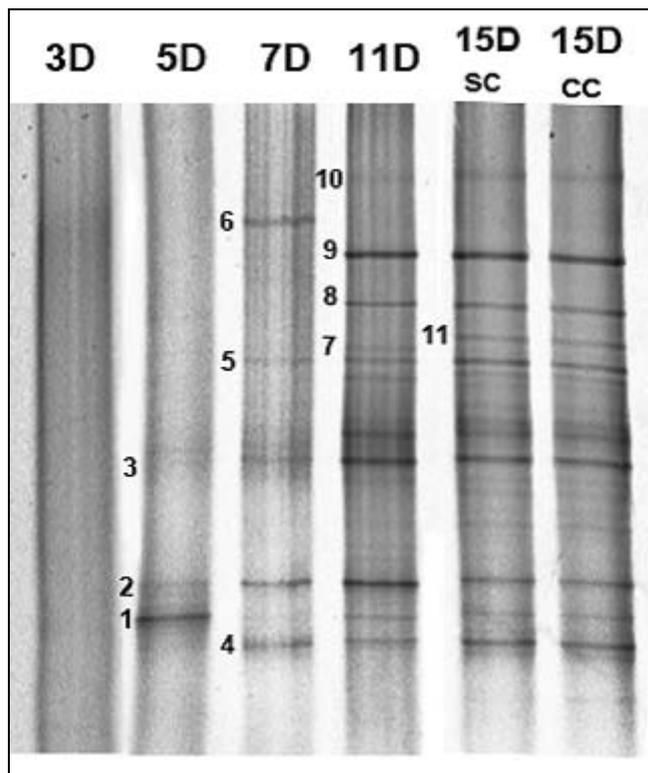


Figura 3 - Perfil de fragmentos do gene *rrs*, separados por DGGE (gradiente 40-70%), amplificados a partir do DNA extraído dos cupons metálicos nos tempos de incubação 3, 5, 7, 11 e 15 dias.

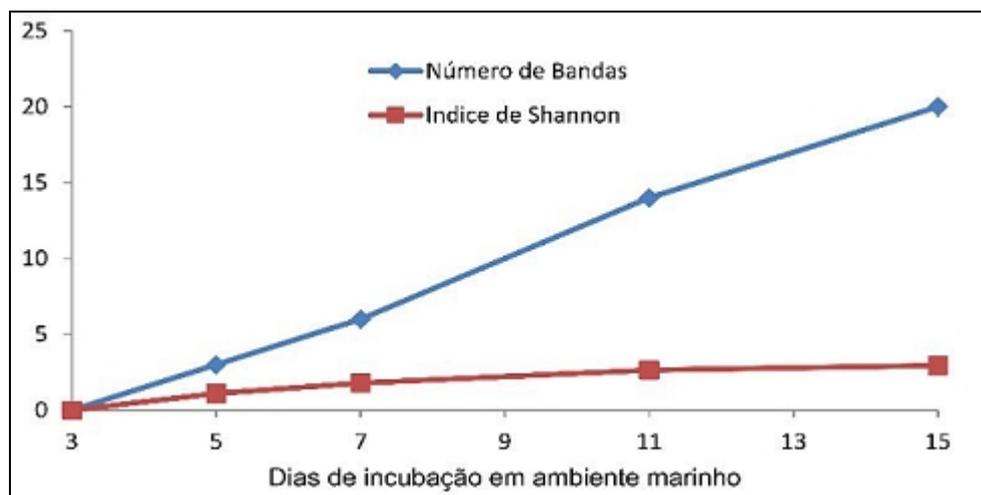


Figura 4 - Número de bandas observadas e Índice de Shannon calculado com base no perfil de fragmentos do gene *rrs* no gel de DGGE, ao longo do período de incubação.

O DGGE mostra que o ribotipos (bandas) que se estabelecem em determinado tempo de incubação tendem a permanecer durante todo o processo de formação do biofilme, como é o caso dos ribotipos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 e 10 que uma vez detectados continuam presentes nos tempos de incubação subsequentes. Apenas os ribotipos 6 e 7 são detectados apenas uma vez e não nos tempos seguintes, sugerindo se tratar de colonizadores eventuais ou espécies transientes.

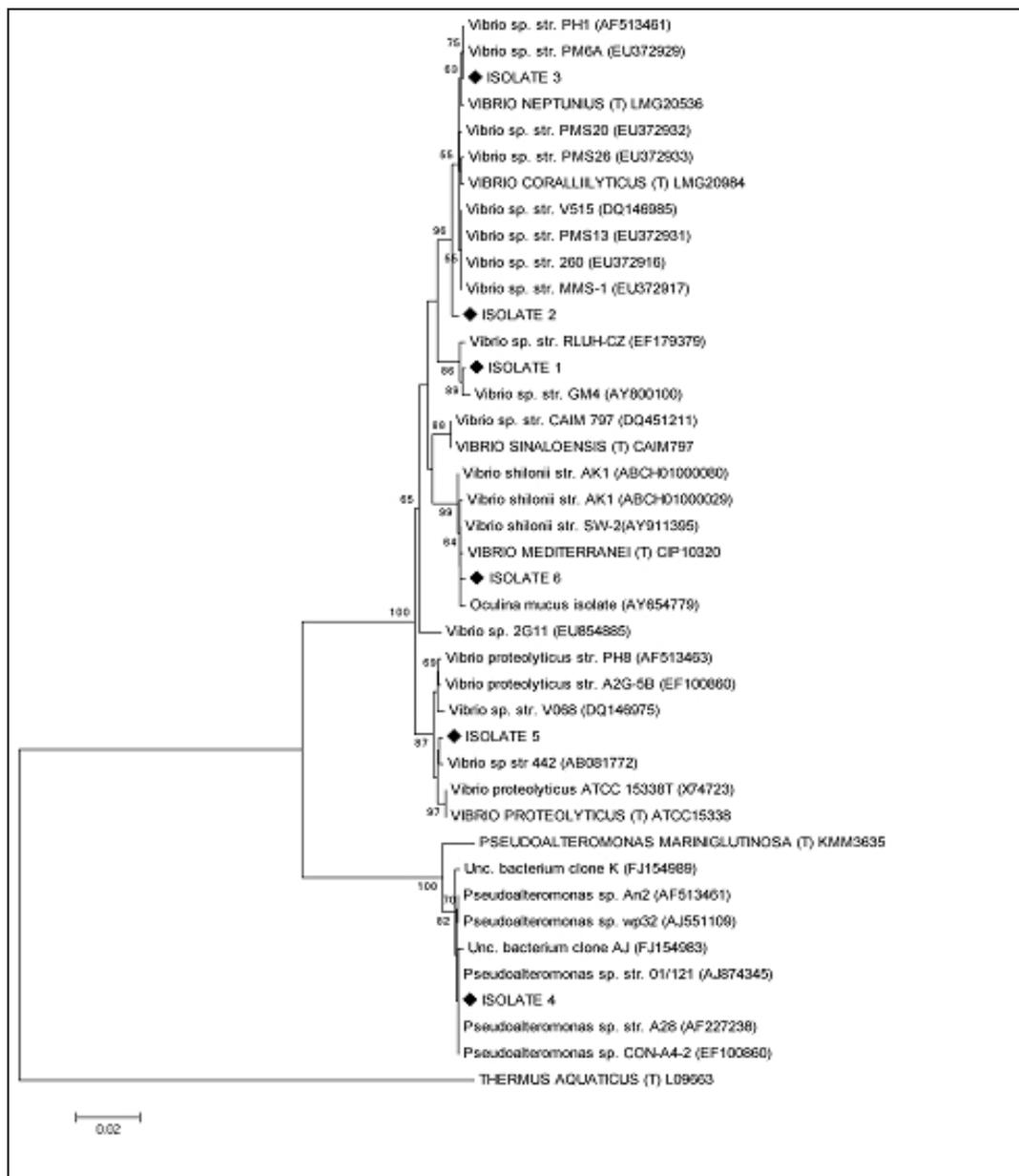


Figura 5 – árvore filogenética contendo as seis estirpes bacterianas isoladas das superfícies metálicas dos cupons. Os valores em cada nó representam a porcentagem do valor de bootstrap.

Ao total foram isoladas da superfície dos cupons metálicos 6 estirpes bacterianas. O sequenciamento do gene *rrs* desses isolados e sua análise filogenética mostrou a presença de apenas 2 gêneros diferentes: *Vibrio* e *Pseudoalteromonas* (Figura 5). Os isolados 1, 2, 3 e 6 apresentaram alta similaridade com mais de uma espécie, das quais se destacam *V. neptunus*, *V. corallilyticus*, *V. shilonii*, *V. sinaloensis* e *V. mediterranei*, além de vários isolados sem designação específica. Apenas o isolado 5 parece ter uma definição mais clara em nível de espécie, com um agrupamento bastante definido com o grupo de *V. proteolyticus*. O isolado 4 diferiu dos demais, sendo classificado dentro do gênero *Pseudoalteromonas*, sem definição específica contudo.

A busca de informações genômicas no banco de dados do National Center for Biotechnology mostrou que as espécies de *Vibrio* que apresentaram maior similaridade com os isolados obtidos estão relacionados, de uma maneira geral, com vibrioses diversas em corais, moluscos e peixes, como exemplificado em (29) e (30). Também mostrou que bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* secretam proteínas empregadas em vários processos celulares inclusive no de eliminação de potenciais organismos competidores no meio ambiente, através da excreção de proteínas com atividade antimicrobiana e outros fatores virulentos; além da produção de proteases com potente atividade algicida (31)(32)(33)(34).

A maior similaridade dos isolados com organismos associados a algum tipo de doença reside, provavelmente, na maior disponibilidade de informações sobre organismos patogênicos que existe nos bancos de dados, e representa um viés da técnica produzido pela escassez de informações sobre microrganismos que não possuem interesse médico.

Com relação a atividade específica desses micro-organismos no processo corrosivo ou protetivo de superfícies metálicas em aço carbono imersas em água do mar em fluxo natural não foram encontrados estudos específicos que demonstrassem sua participação, principalmente em águas tropicais. Tal fato pode ser provavelmente explicado pelo fato de que a maioria dos experimentos relacionados à inibição da corrosão ser conduzido em laboratório, em meio rico em nutriente, ocasionando resultados não reprodutíveis no meio ambiente. A competição natural irá determinar os microorganismos que sobrevivem no biofilme, ocasionando o domínio de microorganismos dominantes por semanas.

Conclusões

Analisando-se as curvas de polarização apresentadas, verifica-se a existência de uma característica redutora acentuada, em maior grau nas áreas que visualmente não se observa indício de corrosão, o que denota a presença de compostos, com características redutoras, protegendo estas áreas. O fato das curvas de polarização encontrarem-se inseridas em uma faixa mais redutora da região de estabilidade da água permite inferir que as reações existentes no meio em estudo estão relacionadas com os mecanismos de síntese de produtos biológicos.

Também, foi verificado um aumento na diversidade da comunidade ao longo dos 15 dias, com tendência à estabilização. A colonização, por sua vez, é promovida por espécies perenes, com poucas espécies transitórias.

Na forma como foram conduzidos os experimentos e segundo a metodologia utilizada neste trabalho, foi possível o isolamento de apenas 6 morfotipos distintos e a identificação de 2 gêneros: *Vibrio* e *Pseudoalteromonas*.

Apenas os *Vibrios*, apresentaram alta similaridade com mais de uma espécie, das quais se destacam *V. neptunus*, *V. corallilyticus*, *V. shilonii*, *V. sinaloensis* e *V. mediterranei*, além de vários isolados sem designação específica. Apenas um isolado parece ter uma definição mais clara em nível de espécie, com um agrupamento bastante definido com o grupo de *V. proteolyticus*.

Tais resultados podem representar, em estudos futuros, a necessidade da utilização de diferentes meios de cultivo, a fim de possibilitar o aumento do espectro de obtenção dos isolados, bem como do refino da técnica de biologia molecular para identificação dos outros organismos visualizados nas bandas.

Referências bibliográficas

- (1) VIDELA, H. A. **Manual of Biocorrosion**, USA: CRC Press, Inc., 1996, p. 272.
- (2) BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C. Recent Advances in the Study of Biocorrosion – an interview: **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p. 177-190, 1999.
- (3) MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, p. 607.
- (4) CETINA, A.; MATOS, A.; GARMA, G. *et al.* Actividad antimicrobiana de bacterias marinas aisladas del Golfo de México. **Revista Peruana de Biología**, vol. 17, n. 2, p. 231-236, ago. 2010.
- (5) VIDELA, H. A. An updated overview on biocorrosion monitoring and prevention. In: 2nd NACE – Latin American Region Corrosion Congress, 1996. NACE International, Houston, TX, 1996.
- (6) KEDDAM, M.; MONFORT, M. N.; TRIBOLLET, B. Detection and mapping of SRB influenced corrosion of C-Steel. In: NACE INTERNATIONAL, Corrosion 2002, paper n. 02447.
- (7) SANTOS, L. A. *et al.* A influência do biofilme formado em cupons metálicos AISI 1005, In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECiMat); 2008.
- (8) GIBBON, D. L.; ZAMANZADEH, M. Detection and identification of microbially influenced corrosion (MIC) in Steels. In: **CORROSION 2008**, paper n. 08502, p.1-14, 2008. Disponível em: < <http://web.nace.org/departments/store>>. Acesso em: 13 março. 2010.
- (9) NUNES, L. P. **Fundamentos de resistência à corrosão**. Interciência: IBP: ABRACO, 2007.
- (10) IVANOVA, E. P.; MIKHAILOV, V. Y. A New family, *Alteromonadaceae* fam. Nov., including marine proteobacteria of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, e *Colwellia*. *romonadaceae* fam. Nov., including marine Proteobacteria of the genera *Alteromonas*. **Mikrobiologia**, 70(1):15-23, Jan-Feb 2001.
- (11) NAIR, S.; SIMIDU, U. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2957-2962, Dec. 1987.

-
- (12) BOWMAN, J. P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*, **Marine Drugs**, 5, p. 220-241, 2007.
 - (13) MENEZES, D. L. F.; LEITE, S. G. F.; NEVES, M. H. B.; MIRANDA, L. R. M. Avaliação morfológica do efeito da ação de micro-organismos em superfícies em aço carbono. **Revista Analytica**, N.52, Abril/Maio. 2011.
 - (14) HARRISON JR., A. P. Microbial succession and mineral leaching in a artificial coal spoil, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 131, p.68-76, 1982.
 - (15) POSTGATE, J. R. The sulphate-reducing bacteria, 2 ed. Cambridge: University Press, p.209, 1984.
 - (16) NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, 178:5636-43, 1996.
 - (17) MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 3131–3145, 1985.
 - (18) MUYZER, G.; WALL, E. C. D. E.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, p. 695-700, 1993.
 - (19) HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN P. D., PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica** 4(1): 9p. 2001.
 - (20) LANE, D. J. 16S/23S RNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y, p. 115–175, 1991.
 - (21) EWING B.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. *Genome Res* 8: p. 186–194, 1988.
 - (22) DÁVILA A. M.; LORENZINI D. M.; MENDES P. N.; SATAKE T. S.; SOUSA G. R.; CAMPOS L. M.; MAZZONI C. J.; WAGNER G.; PIRES P. F.; GRISARD E. G.; CAVALCANTI M. C.; GARSA, C. M. L, Genomic analysis resources for sequence annotation *Bioinformatics*. 2005 Dec 1;21(23):4302-3. Epub 2005 Oct 6
 - (23) HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98, 1999.
 - (24) COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M. and TIEDJE J. M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue): D141-D145; doi: 10.1093/nar/gkn879. Oxford University Press.
 - (25) SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol* 2: ed 92, 2006.
 - (26) TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. (2011) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
 - (27) JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. *Mammalian protein metabolism*. New York: Academic. p. 21–132.

-
-
- (28) POUBAIX, M. **Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions**. USA: NACE, 1974. 644 p.
- (29) SUSSMAN, M.; WILLIS, B. L.; VICTOR, S.; BOURNE, D. G. Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific, **PLoS ONE**, v.3 (6), 2008.
- (30) GOMEZ-GIL, B.; FAJER-AVILA, E.; GARCIA-VARGAS, F. Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico, *J. Appl. Microbiol.*, 102(6): 1518-26, JUN 2007.
- (31) EVANS, F. F.; RAFTERY, M. J.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S. Profiling the secretome of the Marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ), *J. Proteome Res.*, 6 -975, Jan.19, 2007.
- (32) HOLMSTRÖM, C.; EGAN, S.; FRANKS, A.; MCCLOY, S.; KJELLEBERG, S. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002, 41, 47–58.
- (33) HOLMSTRÖM C.; JAMES, S.; NEILAN, B. A.; WHITE, D. C.; KJELLEBERG, S. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1998, 48, 1205–1212.
- (34) LEE SO, KATO, J.; NAKASHIMA, K.; KURODA, A.; IKEDA, T.; TAKIGUCHI, N.; OHTAKE, H. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28, *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(6):1366-9, Jun 2002.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao: Instituto Nacional de Tecnologia, nas pessoas da Dra. Márcia Teresa Soares Lutterbach, Dra. Luciana Contador e Mariana Machado Galvão, pesquisadora; Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ; a Escola de Química –UFRJ; e ao Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira – Marinha do Brasil.