

---

Copyright 2018, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2018, em São Paulo, no mês de maio de 2018.

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

## **Estudos de atividade antimicrobiana de produtos químicos de acordo com sua finalidade de uso, com enfoque na inibição de Bactérias Redutoras de Sulfato (m-BRS).**

Henrique M. Simon<sup>a</sup>, Caroline F. da Silva<sup>b</sup>, Antônio F. Montemor<sup>c</sup>, Jonas G. dos Santos<sup>d</sup>,  
Maria F. de A. Rodrigues<sup>e</sup>.

### **Abstract**

---

Two chemical products intended for the prevention of biocorrosion in industrial environments of the petroleum sector were evaluated through antimicrobial activity tests against Sulphate Reducing Bacteria (SRB), frequently involved in biocorrosion events. For a product based on silver nanoparticles, identified as "Product 01", the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by formation of inhibition halo against two SRB strains was used, whereas for a liquid preservative product, identified as "Product 02", a challenge test for a serie of concentrations of the respective product against a culture of SRB in liquid culture medium was used. For Product 01, inhibition halo was observed against the two strains evaluated, with a minimum activity value of 1,0 g/L against strain IPT 504, and 3,0 g/L against the bacterium *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. For Product 02, all concentrations tested showed inhibitory activity against the bacterium *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. The results confirm the potential of applying these methodologies for the evaluation of products indicated for the prevention of biocorrosion processes in the petroleum industry.

**Keywords:** antimicrobial activity, biocorrosion, SRB, MIC.

### **Resumo**

---

Foram avaliados dois produtos químicos pretendidos para uso na prevenção da biocorrosão em ambientes industriais do setor petrolífero, através de ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana frente a Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), frequentemente envolvidas em eventos de biocorrosão. Para um produto a base de nanopartículas de Prata, identificado como "Produto 01", foi utilizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela formação de halo de inibição frente a duas linhagens de BRS, enquanto que para um produto conservante líquido, identificado como "Produto 02", foi utilizado um teste desafio para uma série de concentrações do respectivo produto frente a uma cultura de m-BRS em meio de cultura líquido. Para o Produto 01, obteve-se halo de inibição frente às duas linhagens avaliadas, com a obtenção de valor mínimo de atividade em 1,0 g/L frente à bactéria IPT 504, e em 3,0 g/L frente à bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. Para o Produto 02, todas as concentrações testadas apresentaram atividade inibitória frente à bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998. Os resultados comprovam o potencial de

---

<sup>a</sup> Pesquisador Assistente – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

<sup>b</sup> Estagiária Técnica em Análises Químicas – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

<sup>c</sup> Técnico Especializado – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

<sup>d</sup> Técnico Especializado – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

<sup>e</sup> Doutora, Pesquisadora – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

aplicação destas metodologias para a avaliação de produtos indicados para a prevenção de processos de biocorrosão na indústria do petróleo.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, biocorrosão, BRS, CIM.

## **Introdução**

---

A indústria do petróleo, em suas atividades de extração, processamento, distribuição e armazenamento, apresenta frequentes e graves problemas devido à biocorrosão provocada pelos microrganismos provenientes dos ambientes onde se localizam reservas de petróleo, bem como o entorno de estruturas construídas para a execução das atividades relacionadas. Destacam-se neste processo as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), microrganismos dotados de metabolismo anaeróbico que utilizam o íon Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como acceptor de elétrons para sua cadeia respiratória, promovendo a redução deste composto a Sulfeto ( $\text{S}^{2-}$ ), que se converte a Sulfeto de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) como descrito por Postgate (1). Este composto é um gás tóxico e corrosivo que atua favorecendo o processo de corrosão localizada (“*pitting*”) sob os biofilmes estabelecidos junto à superfície de dutos e tanques de armazenamento utilizados na indústria petrolífera.

O controle e mitigação de eventos biocorrosivos possuem como finalidade melhorar a qualidade econômica do petróleo extraído, bem como diminuir a probabilidade de ocorrência de eventos na cadeia de transporte e distribuição de petróleo até as refinarias, evitando assim impactos e atrasos no cronograma de atividades das refinarias. Estes objetivos podem ser alcançados com a aplicação de produtos químicos que atuem como inibidores microbianos ou mesmo biocidas frente a microrganismos presentes nos biofilmes estabelecidos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de 02 produtos comerciais frente a 2 microrganismos do grupo BRS, com a execução de ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) com medida do halo de inibição, e de teste desafio de uma série de concentrações de um produto em contato com cultura de um microrganismo de referência para o grupo BRS.

## **Metodologia**

---

Os ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana foram conduzidos com 02 produtos distintos: um produto a base de nanopartículas de Prata em pó, identificado como “Produto 01”, cuja utilização é pretendida como aditivo de tintas para aplicação em tanques de armazenamento de combustíveis; e um produto conservante líquido, identificado como “Produto 02”, utilizado como preservante de formulações elaboradas para formação de estruturas de concreto.

- Microrganismos utilizados: (i) linhagem mesófila não identificada de m-BRS, isolada a partir de amostra de campo, depositada no Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT sob o código “IPT 504”. (ii) linhagem de referência *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998.
- Meios de cultura utilizados: (i) Meio sólido DA modificado para crescimento de microrganismos anaeróbios, adaptado da metodologia descrita por Nakao et al (2). (ii) Meio semi-sólido “Postgate E” modificado.

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

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

## Resultados e discussão

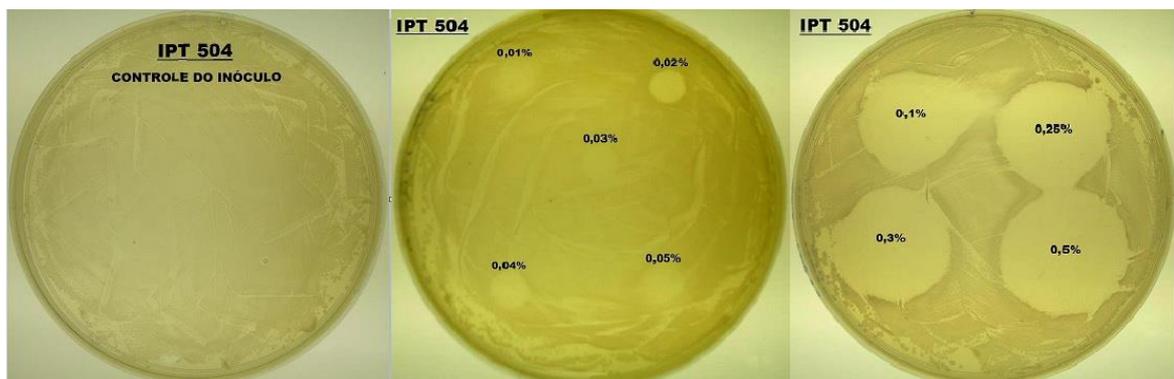
Biocidas são produtos nos quais a indústria petrolífera tem feito grande investimento para poder combater problemas decorrentes da corrosão influenciada por microrganismos, atuando com base na supressão das atividades metabólicas das espécies microbianas, bem como a supressão de seu crescimento. A escolha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

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

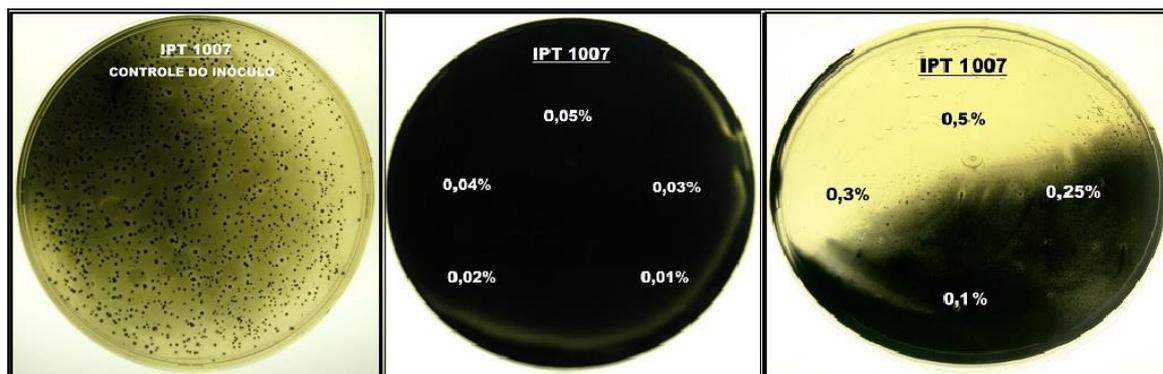
Os resultados obtidos de formação de halo de inibição com as suspensões do Produto 01 frente à linhagem m-BRS “IPT 504” e frente a *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 estão demonstrados na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

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

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



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



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

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

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

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

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

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



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

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

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

## **Conclusões**

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

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

### Referências bibliográficas

---

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

\* \* \*