

Copyright 2014, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2014, em Fortaleza/CE no mês de maio de 2014.

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

Avaliação da atividade de biocidas comerciais no controle da biocorrosão em águas salinas.

Lindomar Cordeiro A. de Araújo¹, Ladimir José de Carvalho², Márcia Teresa S. Lutterbach³,
Leila Yone Reznik², Eliana Flávia Campoprese Sérvulo²

Abstract

The use of biocides has increased in recent years in various industrial sectors for the control of microorganisms of microbiologically induced corrosion (MIC). This study evaluated the action of three commercial biocides – THPS (tetrakis hydroxymethyl phosphonic sulfate); a blend of a quaternary ammonium salts; QUATs; and a blend of THPS and QUATs (THPS+QUATs) – in water production. The efficacy of biocides was evaluated for planktonic and sessile populations of heterotrophic aerobic bacteria (HAB), acid producing aerobic bacteria (APAB), acid producing anaerobic bacteria (APAnB), and sulfate-reducing bacteria (SBR). No microorganism group, except SBR, was affected on the THPS sensitivity test. The biocides QUATs and THPS+QUATs were more effective on the groups of bacteria. Analyses of the open circuit potential showed that the potential differences of the CPs are influenced by microorganisms. In the system containing THPS+QUATs the potential difference tended to reach a plateau of stabilization, being the microorganisms in the experimental cell or not.

Keywords: Biocides, Corrosion Microbiologically Induced, Duplex Steel

Resumo

O uso de biocidas tem sido intensificado nos últimos anos em diversos setores industriais para o controle de microrganismos causadores da Corrosão Induzida Microbiologicamente (CIM). Neste trabalho foi avaliado a ação de três biocidas comerciais - THPS (sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônico), um blend formado por uma combinação de sais quaternários de amônio, QUATs e outro blend formado pela mistura dos produtos de THPS e QUATs - em água de produção. A eficácia dos biocidas foi avaliada para populações planctônicas e sésseis de bactérias heterotróficas aeróbias (BHA), bactérias produtoras de ácido aeróbias (BPAA), bactérias produtoras de ácido anaeróbias (BPAAAn) e bactérias redutora de sulfato (BRS). Os microrganismos, com exceção das BRS, não foram susceptíveis ao THPS nos testes de sensibilidade. Os biocidas QUATs e THPS+QUATs causaram maior impacto nos grupos bacterianos nas concentrações ensaiadas neste trabalho. As análises de potencial a circuito aberto mostraram que os potenciais dos CPs são influenciados pelos microrganismos. No sistema contendo THPS+QUATs o potencial teve tendência a atingir um platô de estabilização, estando os microrganismos presente ou não na célula experimental.

Palavras-chave: Biocidas, Corrosão Induzida Microbiologicamente, Aço Duplex.

¹ Mestre, Estudante de Doutorado - TPQB - EQ/UFRJ

² DSc, Professor Adjunto – EQ/UFRJ

³ DSc, Gerente – LABIO/INT

Introdução

O controle da corrosão é importante para aumentar a duração dos equipamentos e também para limitar a dissolução dos elementos constituintes do material metálico usado na sua fabricação, que podem ser tóxicos ao ambiente. A presença de microrganismos nos sistemas pode intensificar o processo corrosivo (Corrosão Induzida Microbiologicamente – CIM) e com isso diminuir significativamente a vida útil dos equipamentos e materiais metálicos (1; 2). E isso leva variados segmentos industriais a adotar métodos de prevenção e/ou controle.

Atualmente, existem diferentes métodos que podem ser adotados para controlar ou evitar a CIM, que se manifesta com a formação de biofilmes (comunidades de microrganismos aderidas na superfície sólida associados à produção de material polimérico extracelular - MPE). O método a ser adotado poderá ser escolhido considerando a eficiência pretendida e estimativa de custos. Dentre os métodos conhecidos (proteção catódica, inibidores de corrosão, biocidas, revestimentos) a aplicação de biocidas tem sido um dos tratamentos que têm sido intensificados nos últimos anos para prevenir a corrosão em sistemas industriais ou na preservação de produtos (2; 3; 4).

Já existem na literatura diversos estudos que trata do assunto, demonstrando a eficácia dos biocidas contra os microrganismos e no controle da CIM (5; 6; 7; 8). O estudo sobre a atividade dos biocidas é amplo em face da capacidade dos microrganismos em adaptar-se aos diversos ambientes, inclusive em locais com condições extremas (elevada temperatura, salinidade, etc) considerados inapropriados para o desenvolvimento da vida para diversos outros seres. E com a descoberta de novas jazidas de petróleo em ambientes salinos (como o Pré-Sal), pouco se sabe sobre os mecanismos de sua ação em ambientes desta natureza e a sua eficácia sobre a vida microbiana.

Estas informações são consideradas importantes para que se possa definir uma estratégia de prevenção e controle, o que permitirá prolongar a vida útil dos materiais metálicos, diminuindo os prejuízos, custo e evitando acidentes. Logo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de três biocidas comerciais contra a Corrosão Induzida Microbiologicamente (CIM) em sistemas com elevada salinidade.

Metodologia

Corpos - de - prova (CPs)

As amostras metálicas constituídas neste trabalho consistiram em corpos-de-prova (CPs) de aço duplex (UNS S 31803):

- **Monitoramento microbiológico e análise de superfície:** CPs com dimensões de 4,0 cm x 1,0 cm x 0,3 cm e furo de 0,2 cm de diâmetro, perfazendo uma área total de aproximadamente 8,0 cm², considerando as duas faces do CPs. Antes do uso, os CPs serão polidos com lixa 600, desgordurados por imersão em acetona, secos com jato de ar quente e mantido em dessecador à temperatura ambiente até o momento de uso.

- **Ensaio eletroquímico:** CPs com dimensões de 2,0 cm x 1,0 cm x 0,3 cm, conectados a um fio de cobre de modo a permitir contato elétrico, embutidos em resina epóxi, deixando área exposta de aproximadamente 2 cm². Imediatamente antes do uso, os CPs serão polidos (com lixas de granulometrias 120 e 600), lavados com água destilada, rinsados com álcool etílico e secos em jato de ar quente.

Biocidas

Foram utilizados três biocidas comerciais: THPS (sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônico), um *blend* formado por uma combinação de sais quaternários de amônio - QUATs e um outro *blend* originário da mistura dos produtos THPS e QUATs.

Microrganismos

Foram empregadas populações enriquecidas de bactérias halofílicas: heterotróficas aeróbias (BHA), produtoras de ácido aeróbias (BPAA), produtoras de ácido anaeróbias (BPAA_n) e redutoras de sulfato (BRS), obtidas a partir de vários subseqüentes cultivos de amostra oriunda de um duto de petróleo, em meios apropriados e salinidade crescente, até atingir uma concentração de 160 g/L de NaCl, conforme descritos a seguir:

- Bactérias heterotróficas aeróbias (BHA) em caldo nutriente (g/L): Peptona de carne 5,0 ; Extrato de levedura 3,0 ; Dextrose 9,0 e pH ajustado para $7,0 \pm 2$;
- Bactérias produtoras de ácido aeróbias (BPAA) e bactérias produtoras de ácido anaeróbias (BPAA_n) em Caldo vermelho de fenol (g/L): Extrato de peptona 10; extrato de carne 1,0; vermelho de fenol 0,018; Glicose 10 e pH = $7,4 \pm 2$. Para BPAA_n, a condição de anaerobiose foi garantida através de purga de nitrogênio no meio;
- Bactérias redutora de sulfato (BRS) em meio Postgate E (g/L): KH₂PO₄ 0,5; NH₄Cl 1,0 ; CaCl₂.6H₂O 1,0 ; MgCl₂.7H₂O 2,0 ; FeSO₄.7H₂O 1,0 ; FeSO₄.7H₂O 1,0; Extrato de lêvedo 0,1; Ácido ascórbico 0,5; Agar-agar 5,0 + 7 mL de solução de lactato de sódio 50 %; 4 mL de solução de resazurina 0,025 % e pH ajustado para $7,6 \pm 2$.

Célula experimental

Os experimentos foram conduzidos em cubas de vidro de 1 L de capacidade, contendo 800 mL do eletrólito, onde foram dispostos os CPs, fixados à tampa por fios de nylon. O eletrólito foi mantido em constante e suave agitação, por meio de bastão magnético e placa de agitação, o mínimo requerido para manter as células planctônicas em suspensão e, assim, favorecer a colonização das superfícies metálicas. Antes e após cada experimento, a cuba foi desinfetada por imersão em solução de 5 g/L de metabissulfito de sódio por 24 horas, sendo a seguir lavada por cinco vezes com água destilada estéril, para a total remoção do desinfetante. O sistema foi mantido em sala climatizada, com temperatura variando de 25 a 27 °C.

Procedimentos experimentais

Determinação da sensibilidade dos microrganismos aos biocidas

Os grupos de microrganismos principais responsáveis pela CIM (BHA, BPAA, BPAAn e BRS) foram expostos aos três biocidas comerciais - THPS, QUATs e THPS+QUATs - em diferentes concentrações (50, 100 e 150 mg/L). Para as populações anaeróbias (BPAAn, BRS), os ensaios foram realizados em frascos do tipo penicilina, de 50 mL de capacidade, contendo 45 mL de meio de cultura específico, purgado com nitrogênio. Neste caso, os frascos foram vedados com tampa de borracha e lacrados com selo de alumínio para garantir condição de anaerobiose. Já as populações aeróbias (BHA, BPAA) foram cultivadas em frascos do tipo penicilina, de 50 mL de capacidade, contendo 45 mL de meio, com vedação feita com rolha de algodão, de modo a permitir a difusão de oxigênio.

Aos meios foram adicionadas amostras dos biocidas, convenientes diluídas de modo a estabelecer a concentração desejada no meio. Depois de homogeneizados, 0,1 mL de um dos cultivos bacterianos foram adicionados a cada frasco, conforme indicado por Gaylarde (9). Os cultivos foram analisados diariamente por um período total de 28 dias.

Efeito dos biocidas nas populações planctônicas e sésseis

Os ensaios foram realizados na célula experimental, anteriormente descrita, com água de produção na presença de biocida (100 mg/L) com e sem a presença de microrganismos, para fins comparativos. As concentrações das populações bacterianas planctônicas e sésseis foram determinadas em 168 e 360 horas.

Fluido do Processo

Foi utilizado água de produção de uma plataforma offshore contendo 160 g/L de salinidade, expressa em NaCl. Para a realização dos ensaios, a água produzida foi suplementada com (g/L): KH_2PO_4 0,5; NH_4Cl 1,0, extrato de levedura 0,2 e ácidos orgânicos de cadeia curta [ácido láctico 60,8; ácido propiônico 50,0 e ácido butírico 44,6], conforme descrito por Sousa(10) e o pH foi ajustado para 6,0. Considerando que a análise microbiológica da água revelou apenas a presença de BHA e de bactérias precipitantes do ferro (BPF), a água foi enriquecida com as culturas halofílicas, de modo a estabelecer concentrações iniciais de 10^8 células/mL de cada um dos grupos bacterianos.

Análises Eletroquímicas

As medições dos potenciais a circuito aberto dos CPs em relação ao Eletrodo de Calomelano Saturado foram realizadas periodicamente, com o auxílio de um multímetro portátil (Minipa Et 20 33) por um tempo total de 360 horas. Os valores plotados nos gráficos correspondem as médias de potenciais de 2 CPs.

Procedimentos Analíticos

Quantificação Celular

As populações de BHA, BPA e BRS, nas fases planctônica e sésil, foram quantificadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) (11) através do cultivo, nos respectivos meios apropriados: meio líquido nutriente (Merk No 5443, Germany), meio vermelho de fenol - BBL Phenol Red Broth Base - (BD - Becton Dickinson & Company) acrescido de 1% (m/v) de glicose, e meio Postgate E modificado (12). No caso das BPA, os cultivos foram incubados em condição de aerobiose e anaerobiose, para quantificação das BPAA e BPAAn, respectivamente.

Resultados e discussão

Determinação da sensibilidade dos microrganismos aos biocidas

Abaixo estão descritos (Tabela 1) a sensibilidade apresentada das populações bacterianas quando expostas ao biocida THPS, por um período total de 28 dias. As populações aeróbicas (BHA e BPAA) apresentaram desempenho similar, tendo sido observado crescimento somente decorridas 72 h quando cultivadas na presença de 50 ou 100 mg/L do biocida.

Comparativamente, as bactérias produtoras de ácido, quando cultivadas em anaerobiose, foram mais resistentes, só tendo sido detectado crescimento com 96 h. Note-se que as BRS foram susceptíveis ao biocida nas diferentes concentrações e tempos de exposição ensaiados, demonstrando sua eficácia contra este grupo bacteriano, mesmo em alta salinidade. Quando exposto ao biocida na concentração de 150 mg/L não foram detectado crescimento de nenhum grupo bacteriano. No entanto, com excessão das BRS, foi detectado que o biocida THPS nesta concentração apresentou apenas efeito bacteriostático nas populações bacterianas.

Os biocidas contendo QUATs e QUATs+THPS inibiram o crescimento de todos os grupos bacterianos em todas as concentrações ensaiadas, por isso os dados não foram apresentados. Considerando que os demais biocidas são misturas de compostos químicos, podemos inferir que o efeito tóxico é maior quando biocidas são combinados.

Mediante estes resultados, nos experimentos posteriores foram adotados para os ensaios a concentração de 100 mg/L.

Tabela 1: Avaliação da sensibilidade das bactérias planctônicas ao biocida THPS

Biocidas (ppm)	Crescimento							
	BHA		BPAA		BPAAn		BRS	
	24h	72h	24h	72h	24h	96h	24h	672h
50	-	+	-	+	-	+	-	-
100	-	+	-	+	-	+	-	-
150*	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): crescimento positivo; (-): crescimento negativo. (*) Efeito bacteriostático

Efeito dos biocidas nas populações planctônicas e sésseis

Na Figura 1 podem ser observadas as concentrações celulares dos principais grupos de microrganismos (nas fases planctônicas e sésseis expresso em valores médios de NMP/mL e NMP/cm², respectivamente) envolvidos na biocorrosão, que foram estudados neste trabalho em CPs de aço duplex, nos períodos de 168 e 360 h de exposição à água de produção.

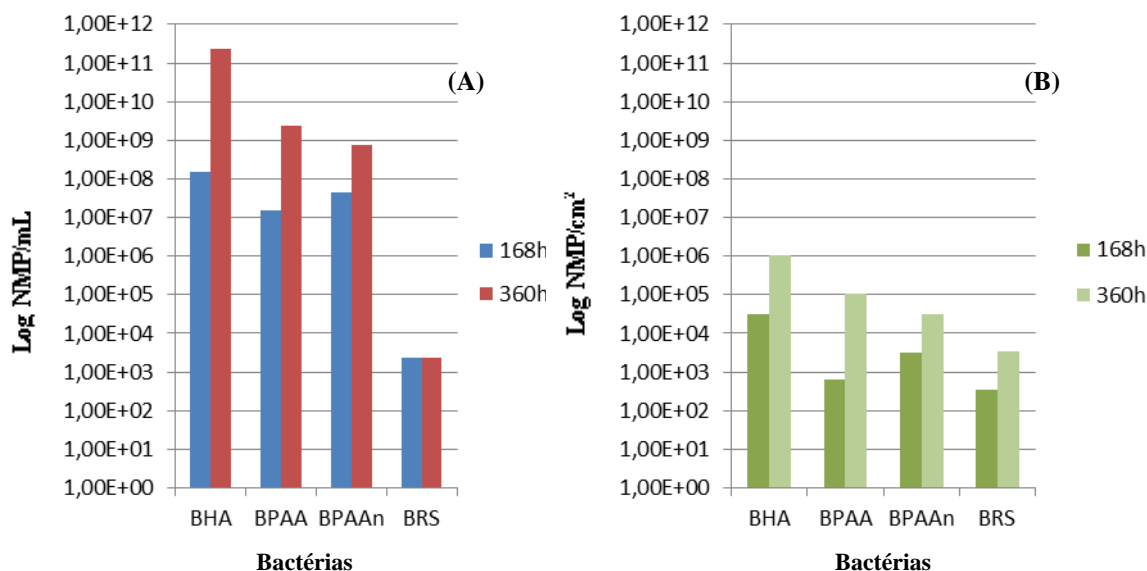


Figura 1: Perfis das populações bacterianas na fase planctônica (A) e sésfil (B) em água de produção para diferentes tempos.

Com exceção das BRS, o número inicial das diferentes populações bacterianas monitoradas, da ordem de 10⁸ células/mL cada, decorridas 168 h, se manteve (Figura 1A). Em tempo maior, 360 h, foram detectados aumentos das populações microbianas em 1 a 3 ordens de grandeza, sendo a maior amplitude referente às BHA. No caso das BRS, houve uma redução do número na fase planctônica, que se manteve inalterado durante todo o período monitorado.

Na fase sésfil (Figura 1B), foi determinada a viabilidade de todos os grupos bacterianos no período monitorado. Dentre os microrganismos estudados, as BHA foram o grupo microbiano que atingiu maior concentração celular nos biofilmes. Este grupo bacteriano compreende espécies que são potencialmente produtora de material polimérico extracelular (MPE). No caso de sistemas aquosos é frequente a adsorção destas bactérias nas superfícies sólidas formando filmes gelatinosos a partir da excreção de MPE, favorecendo também o desenvolvimento de microrganismos não produtores (13; 14). Os biofilmes formados pelo MPE abrigam comunidades multicelulares densas com diferentes exigências nutricionais, no qual se estabelece uma comunicação entre si através de materiais excretados durante a formação do biofilme (15; 16).

Também ao MPE são atribuídos: propriedade protetora contra produtos químicos, como biocidas e inibidores de corrosão; servir de fonte nutricional, quando os microrganismos se encontram em fase de estarvação; estimular a degradação do material metálico, devido a

presença de grupos funcionais negativos que reagem com íons metálicos intensificando o processo corrosivo (17; 18).

Levando em consideração os resultados de testes de sensibilidade dos microrganismos aos biocidas foram realizados ensaios em células experimentais para que se pudesse observar o comportamento das bactérias nestes sistemas. Deste modo a Figura 2 apresenta os resultados de concentração celular nas fases planctônica (A, C, D) e sésil (B, D, F) para os ensaios realizados com água de produção com duas aplicações (0 h e 168 h) dos biocidas, na concentração de 100 mg/L para diferentes tempos.

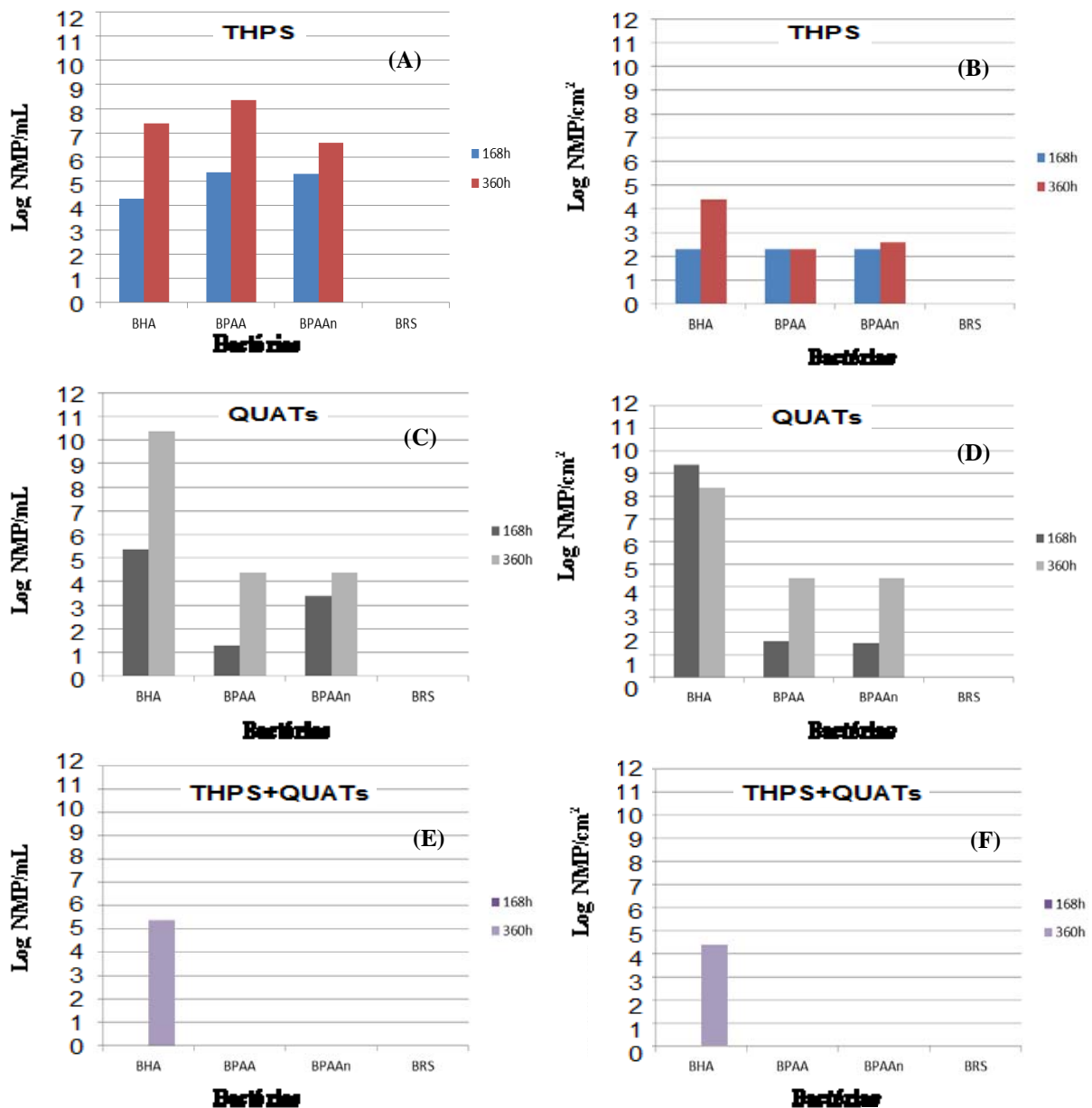


Figura 2: Perfis das populações bacterianas nas fases planctônica (A, C, E) e sésil (B, D e F) em água de produção, quando expostas aos biocidas, na concentração de 100 mg/L.

Os resultados mostram que os três biocidas foram efetivos contra as BRS tanto em sua fase planctônica quanto sésil. Fazendo uma análise comparativa entre os biocidas contendo apenas THPS e QUATs, o biocida THPS de uma forma geral, a exceção das BRS, foi o que causou menor impacto nas populações microbianas (Figura 2 A e B). No entanto, quando estes dois compostos foram misturados demonstraram ser mais eficazes no controle dos microrganismos. Conforme pode - se observar na figura 2 (E e F) nota-se a ausência de todos os grupos microbianos nas primeiras 168 h de ensaio. Após 360 h, somente foi detectado a presença das BHA, tanto na sua fase planctônica quanto sésil. Segundo alguns autores, quando substâncias química, como no caso, biocidas, são misturados a sua associação pode ser mais eficaz no processo de controle de microrganismos (19; 20).

A figura 3 ilustra as curvas de potencial com o tempo, obtidas para os sistemas montados em estudo.

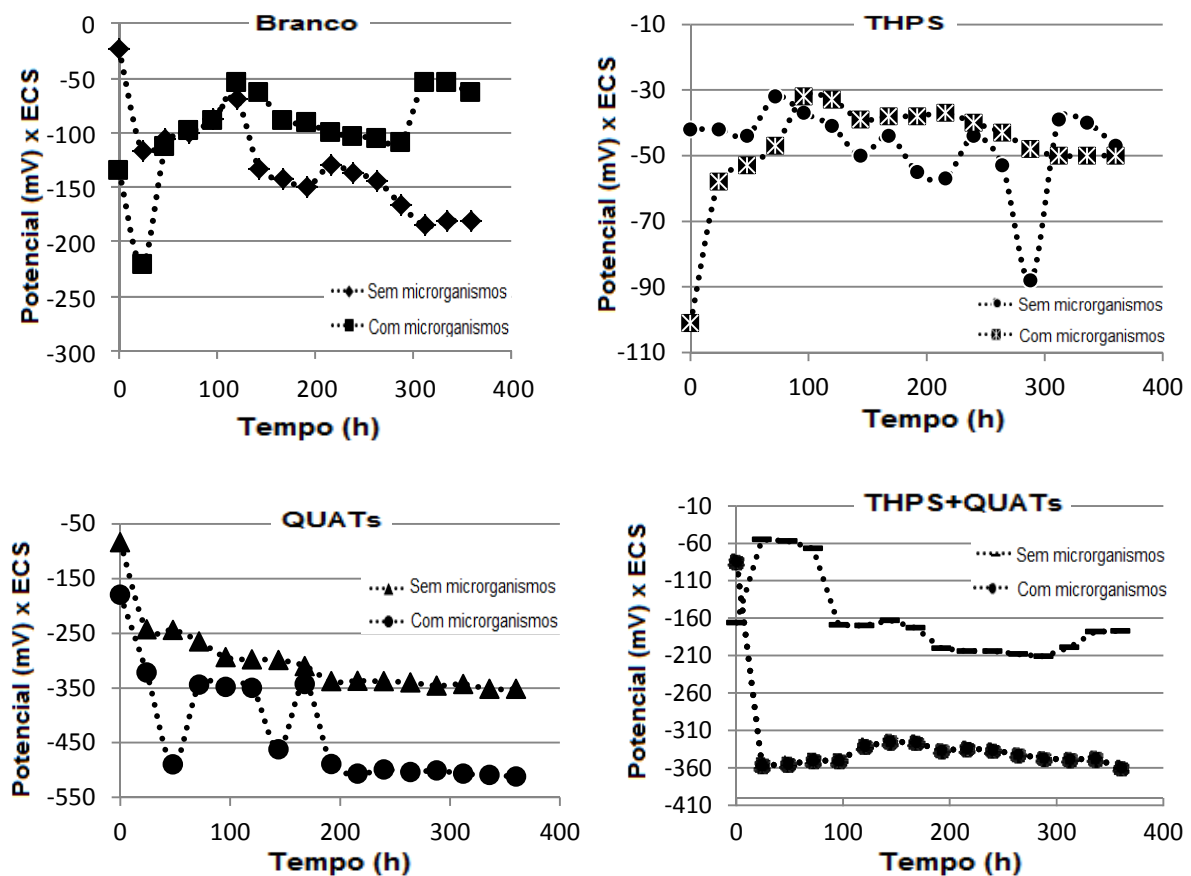


Figura 3: Curvas de Potencial a Circuito aberto com o tempo obtido para o Aço Duplex em água de produção na ausência e presença de microrganismos.

Na figura 3 A é apresentada a variação do potencial dos CPs do aço duplex quando exposto ao sistema sem biocidas e sem microrganismos (branco 1) e sem biocida e com microrganismos (branco 2). Quando o metal foi inserido nestes sistemas, observou-se queda do potencial nas primeiras 24 h. Após este tempo, o potencial voltou a subir atingindo o seu valor máximo (-69 mV e -55 mV, respectivamente) em 120 h de exposição. Logo em seguida, os potenciais dos CPs nestes sistemas seguiram em direções contrárias: no branco 1 o potencial adquiriu valores

cada vez mais negativos, permanecendo próximo a -180 mV após 288 h até o final dos experimentos. Já no branco 2 o potencial teve um intervalo de estabilização próximo a -100 mV elevando os seus valores em torno de -50 mV após 288 h até final dos ensaios.

A queda inicial dos potenciais pode estar associada à percolação de íons agressivos através do rompimento da camada passiva do metal (21). No caso da elevação dos potenciais no branco 2 este fato pode estar associado a formação de biofilme sobre a superfície do metal, criando desta forma uma barreira entre o meio e a superfície metálica metálica do CPs.

Quando os CPs foram expostos ao sistema contendo THPS, tanto na ausência quanto na presença de microrganismos, observa-se elevação dos potenciais até atingir os seus valores máximo (-32mV) em 72 e 96 horas respectivamente. Após este período os potenciais apresentaram poucas variações em torno de -30 e -50 mV.

Na figura 4, também é mostrado a evolução do potencial para valores cada vez mais ativos nas primeiras 24 e 72 horas dos CPs quando exposto ao biocida contendo QUATs, na ausência e presença de microrganismos. Note-se que no caso do sistema onde os microrganismos estavam ausentes, em 192 h de exposição os potenciais começaram a se estabilizar em torno de -350 mV, permanecendo assim até o final dos experimentos. Quando os microrganismos estavam presentes observa-se que somente após 216 horas de exposição os potenciais encontraram um platô de estabilização próximo a -500 mV, permanecendo em torno deste valor até 360 horas de exposição.

Ainda na figura 4, é mostrado a evolução dos potenciais dos CPs expostos na célula experimental contendo o biocida composto de THPS+QUATs. Note-se que os potenciais apresentaram comportamento opostos. Nas primeiras 24 horas, quando os microrganismos estavam ausentes, houve um aumento do potencial até atingir o seu maior valor (-55mV) onde houve uma certa estabilidade do potencial. Após 72 horas de exposição há queda no potencial, onde em 192 h de exposição o potencial atinge valor próximo de -200 mV, ficando em torno deste valor até o final dos experimentos. Comportamento diferenciado observa-se quando os microrganismos estão presentes no sistema. O potencial tende a evoluir para valores cada vez mais ativos, onde após 24 h de exposição o potencial tende a se estabilizar, variando em torno de -360 mV. Observa-se que quando o THPS+QUATs estão presente no sistema o potencial tende a ter variações menores, atingindo um platô de estabilização.

A variação dos potenciais para valores mais ativos em alguns casos sugerem que os biofilmes formam uma barreira mecânica no processo de corrosão. Outro fato que deve ser considerado é que na ausência ou na presença de microrganismos há percolação de agentes agressivos como o íon cloreto, ácidos orgânicos, etc., na superfície dos CPs o que vem alterar significativamente o potencial. Além disso, os metabolitos que os microrganismos produzem atacam a superfície metálica o que corrabora com a degradação da camada passiva formada sobre o metal. Além disso, no processo de colonização do metal, a formação do biofilme ocorre de forma heterogenia o que ocasiona regiões na superfície do metal com diferentes concentrações de oxigênio o que também afeta os valores dos potenciais. Logo, note-se que em todos os casos aqui analisados que os microrganismos tiveram influência sobre o potencial dos CPs metálicos.

Conclusões

Nos ensaios de sensibilidade dos microrganismos aos biocidas, o THPS foi mais efetivo contra as BRS;

Todos os biocidas causaram impacto nas populações bacterianas. No entanto, o biocida contendo THPS+QUATs foi o que causou maior impacto nas populações microbianas;

As BHA foram os únicos microrganismos estudados detectados no sistema contendo THPS+QUATs após 360 horas de ensaio;

Quando o THPS+QUATs estão presente no sistema o potencial tende a ter variações de potencial menores, atingindo um platô de estabilização, independentemente dos microrganismos estarem ou não presentes no sistema.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de doutorado, ao Laboratório de Corrosão “Professor Vicente Gentil” (EQ/UFRJ) e ao Laboratório de Biocorrosão (LABIO/INT) pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Referências bibliográficas

- (1) VIDELA, H.A. Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais, 1^a ed. São Paulo: **Ed. Edgard Blucher Ltda**, p.148. 2003
- (2) GENTIL, V. **Corrosão**. 5^aed. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2011.
- (3) VIDELA, H.A. **Prevention and control of biocorrosion**. International Biodeterioration & Biodegradation, v.49, p.259-270, 2002.
- (4) NUNES, L.P. **Fundamentos de Resistência à Corrosão**. 1^aed. Interciência, Rio de Janeiro. 2007.
- (5) Jones MV, Herd TM, Christie HJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* 1989;58:49e61.
- (6) Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:189e208.
- (7) McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, et al. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4770e4776

-
- (8) Greene E A, Brunelle V, Jenneman G E, Voordouw G, 2006. Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Applied and Environment Microbiology*, 72(12): 7897– 7901.
- (9) Gaylarde, P. M.; Gaylarde, C. C. The kinetics of biocide uptake in a model biofilm. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 29, p. 273-283, 1991.
- (10) Sousa, K. A. Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- (11) Harrison Jr., A.P. Microbial succession and mineral leaching in a artificial coal spoil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.131, p.68-76, 1982.
- (12) Postgate, J. R. The sulphate-reducing bacteria. 2ª ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, 1984.
- (13) LEWANDOWSKI, Z.; BOLTZ, J. P. *Biofilms in water and wastewater treatment*. In: Peter Wilderer (ed). *Treatise on Water Science*, Oxford: Academic Press; v. 4, p. 529-570, 2011.
- (14) BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 181–186, 2004.
- (15) WOOD, T. K.; HONG, S. H.; MA, Q. Engineering biofilm formation and dispersal. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 2, p. 87-94, 2011.
- (16) VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 169-180, 2005.
- (17) Madigan T.M., Martinko Jm, Dunlap, P.V., Clark D.P. *Microbiologia de Brock*. 12.ª ed. Porto Alegre: Artmed: 2010.
- (18) Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p.711-745, 1995.
- (19) Takahashi, D., Enzien, M. V., Yin, B., & Bottero, S. Aumente A Produção De Gás E Petróleo Com Programas Aprimorados De Controle Microbiano. Disponível em: http://oilandgas.dow.com/pdf/rio/de_controle_microbiano.pdf [Acesso em 14/03/2013]
- (20) Van Der Kraan, G. M., Jocksch, D., Canalizo-Hernandez, M., Yin, B., Williams, T., & Keene, P. A. Implementação de melhores soluções para o controle microbiano em processos petrolíferos. Disponível em: <http://www.dow.com/microbial/la/pt/pdf/PaperPortuguese.pdf> [Acesso em 14/03/2013]
- (21) Wolyneć, S. *Técnicas Eletroquímicas em Corrosão*. Editora USP, São Paulo, 2003.