



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**IGOR CARVALHO FONTES SAMPAIO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR RÁPIDO PARA  
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E  
SUA UTILIZAÇÃO NA SELEÇÃO DE BIOCIDAS**

Salvador

2017

**IGOR CARVALHO FONTES SAMPAIO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR RÁPIDO PARA  
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E  
SUA UTILIZAÇÃO NA SELEÇÃO DE BIOCIDAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, área de Concentração – Biotecnologia Industrial e Imunobiológicos, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josilene Borges Torres Lima Matos.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

Salvador

2017

S192

Sampaio, Igor Carvalho Fontes  
Desenvolvimento de um método molecular rápido para avaliação da viabilidade de bactérias redutoras de sulfato e sua utilização na seleção de biocidas / Igor Carvalho Fontes Sampaio. - Salvador, 2017.  
93 f. : il.

Orientadora: Josilene Borges Matos.

Coorientador: Paulo Fernando de Almeida.

Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em Biotecnologia)- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2017.

1. Bactéria redutora de sulfato. 2. Real time PCR. 3. Monoazida de propídio. 4. Quantificação de BRS. 5. Número mais provável. I. Matos, Josilene Borges. II. de Almeida, Paulo Fernando. III. Título.

CDU 606

## IGOR CARVALHO FONTES SAMPAIO

### Desenvolvimento de um método molecular rápido para avaliação da viabilidade de bactérias redutoras de sulfato e sua utilização na seleção de biocidas

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

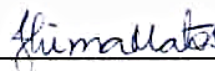
Aprovada em 31 de março de 2017.

#### BANCA EXAMINADORA:

Josilene Borges Torres Lima Matos – Orientadora

Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.

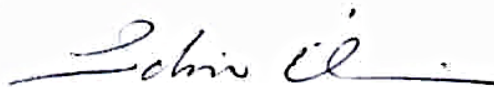
Universidade Federal da Bahia.



Fábio Alexandre Chinalia

Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,  
ABDN, Escócia.

Universidade Federal da Bahia.



Edgard Bacic de Carvalho

Doutor em Engenharia Química pela The Pennsylvania State University,  
PSU, Estados Unidos.

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Aurélio e Vanilda, por me apoiarem.

A professora Doutora Josilene Matos, por me acolher no LABEM e ter me guiado até a pós-graduação, pela orientação e incentivo durante todo projeto.

Ao professor Doutor Paulo Almeida, pelos ensinamentos, orientação, confiança, incentivo e idealização do projeto.

Ao Professor Doutor Fabio Chinalia, por todos ensinamentos.

Ao pesquisador Andreas Stöcker MD, pela orientação no laboratório de diagnóstico molecular e apoio intelectual.

A colega Joalene Santos, pela ajuda, colaboração em experimentos e incentivo.

A Jackson pelo apoio intelectual.

A Fúlvia, Débora e Leila por sempre estarem dispostas a ajudar.

A colega Cátia, pela ajuda com a câmara de anaerobiose.

Ao colega Daniel, por sempre estar disposto a ajudar.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

SAMPAIO, Igor Carvalho Fontes. Desenvolvimento de um método molecular rápido para avaliação da viabilidade de bactérias redutoras de sulfato e sua utilização na seleção de biocidas. 93 f. il. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## RESUMO

Bactérias redutoras de sulfato são organismos nocivos à indústria de petróleo, pois produzem sulfeto de hidrogênio que acidifica os reservatórios (souring), aumenta a concentração de enxofre e dessa forma reduz a qualidade do óleo extraído e também são responsáveis pela corrosão influenciada microbiologicamente, a qual gera prejuízos estimados de 276 bilhões de dólares por ano apenas nos Estados Unidos. Os métodos rotineiramente utilizados para detectar e quantificar esses organismos são trabalhosos e envolvem longos períodos. Foi desenvolvida uma metodologia de *real time* PCR (qPCR) associada a monoazida de propídio (PMA) para a avaliação da viabilidade da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris*, a qual foi submetida a um tratamento térmico de letalidade bem como após a aplicação de ácido tricloroisocianúrico (TCICA) nas concentrações de 500, 50 e 5 ppm. Após otimizada a metodologia de PMA-qPCR para essa espécie, foi possível detectar reduções de 3 Log com amostras contendo  $10^5$ – $10^8$  bactérias submetidas ao tratamento térmico e 50  $\mu$ M de PMA. Esse resultado corresponde a redução de 99,9% das bactérias presentes nas amostras. Quando as culturas foram expostas ao biocida TCICA, não houve redução estatisticamente significativa nas três concentrações testadas. A qPCR desenhada para o estudo apresentou boa eficiência (96-100%), sendo que os resultados obtidos pela técnica do número mais provável não diferiram dos da qPCR ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos sugerem que a metodologia de PMA-qPCR é um método rápido para quantificação de viabilidade microbiana em amostras de *Desulfovibrio vulgaris* pouco concentradas.

**Palavras-chave:** Bactéria redutora de sulfato; *Real time* PCR; Monoazida de propídio; Quantificação de BRS; Número mais provável.

SAMPAIO, Igor Carvalho Fontes. Development of a rapid molecular method for sulfate reducing bacteria viability evaluation and their use in biocides selection. 93 pp. ill. 2017. Dissertation (Master) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

Sulfate reducing bacteria are harmful organisms to the petroleum industry because they produce hydrogen sulfide that acidifies the reservoirs, increase sulfur concentration and thus reducing the extracted oil quality and are also responsible for the microbiologically influenced corrosion, which generates damages estimated in 276 billion dollars per year only in the United States. The methods routinely used to detect and quantify these organisms are laborious and involve long periods. A real-time PCR (qPCR) methodology associated with propidium monoazide (PMA) was developed to evaluate the viability of the sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio vulgaris*, which was subjected to a thermal lethality treatment as well as after Trichloroisocyanuric acid (TCICA) application at concentrations of 500, 50 and 5 ppm. After PMA-qPCR methodology optimization for this species, it was possible to detect 3 Log reductions. This result corresponds to a 99.9% bacteria reduction present in samples. When cultures were exposed to the TCICA biocide, there was no statistically significant reduction in the three tested concentrations. The qPCR designed for the study showed good efficiency (96-100%), and the results obtained by the most probable number technique did not differ from qPCR ( $p > 0.05$ ). The findings obtained suggest that the PMA-qPCR methodology is a rapid method for quantification of microbial viability in low concentrations *Desulfovibrio vulgaris* samples.

**Keywords:** Sulfate reducing bacteria; Real-time PCR; Propidium monoazide; SRB quantification; Most probable number.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema do processamento de amostras com PMA.....	41
Figura 2: Procedimento adotado após obtenção das amostras tratadas com PMA. .	47
Figura 3: Pellets microbianos após a incubação com PMA 50 uM.....	52
Figura 4: Esquema da otimização do PMA .....	63
Gráfico 1: Multiplicação das amostras DV-01 com 500 uL.....	52
Gráfico 2: Redução de multiplicação das amostras DV-02 com 500 µL aquecidas e tratadas com PMA.....	53
Gráfico 3: DNA inativado após o tratamento com PMA com culturas de 500 uL.....	54
Gráfico 4: Multiplicação das amostras com e sem tratamento térmico. ....	54
Gráfico 5: Inativação do DNA de células vivas pelo PMA em diferentes concentrações (Log).....	55
Gráfico 6: Redução de multiplicação das amostras DV-04 tratadas termicamente...	56
Gráfico 7: Multiplicação das amostras DV-04 após otimização no Master Mix da qPCR.....	57
Gráfico 8: Redução de multiplicação das amostras DV-05 com 25 e 50 µM de PMA .....	58
Gráfico 9: Quantificação em valores absolutos e relação entre as diluições das amostras sem PMA .....	60
Gráfico 10: Diferença de Log entre as amostras com e sem tratamento térmico.....	60
Gráfico 11: Redução de multiplicação das amostras DV-05 considerando o valor mínimo esperado da extração de DNA .....	61
Gráfico 12: Multiplicação das amostras tratadas com PMA .....	62



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de PMA e condições de incubação obtidos na literatura.....	37
Tabela 2: Identificação das amostras DV-01.....	42
Tabela 3: Identificação das amostras DV-02.....	43
Tabela 4: Identificação das amostras DV-03.....	43
Tabela 5: Identificação das amostras DV-04.....	44
Tabela 6: Identificação das amostras DV-05.....	45
Tabela 7: Identificação das amostras DV-05 com 250 µL tratadas com o biocida TCICA .....	45
Tabela 8: Primers e sondas utilizados na pesquisa .....	47
Tabela 9: Quantificação após tratamento com PMA das amostras DV-04 após otimização do Master Mix.....	56
Tabela 10: Linearidade das curvas de calibração da qPCR após todas otimizações. .....	58
Tabela 11: Coeficientes de correlação $\rho$ de Pearson.....	59
Tabela 12: Resultados do número mais provável (MPN) e qPCR/PMA-qPCR .....	64
Tabela 13: Publicações com redução de multiplicação inferior a 3 Log. ....	71

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVO.....	13
2.1 GERAL.....	13
2.2 ESPECÍFICOS .....	13
3. JUSTIFICATIVA .....	14
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1 PETRÓLEO.....	15
4.2 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS) .....	16
4.2.1 BRS mesófilas gram-negativas .....	17
4.2.2 BRS formadoras de esporos gram-positivas.....	18
4.2.3 BRS termófilas bacterianas .....	19
4.2.4 BRS termófilas arqueas.....	19
4.3 BRS NA MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO .....	19
4.4 BIOFILMES .....	22
4.5 MÉTODOS DE CONTROLE E RESPOSTA MICROBIANA.....	25
4.5.1 Biocidas e resistência microbiana .....	26
4.5.2 Estado fisiológico VBNC.....	30
4.6 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS .....	32
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ASSOCIADA A MONOAZIDA DE PROPÍDIO.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS:.....	39
5.1 CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTURA .....	39
5.2 CONDIÇÃO DE ESTRESSE .....	40
5.3 DILUIÇÃO DAS CULTURAS ANTES DO TRATAMENTO COM PMA.....	40
5.4 OTIMIZAÇÃO DO USO DO PMA.....	40
5.4.1 Determinação da concentração ótima de PMA a ser utilizada nas culturas (Amostras DV-01).....	42
5.4.2 Otimização da fotoativação e verificação do funcionamento do PMA (Amostras DV-02) .....	42
5.4.3 Determinação da concentração ideal de PMA após a otimização da fotoativação (Amostras DV-03).....	43
5.4.4 Verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com culturas de 500 µL diluídas a 50 e 25% (Amostras DV-04).....	44
5.4.5 Verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com uma cultura mais concentradas (Amostras DV-05).....	44
5.5 TESTE DE BIOCIDA ATRAVÉS DE PMA-qPCR E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL .....	45
5.6 EXTRAÇÃO E CONDIÇÕES de qPCR .....	46
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
6. RESULTADOS .....	51
6.1 OTIMIZAÇÕES DA qPCR .....	51
6.2 OTIMIZAÇÃO DO USO DO PMA.....	51
6.2.1 Resultados da determinação da concentração ótima de PMA (Amostras DV-01) .....	51
6.2.2 Resultados da otimização da fotoativação (Amostra DV-02).....	53
6.2.3 Resultados da determinação da concentração ideal de PMA após a otimização da fotoativação (Amostras DV-03).....	53

6.2.4	Resultados da verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com culturas de 500 $\mu$ L diluídas a 50 e 25% (Amostras DV-04).....	54
6.2.5	Resultados da verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com uma cultura mais concentradas (Amostras DV-05) .....	57
6.3	TESTE DE BIOCIDA ATRAVÉS DE PMA-qPCR E COMPARAÇÃO COM MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL .....	64
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75

## 1. INTRODUÇÃO

Campos de petróleo constituem ecossistemas subterrâneos, considerados essencialmente anaeróbicos, com temperaturas que variam de 30 a 180 °C. Ao lado de altas temperaturas, tem sido relatado salinidades próximas à saturação (cerca de 300g/L de NaCl). Portanto, não é surpreendente que ambos organismos anaeróbios termófilos e/ou halófilos são frequentemente recuperados desses ecossistemas (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000; OLLIVIER; CAYOL, 2005). Por causa da profundidade, pressões superiores a várias centenas de bars podem também afetar a fisiologia dos microrganismos subterrâneos. Estudos conduzidos por mais de 50 anos indicam que uma ampla variedade de microrganismos (MO) anaeróbios pertencentes aos domínios bactéria e arquea são comumente distribuídos nos campos de petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000). Contudo, alguns dados sugerem que a presença de microrganismos indígenas nos campos de petróleo pode ser limitada por um limiar de temperatura entre 80 e 90°C. O que condiz com dados publicados por Philippi que notou que a biodegradação *in situ* do óleo nunca era observada onde temperaturas excediam 82°C (PHILIPPI, 1977). Microrganismos originados de instalações da indústria petrolífera incluem microrganismos fermentativos, metanogênicos e redutores de sulfato. Entre eles, grande atenção tem sido dada às bactérias redutoras de sulfato, as quais foram rapidamente reconhecidas como agentes perniciosos para a indústria do petróleo, porque produzem sulfeto de hidrogênio, levando a (1) aumento da concentração de enxofre e redução da qualidade do óleo; (2) corrosão de materiais metálicos; e (3) geração de problemas de saúde para os trabalhadores que entram em contato com esse composto altamente tóxico durante a produção de petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

Dentro desse contexto, é necessário que estejam disponíveis métodos válidos para a contagem dessas bactérias, permitindo estudos quantitativos de sua ecologia, particularmente em relação a corrosão, poluição, formação de enxofre, e outros fenômenos de importância econômica (POSTGATE, 1959).

## 2. OBJETIVO

### 2.1 GERAL

Desenvolver um método molecular rápido para avaliar a viabilidade de bactérias redutoras de sulfato.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- I. Testar o método de qPCR associado a monoazida de propídio para avaliar a viabilidade de bactérias redutoras de sulfato;
- II. Verificar a eficiência do método em culturas puras de *Desulfovibrio vulgaris*;
- III. Comparar o método com um método clássico de cultivo, o número mais provável;
- IV. Testar a metodologia com uma substância de controle microbiano.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Sabe-se que existem microrganismos que causam danos à indústria do petróleo, por provocarem a redução da qualidade do óleo extraído, corrosão das estruturas metálicas e tubulações, e também por colocarem em risco a vida dos operadores dessas instalações. Diante dessa problemática, é necessário saber se esses organismos estão presentes nas diversas instalações da indústria, e caso estejam, quantificá-los, para que seja possível traçar melhores estratégias de seu controle e remediação. Os métodos rotineiramente utilizados envolvem longos períodos de cultivo. O presente trabalho desenvolveu uma metodologia rápida capaz de quantificar e informar o estado de viabilidade de bactérias redutoras de sulfato *in vitro*.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 PETRÓLEO

O petróleo é, possivelmente, a substância mais importante consumida na sociedade moderna. Ele fornece não apenas matéria prima para os plásticos ubíquos e outros produtos, mas também o combustível para geração de energia, indústria, aquecimento e transporte. A palavra petróleo, derivada do Latim *petra* e *oleum*, literalmente significa óleo de rocha e se refere a hidrocarbonetos que ocorrem amplamente em rochas sedimentares, na forma de gases, líquidos, semissólidos ou sólidos (SPEIGHT, 2014).

De uma perspectiva química, o petróleo é uma mistura extremamente complexa de compostos hidrocarbonetos, usualmente com menores quantidades de nitrogênio, oxigênio, e compostos contendo enxofre, bem como traços de compostos contendo metais.

Os combustíveis que são derivados do petróleo fornecem mais da metade do suprimento total de energia no mundo. Gasolina, querosene e diesel fornecem combustível para automóveis, tratores, caminhões, aeronaves e barcos. O óleo combustível e o gás natural são usados para aquecer casas e estabelecimentos comerciais, bem como gerar eletricidade.

Os produtos do petróleo são materiais básicos usados para fabricação de fibras sintéticas para vestuário e em plásticos, tintas, fertilizantes, inseticidas, sabões e borracha sintética. O uso do petróleo como fonte de matéria prima na fabricação é central no funcionamento da indústria moderna.

Sabe-se que o uso do petróleo e seus derivados foi praticado em épocas anteriores a Cristo por muitas civilizações antigas. Assim, o uso do petróleo e o desenvolvimento de tecnologia relacionada não é um assunto tão moderno como estamos inclinados a acreditar. Contudo, a indústria do petróleo desenvolveu-se no século XIX através da abertura da primeira fábrica de querosene pelo canadense Abraham Gesner (SPEIGHT, 2014; WORLD HERITAGE ENCYCLOPEDIA, 2017). O petróleo é a fonte energética primária dominante, tendo 63% de seu consumo em todo o mundo, destinado ao setor de transportes (IEA, 2014a), o que representou a emissão de 6963 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> em 2012 somente nesse setor (IEA,

2014b). Sabe-se que o CO<sub>2</sub> é um gás de efeito estufa, e que, desde a revolução industrial, a atividade humana aumentou sua concentração em mais de 30%, de 280 para 380 ppm.

O petróleo é um recurso baseado no carbono. Portanto, o ciclo geoquímico do carbono é também de interesse para o uso dos combustíveis fósseis, em termos da formação do petróleo, uso, e a formação do dióxido de carbono atmosférico. Assim o mais eficiente uso do petróleo é de suma importância. A tecnologia do petróleo, de uma forma ou de outra, estará presente até que formas alternativas de energia estejam prontamente disponíveis (SPEIGHT, 2014). Enquanto o mundo estiver na era do petróleo, o uso racional e a otimização de sua produção devem ser metas prioritárias.

## 4.2 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

Embora muitas bactérias possuam a capacidade de reduzir sulfato durante a síntese de aminoácidos contendo enxofre, o presente trabalho se refere as bactérias redutoras de sulfato dissimilatórias: aquelas cujas principal fonte de rendimento energético são reações acopladas a redução do sulfato ao íon sulfeto (POSTGATE, 1959).

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo diverso de procariotos que contribuem para uma variedade de funções essenciais em muitos ambientes anaeróbicos. Em adição à sua grande importância no ciclo do enxofre, BRS são importantes reguladoras de uma variedade de processos em solos de várzea, pântanos salinos (BAHR et al., 2005), incluindo a rotatividade da matéria orgânica, a biodegradação de poluentes aromáticos clorados em solos anaeróbicos e sedimentos, e a metilação do mercúrio (BARTON; TOMEI, 1995; FAUQUE, 1995).

As BRS também provocam fenômenos que são nocivos, como a corrosão de materiais e produção de H<sub>2</sub>S, que é extremamente tóxico. Tradicionalmente é conhecido que as BRS são ativas em poços de óleo rasos, mas a existência de populações em campos profundos, quentes e com alta pressão tem sido confirmada a partir do *souring* nessas formações (SEN, 2008). As BRS são extremamente



resistentes e podem sobreviver por longos períodos de privação nutricional na água do mar, em temperaturas superficiais e também do reservatório.

Por causa de sua importância negativa na indústria petrolífera, as BRS tem sido o grupo bacteriano mais abundantemente estudado a partir de amostras oriundas da indústria do petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000). Com o desenvolvimento da análise filogenética, notáveis avanços foram feitos na taxonomia e fisiologia desse diverso grupo de bactérias (STACKEBRANDT; STAHL; DEVEREUX, 1995).

Por pertencerem a um grupo filogenético complexo de procariotos, várias propriedades têm sido usadas em esquemas tradicionais de classificação. As propriedades mais importantes desses esquemas de classificação são a forma celular, motilidade, conteúdo de GC no DNA, a presença de desulfovirina e citocromos, temperatura ótima, e oxidação completa ou incompleta do acetato. Para a classificação dentro de um gênero particular, diferentes doadores de elétrons são testados. Com base em análises da sequência de rRNA, as BRS podem ser divididas em quatro grupos: BRS mesófilas Gram-negativas; BRS formadoras de esporos Gram-positivas; BRS bacterianas termófilas; e BRS arqueas termófilas. Todos esses grupos são caracterizados pelo uso do sulfato como aceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000). Essa distinção é importante, pois sabe-se que BRS mesófilas estão envolvidas em processos de corrosão de instalações petrolíferas, ao passo que as BRS termófilas são as principais responsáveis pelo *souring in situ* de campos de petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

#### 4.2.1 BRS mesófilas gram-negativas

Esse grupo está localizado dentro da subdivisão delta das Proteobactérias. Em algum momento da história evolucionária, a subdivisão delta divergiu de outras Proteobactérias a partir de um ancestral fototrófico comum, e membros da subdivisão delta perderam sua habilidade fotossintética e foram convertidos em heterotrofia (WOESE, 1987). As BRS mesófilas mais frequentemente isoladas de água produzida de campos de petróleo pertencem ao gênero *Desulfovibrio*, possuindo importância em diversos fenômenos de importância econômica, como, por exemplo, a corrosão de

tubulações metálicas e a acidificação de campos de petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000; POSTGATE, 1959). Esses tipos de bactérias são muito exigentes quanto às condições anaeróbicas. Elas requerem um Eh próximo de -200 mV para o início do crescimento, e a desatenção a esse detalhe é, provavelmente, responsável pela reputação que esses organismos tem de serem difíceis de crescer e isolar (POSTGATE, 1959).

#### 4.2.2 BRS formadoras de esporos gram-positivas

Esse grupo é dominado pelo gênero *Desulfotomaculum*, e está dentro das bactérias Gram-positivas com baixo teor de GC tais como os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Incluem nesse gênero as únicas BRS conhecidas capazes de formar endósporos resistentes à temperatura, característica também compartilhada com muitas espécies de *Bacillus* e *Clostridium*. Em contraste com BRS mesófilas, algumas espécies de *Desulfotomaculum* são termófilas, embora suas temperaturas ótimas de crescimento sejam mais baixas do que as das BRS termófilas Gram-negativas e BRS arqueas termófilas (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).

Diferentes espécies dentro do grupo *Desulfotomaculum* exibem uma grande versatilidade no tipo de doadores de elétrons que são capazes de utilizar para seu crescimento, incluindo acetato, anilina, succinato, catecol, indol, etanol, nicotinato, fenol, acetona, estereato, e outros. Dependendo da espécie, os substratos orgânicos são oxidados incompletamente a acetato ou completamente a CO<sub>2</sub> (FAUQUE, 1995). Embora a maioria das BRS formadoras de esporos gram-positivas sejam encontradas em ambientes similares aos das BRS mesófilas gram-negativas, a formação de esporos permite a esse grupo sobreviver por longos períodos de dissecação e condições óxicas. Por exemplo, *Desulfotomaculum* é o gênero prevalente de BRS em arrozais devido a alteração de condições óxicas para anóxicas como resultado de inundações sazonais (WIDDEL, 1992).

#### 4.2.3 BRS termófilas bacterianas

As duas espécies de BRS melhor caracterizadas nesse grupo são *Thermodesulfobacterium commune* (ZEIKUS et al., 1983) e *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (HENRY et al., 1994). Ambas bactérias foram isoladas de fontes hidrotermais no parque nacional de Yellowstone (Estados Unidos da América), e suas temperaturas ótimas de crescimento (65°C e 70°C, respectivamente) são mais altas do que as descritas para BRS formadoras de esporos Gram-positivas, mas menores que as BRS termófilas arqueas, podendo sobreviver também em baixas temperaturas (NILSEN et al., 1996). Embora esses dois gêneros tenham características fisiológicas e fenotípicas semelhantes, eles diferem na forma (vibrião contra bacilo) e conteúdo de GC (30% contra 34%) para *T. yellowstonii* e *T. commune*, respectivamente (HENRY et al., 1994).

#### 4.2.4 BRS termófilas arqueas

Esse grupo exibe temperaturas ótimas de crescimento acima de 80°C, existindo espécies quimiolitotróficas facultativas que produzem metano e quimiolitotróficas obrigatórias que não produzem metano (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).

A classificação filogenética de BRS por análise de sequências de rRNA tem muitas vantagens, incluindo o fornecimento de informações da origem evolucionária da redução de sulfato em espécies distantemente relacionadas, e a facilitação do desenvolvimento de sondas filogenéticas grupo-específicas e primers de PCR para uso em estudos ecológicos (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).

### 4.3 BRS NA MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO

Existe mais diversidade entre microrganismos, como as bactérias, do que em todas outras formas de vida. Bactérias tem colonizado com sucesso todos ambientes na terra por causa de sua rápida adaptação às condições ambientais e o uso de uma vasta variedade de nutrientes para gerar energia. Contudo, até recentemente,

ambientes de muitos campos de petróleo foram considerados hostis para o crescimento bacteriano devido a baixa disponibilidade de água, altas temperaturas, salinidade e pressão (BASS; LAPPIN-SCOTT, 1997).

Após experimentos realizados na Inglaterra e Estados Unidos obteve-se um melhor entendimento da microbiologia do subsolo marítimo, mostrando que microrganismos podem viver em temperaturas superiores a 100°C, em valores de pH entre 1 e 11, na presença ou ausência de oxigênio e em soluções de NaCl superiores a 30%. Com o advento desses conhecimentos, microbiologistas voltaram sua atenção para os campos de petróleo como habitats para microrganismos (BASS; LAPPIN-SCOTT, 1997).

Dentre esses organismos está presente um grupo de bactérias que usam compostos baseados em enxofre como parte de sua cadeia energética e usam compostos simples de carbono como fonte nutricional. Como resíduo metabólico essas bactérias produzem sulfeto de hidrogênio, o qual é venenoso para humanos e corrosivo para tubulações e tanques.

Desde o começo da produção comercial de óleo, cerca de 150 anos atrás, os engenheiros de petróleo identificaram problemas causados por microrganismos. Bactérias redutoras de sulfato (BRS) foram rapidamente reconhecidas como responsáveis pela formação de H<sub>2</sub>S, dentro de campos ou em instalações, o qual reduz a qualidade do óleo, corrói materiais, ameaça a saúde de trabalhadores devido a sua alta toxicidade (CORD-RUWICH; KLEINITZ; WIDDEL, 1987), sendo também, a redução de sulfato pelas BRS um dos mecanismos mais significativos de produção de H<sub>2</sub>S no *souring* do campo (SUNDE; THORESTENSTON; TORSVIK, 1993).

O primeiro estudo microbiológico descrevendo a presença difundida de BRS em campos de produção de petróleo foi publicado por Bastin em 1926. Nesse artigo, abordou-se um tema que permaneceu por muito tempo um enigma: são essas bactérias indígenas, ou foram elas introduzidas nos campos através do fluxo de água a partir da superfície ou em operações de produção? (BASTIN, 1926). Até recentemente, o subsolo marinho era considerado estéril, e que, bactérias isoladas de tais ambientes possuíam uma origem exógena. A percepção disso foi mudada com a descoberta de uma grande e diversa população de microrganismos possuindo uma variedade de atividades metabólicas em aquíferos subterrâneos (AMY; HALDEMAN, 1997). Durante as últimas décadas, um corpo de observações convergentes tem

mostrado que microrganismos indígenas habitam campos profundos de produção aquáticos, bem como terrestres (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

A maioria das BRS mesófilas isoladas a partir de variados campos de petróleo pertencem ao gênero *Desulfovibrio*. Outras BRS mesófilas pertencem ao gênero *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter* e *Desulfobacterium* (AGRAWAL; VANBROEKHOVEN; LAL, 2010). Essas BRS são em sua maioria halotolerantes ou moderadamente halófilas, e crescem otimamente entre 30 e 40°C (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

Na Índia, um estudo analisou dois campos de petróleo em fase de recuperação primária, sem uso de água de injeção, mas que apresentavam *souring* e corrosão nas estações de coleta do óleo; sendo identificadas BRS e bactérias redutoras de tiosulfato (AGRAWAL; VANBROEKHOVEN; LAL, 2010), mostrando a presença desses organismos mesmo sem haver o *water-flooding*, que seria a maior fonte exógena de contaminação de poços.

Dados sugerem que apenas anaeróbios restritos podem ser considerados como verdadeiramente indígenas em campos de petróleo. Essa consideração é fortalecida por características fisiológicas de algumas espécies isoladas que, quando relatadas, mostraram-se adaptadas a condições *in situ* (BERNARD; CONNAN; MAGOT, 1992). A presença de bactérias intimamente relacionadas em campos de petróleo remotos também dá suporte a existência de uma biosfera anaeróbica bem difundida neles (GRASSIA et al., 1996).

Em seu estado dormente, as BRS são menores que sua contrapartes em crescimento e podem viajar por longas distâncias através da rede porosa durante o processo de *water-flooding* (SEN, 2008). O impacto econômico do *souring* de campos (produção *in situ* de H<sub>2</sub>S) na produção de óleo é considerável. Seu mecanismo é apenas parcialmente compreendido: BRS estão envolvidas e o processo de *water-flooding* pode fornecer nutrientes limitantes para o reservatório, tal como o sulfato presente na água do mar. Estudos microbiológicos para determinar a presença ou ausência de BRS indígenas, sua quantificação e a análise dos nutrientes disponíveis oriundos de água produzida, podem ajudar no planejamento de medidas preventivas contra o *souring* do reservatório (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

#### 4.4 BIOFILMES

Muitas bactérias tem a tendência natural de crescer melhor sobre superfícies (rochas, superfícies metálicas) do que em seu estado livre, na forma planctônica. Biofilmes consistem em um grupo de bactérias ligadas umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces, envoltas em uma matriz exopolimérica hidratada. Essa definição inclui agregados microbianos e flóculos e também populações aderentes dentro de espaços porosos ou meios porosos (BANIN; BRADY; GREENBERG, 2006; BASS; LAPPIN-SCOTT, 1997; COSTERTON et al., 1995).

Microrganismos são facilmente ligados a superfícies de materiais (DU et al., 2007). Quando um objeto é imerso na água do mar, primeiramente fragmentos orgânicos se aderem a superfície do material, formando finos filmes, os quais mudam as características da superfície do material, especialmente sua carga estática e umectabilidade. E então as bactérias se aderem à superfície e crescem para formar colônias. Finalmente os então chamados biofilmes podem ser formados após diatomáceas, fungos, protozoários, microalgas e outros organismos serem aderidos a superfície (ZHANG; WEN; CAO, 2011).

Foi demonstrado que os produtos originados da corrosão do aço por biofilmes de BRS também afetam a taxa de corrosão (RAMAN; TAMILSELVI; RAJENDRAN, 2008) e que essa taxa é dependente da acumulação de metabolitos de BRS na superfície dos materiais (YUAN et al., 2009).

De importância ambiental, bactérias envoltas em biofilmes são muito mais resistentes a biocidas que suas contrapartes de vida livre não ligadas e individuais, permitindo também melhor uso de nutrientes e outros recursos (BANIN; BRADY; GREENBERG, 2006; BASS; LAPPIN-SCOTT, 1997; COSTERTON et al., 1995). Cada biofilme bacteriano vive em um micronicho customizado em uma comunidade microbiana que tem homeostase primitiva, um sistema circulatório primitivo, e cooperatividade metabólica, e cada uma dessas células sesses nesse ambiente especial reage de forma diferente da encontrada em células planctônicas da mesma espécie (COSTERTON et al., 1995).

A real significância dos biofilmes bacterianos emergiu gradualmente desde sua primeira descrição (ZOBELL; ANDERSON, 1936) e o primeiro reconhecimento de sua ubiquidade (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). Tornou-se claro que os

biofilmes constituem uma fase distinta de crescimento bacteriano que é profundamente diferente das fases planctônicas estudadas durante as 15 décadas seguintes as descobertas de Louis Pasteur (COSTERTON et al., 1995). Muitos trabalhos foram publicados, mostrando a predominância dessas bactérias sésseis em vários problemas ambientais (DIÓSI et al., 2003).

Os biofilmes estão envolvidos em variados problemas, tais como infecções médicas, entupimento de sistemas de refrigeração de água, contaminação de produtos e corrosão influenciada microbiologicamente (MIC – *Microbiologically influenced corrosion*), que possui grande importância na indústria petrolífera (BANIN; BRADY; GREENBERG, 2006; DIÓSI et al., 2003; RAAD et al., 2003).

Acredita-se que os biofilmes protegem as bactérias sésseis do ataque de biocidas (DENYER, 1995; MORTON et al., 1998). Foi mostrado que densos biofilmes com células sésseis, aderidas umas às outras por substâncias de matriz extracelular aumentam a resistência de transferência de massa (STOODLEY et al., 1998). O limitado suprimento nutricional reduz a atividade metabólica da bactéria e aumenta a resistência aos biocidas. Foram discutidos os possíveis mecanismos de resistência antimicrobiana dos biofilmes (ALLISON; MAIRA-LITRAN; GILBERT, 2000). A teoria da limitação dos sistemas reação-difusão, proposta pelo cientista Alan Turing em 1952 e confirmada apenas recentemente, pode explicar o comportamento e organização dos biofilmes de BRS (BLAGODATSKI et al., 2015; TURING, 1952). Em adição a essa barreira a antimicrobianos/biocidas, EPS (Exopolissacarídeos) podem reagir com biocidas, assim reduzindo a efetividade desses. Outros sugerem que um biofilme pode mudar a fisiologia de bactérias sésseis, o que aumentaria sua resistência a biocidas (FUX et al., 2005; MORTON et al., 1998).

Uma concentração muito alta de biocidas pode ser necessária para remover bactérias sésseis, comparado com a dosagem para tratar bactérias planctônicas (DAVIES, 2003; MEYER, 2003). Isso é suportado pelos resultados obtidos por (WEN et al., 2009a), que indicam que mesmo em concentrações altas de glutaraldeído (500 ppm) para o tratamento do pré-crescimento de biofilmes de BRS, células sésseis ainda eram observadas. Um tratamento mais efetivo é desejado para reduzir a dosagem de tais substâncias.

Traços de metais como manganês, zinco, ferro são necessários para o metabolismo microbiano e crescimento do biofilme (DUNNE; BURD, 1992). Foi

relatado que o cálcio pode ser essencial na ligação das moléculas de polímero no biofilme (CARPENTIER; CERF, 1993). Por esse motivo, a adesão bacteriana é sensível a agentes quelantes, os quais tem sido introduzidos para tratar biofilmes durante a sanitização de instrumentos médicos (BANIN; BRADY; GREENBERG, 2006; CHUDZIK et al., 2007; TAWEECHASUPAPONG; DOYLE, 2000).

Foi relatado que o quelante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etileno diamino tetracético) combinado com o antibiótico minociclina é mais efetivo na erradicação de biofilmes em superfícies de cateteres do que com o uso isolado desse último (RAAD et al., 2003). Também foi mostrado que a erradicação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Candida parapsilosis* foi aumentada rapidamente com o uso de etanol a 25% com minociclina-EDTA (RAAD et al., 2007) e que a formação de biofilmes é suprimida por quelantes férricos (WEINBERG, 2004).

O EDDS (*Ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid* – ácido etilenodiamino-N,N'-dissuccínico) aumenta a atividade do gluteraldeído em biofilmes já estabelecidos (WEN et al., 2009a). BRS sésseis foram encontradas em *coupons* tratados apenas com gluteraldeído a 30 ppm. Com a adição de EDDS a 2000 ppm, as BRS mal puderam ser vistas a microscopia. Novamente, foi mostrado que o efeito potenciador do EDDS sobre o gluteraldeído a 30 ppm foi melhor do que o uso apenas desse último a 500 ppm sem EDDS. O EDDS pode inibir a adesão bacteriana e formação dos biofilmes por quelarem vários cátions divalentes, e.g.  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , de lipopolissacarídeos que são chave para as matrizes de biofilmes, aumentando a permeabilidade da membrana externa de bactérias gram negativas. Com a ajuda do EDDS, o gluteraldeído pode facilmente penetrar através dos biofilmes de BRS e sua membrana externa, obtendo uma eficácia maior na inibição do crescimento de BRS sésseis (ALLISON; MAIRA-LITRAN; GILBERT, 2000; VAARA, 1992).

Foi relatado que o efeito sinérgico do citrato de monocobre II (MCC) com agentes antimicrobianos (PIET; ROSSMOORE, 1984). Os autores afirmaram que o possível mecanismo de ação seja devido ao fato de que íons tóxicos de cobre formam complexos com MCC no meio líquido com alto pH, os quais penetram as células em pH neutro. Posteriormente eles patentearam esses usos, sendo uma das aplicações específicas os fluídos de metalurgia.



#### 4.5 MÉTODOS DE CONTROLE E RESPOSTA MICROBIANA

Com o objetivo de reduzir os problemas causados pela presença de BRS em campos de petróleo, várias técnicas têm sido aplicadas. Métodos químicos são as formas mais simples e efetivas. Entre as estratégias empregadas pode-se realçar: a) o uso de sequestrantes químicos para a remoção da produção de sulfeto; b) o uso de tubulações não metálicas ou revestidas com materiais resistentes a presença do H<sub>2</sub>S; c) o uso de inibidores (LARSEN; ROD; ZWOLLE, 2004); d) a seleção de fontes de injeção de água com baixo teor de sulfato, ácidos graxos voláteis, nutrientes e biomassa; e) a remoção do sulfato presente na água de injeção através da osmose reversa ou nanofiltração em membrana (JORDAN; WALSH, 2004; RIZK et al., 1998; ROBINSON et al., 2010) f) o controle dos níveis de oxigênio na água de injeção (CHANG; CHANG; CHEN, 2007); e g) o controle da atividade microbiana através do uso de biocidas (LARSEN; SANDERS; TALBOT, 2000; MAXWELL et al., 2002).

Também tem se dado considerável atenção ao uso de inibidores de origem inorgânica, tais como os íons nitrato (DAVIDOVA et al., 2001; GREENE et al., 2003; JENNEMAN; MCINERNEY; KNAPP, 1986; MYHR et al., 2002). Os íons nitrato agem pela estimulação do crescimento de microrganismos nativos que competem com as BRS pela fonte de carbono no meio, oxidam biologicamente os sulfetos gerados a partir das BRS e produzem intermediários, tais como os nitritos, os quais aumentam o potencial redox (HUBERT et al., 2005). Sabe-se que algumas BRS são capazes de reduzir o nitrato ao invés do sulfato. Embora os estudos com nitrato sejam efetivos em laboratório e em alguns estudos de campo, esse tratamento não remove o acúmulo de biomassa nos poros das rochas do reservatório, não prevenindo o entupimento das mesmas. Adicionalmente, alguns estudos questionam a efetividade do uso do nitrato no controle da biocorrosão, sugerindo que, em alguns casos, pode haver aumento da taxa de corrosão (HUBERT et al., 2005; JESUS et al., 2015; REMPEL; EVITTS; NEMAT, 2006).

Sabe-se que o molibdênio é um elemento químico essencial para sistemas biológicos, incluindo as BRS (BISWAS et al., 2009). Ele é utilizado por esses organismos na síntese de enzimas responsáveis por catalisar reações de redução e tem importante papel nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre (AGUILAR-BARAJAS et al., 2011).

Contudo, um ambiente com altas concentrações desse elemento é impróprio para o desenvolvimento de MO (BISWAS et al., 2009). O ion molibdato é um análogo funcional do sulfato, que, durante os processos de respiração celular pode ser transportado na bactéria, resultando na privação de compostos reduzidos de enxofre (AGUILAR-BARAJAS et al., 2011; PATIDAR; TARE, 2005). Dessa forma ele age como um inibidor metabólico ion específico, que limita a redução de sulfato e é tóxico para esses organismos. Alguns estudos investigaram a concentração mínima de molibdato necessária para a inibição do crescimento de grupos de BRS (AGUILAR-BARAJAS et al., 2011; BISWAS et al., 2009; CARABALLO, 2008; PATIDAR; TARE, 2005; PREDICALA et al., 2008).

Foi relatado que concentrações acima de 2 mM de molibdato são suficientes para eliminar completamente a produção de sulfeto em um meio com 20 mM de sulfato, concluindo que a efetividade da inibição deve ocorrer sempre que a relação molar molibdato/sulfato for maior que 1:10 (BISWAS et al., 2009).

Pesquisadores utilizaram um consórcio de BRS enriquecido partir de campos de petróleo do recôncavo baiano para realizar um estudo cinético de inibição da redução do sulfato e testes para determinar a concentração inibitória mínima do molibdato em meio líquido contendo 10,4 e 20,8 mM de sulfato. Foi encontrado que, independente da concentração de molibdato, a redução do sulfato foi inibida logo após as primeiras horas de começo do experimento e que, a conversão de sulfato sem o molibdato foi de 78%, ao passo que com o uso do molibdato foi reduzida para 30% em 216h (JESUS et al., 2015). Nesse experimento os autores mostraram que uma concentração de 0,08 mM de molibdato foi suficiente para inibir a redução do sulfato pelas BRS em até 168h de cultura.

#### 4.5.1 *Biocidas e resistência microbiana*

Biocidas são substâncias que matam ou inativam microrganismos. Sabe-se que são o método de mais rápido manejo, sendo amplamente usados na indústria do petróleo em programas de tratamento intermitente para matar as BRS. Sabe-se que as formas latentes de BRS são menos afetadas pelos tratamentos convencionais de biocidas do que as populações ativas em crescimento (BASS; LAPPIN-SCOTT, 1997;

MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000; MCINERNEY; NAGLE; KNAPP, 2005; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003), e que a ação de biocidas sobre BRS termófilas é menor do que para outros tipos de BRS, sendo organismos resistentes a ação dessas substâncias (ZHANG et al., 2009). No passado foi proposto que a injeção de ar poderia matar esses organismos, porém sabe-se que algumas BRS podem permanecer em estado latente mesmo na presença de oxigênio (ABU SHAQRA; HILL, 1984).

O EDTA é uma substância capaz de aumentar a atividade inibitória do gluteraldeído e do THPS em crescimentos planctônicos de BRS (WEN et al., 2009b), porém a sua lenta biodegradabilidade provocou um apelo para sua substituição por quelantes verdes (WEN et al., 2009a), em várias aplicações industriais, como em oleodutos da indústria do petróleo.

Com o aumento das restrições das regulações ambientais e preocupação com a segurança no uso em larga escala de biocidas em campos de petróleo, pesquisadores buscam novas formas de tornar os biocidas mais efetivos. Foi demonstrado que o quelante biodegradável EDDS é capaz de aumentar a atividade do gluteraldeído no tratamento de biofilmes de bactérias redutoras de sulfato (BRS), reduzindo consideravelmente as doses de gluteraldeído necessárias para inibição do estabelecimento de biofilme e no tratamento dos biofilmes já estabelecidos em superfícies metálicas (WEN et al., 2009a). Outra preocupação com o uso indiscriminado de biocidas é a possibilidade de esses estarem fazendo uma seleção de cepas resistentes desses organismos, da mesma forma que os antibióticos têm criado bactérias super-resistentes.

O gluteraldeído é um biocida amplamente utilizado em campos de petróleo, bem como o THPS, compostos quaternários de amônio (QAC – quaternary ammonium compounds) e bromo-nitropropanodiol (BNDP). Uma das vantagens do THPS é que além de atuar como biocida, ele também reduz as concentrações de H<sub>2</sub>S, além de poder dissolver ions sulfeto na presença de ions amônio (DOW MICROBIAL CONTROL, 2009).

Por causa de seu amplo espectro e biodegradabilidade, o gluteraldeído foi muito utilizado pela indústria do petróleo. Em experimentos in vitro (WEN et al., 2009a) foi demonstrado o efeito inibidor dessa substância em culturas de BRS. Por causa de sua interação com o meio de cultura, o gluteraldeído exhibe maior inibição, i.e. a supressão ou atraso, do crescimento das BRS do que a sua morte (ÇETIN; BILGIÇ;

DÖNMEZ, 2007; GARDNER; STEWART, 2002; GÓMEZ DE SARAIVIA; DE LORENZO MELE, 2005; VON REGE; SAND; VON RÄ"GE, 1998).

Foi relatado que 50 ppm de gluteraldeído é capaz de retardar o crescimento de BRS planctônicas em até 143 horas em meio Postgate C (GARDNER; STEWART, 2002). Também foi demonstrado que a concentração de 30 ppm de gluteraldeído combinada com 2000 ppm de EDDS é efetiva para controlar o crescimento de BRS, enquanto que o biocida sozinho perde seu efeito de inibição após 5 dias de inoculação (WEN; GU, 2007). Desde que um quelante não pode ele mesmo inibir o crescimento planctônico de BRS, ele precisa ser combinado com um biocida para ter efeito. No mesmo trabalho foi mostrado que um tratamento com 20 ppm de gluteraldeído combinado com 2000 ppm de EDDS apresentou resultado melhor do que apenas o gluteraldeído a 30 ppm.

O cloro é um dos desinfetantes mais utilizados para o controle microbiano da água potável. Estudos com *E. coli* tem demonstrado que ele interfere em importantes propriedades da membrana celular, como o potencial Zeta, a permeabilidade e a fosforilação oxidativa (VENKOBACHAR; IYENGAR; RAO, 1977). Experimentos com *Mycobacteria* mostraram que o dióxido de cloro apresentou maior eficiência do que o cloro livre, enquanto esses dois desinfetantes mostraram praticamente o mesmo nível de inativação em *S. aureus*.

É bem conhecido que reações de adição e substituição em ligações insaturadas são mais fáceis de ocorrer com o cloro livre do que com o seu dióxido. Pesquisadores também observaram que o cloro livre reage com ácidos graxos insaturados, destruindo a configuração celular e, eventualmente, matando as células (VIRTO et al., 2005a). Foi especulado que a inativação por meio do cloro livre baseia-se principalmente no ataque a ligações insaturadas, ao passo que a inativação pelo dióxido de cloro ocorre principalmente por oxidação. Conseqüentemente, o dióxido de cloro é mais efetivo que o cloro livre quando o objetivo é desinfetar bactérias resistentes ao cloro como *Mycobacteria*, a qual possui ácidos graxos saturados de cadeia longa na membrana e parede celular (CHEN et al., 2012). Outros estudos demonstraram que espécies de *Mycobacteria* que crescem em condições nutricionais baixas resultam em alta resistência ao cloro (FALKINHAM, 2003). Células de *M. avium* crescidas em água apresentaram resistência ao cloro 10 vezes maior do que aquelas crescidas em meio de cultura (TAYLOR et al., 2000).

Estudos de sensibilidade de *E. coli* demonstraram que as condições de crescimento, especialmente a disponibilidade de nutrientes, podem alterar a composição lipídica das células (MASSA; LOPEZ VINALS; FARIAS, 1988). Acredita-se que os lipídios de membrana podem agir como uma barreira física, reduzindo a taxa de penetração e subseqüente oxidação de materiais celulares internos (STEWART; OLSON, 1992). Sabe-se que *M. mucogenicum* contém ácidos graxos saturados de cadeia longa, levando-a a uma característica estrutural mais hidrofóbica, a qual previne que desinfetantes iônicos de cloro difundam e penetrem na célula. Adicionalmente, altas proporções de ácidos graxos saturados reduzem a fluidez de membrana, limitando o movimento de desinfetantes de cloro para dentro da célula. O cloro livre reage com ácidos graxos insaturados da membrana celular e inativa as células. Foi mostrado que a membrana de *Mycobacteria* é rica em ácidos graxos saturados de cadeia longa. Portanto, *Mycobacteria* pode ser mais resistente ao cloro do que outras bactérias que são ricas em ácidos graxos insaturados (CHEN et al., 2012).

Os critérios de viabilidade microbiana podem ser considerados como culturabilidade, i.e. a capacidade de microrganismos crescerem em meios de cultura, atividade metabólica e integridade da membrana (NOCKER; CAMPER, 2009). Um estudo sugeriu que o cloro afeta a culturabilidade e a atividade metabólica mais rápido do que a integridade da membrana (LISLE; PYLE; MCFETERS, 1999; NOCKER; SOSSA; CAMPER, 2007). Foi observado que a concentração de cloro necessária para a permeabilização de membrana é muitas vezes maior do que a necessária para a inativação das células, indicando que o dano a membrana não é um fator essencial na morte celular causada pelo cloro (VIRTO et al., 2005b).

Quando microrganismos são expostos a agentes catiônicos, como os compostos quaternários de amônio (QAC – quaternary ammonium compounds) ocorrem os seguintes eventos: (i) adsorção e penetração do agente na parede celular; (ii) reação com a membrana citoplasmática (lipídio ou proteína) seguida por sua desorganização; (iii) vazamento de material intracelular de baixo peso molecular; (iv) degradação de proteínas e ácidos nucléicos; e (v) lise de parede provocada por enzimas autolíticas. Dessa forma, haveria uma perda de organização estrutural e integridade da membrana citoplasmática em bactérias, juntamente com outros efeitos nocivos para a célula bacteriana (W.B, 1999).

#### 4.5.2 Estado fisiológico VBNC

É conhecido que muitos patógenos, bem como não patógenos, possuem a capacidade de entrarem em um estado de dormência conhecido como “viável mas não cultivável” (*viable but nonculturable* – VBNC), e sua significância na medicina, biorremediação, uso de bactérias como indicadores fecais, e em muitos estudos microbiológicos onde a culturabilidade é empregada como único indicador de viabilidade, tem se tornado evidente (OLIVER, 2005).

Bactérias no estado VBNC não crescem em meios bacteriológicos de rotina, nos quais elas normalmente crescem e se desenvolvem em colônias, mas são vivas e capazes de retomarem sua atividade metabólica. Células no estado VBNC tipicamente demonstram níveis muito baixos de atividade metabólica, mas em “ressuscitação” são novamente cultiváveis (OLIVER, 2000a).

A exposição a um ou mais estresses resulta no declínio de unidades formadoras de colônia. Contudo, durante esse período de declínio, contagens celulares totais geralmente permanecem relativamente constantes. O teste chave para determinar se tais células estão mortas ou vivas, mas no estado VBNC, é a “contagem de viabilidade”. Muitos experimentos podem ser usados para demonstrar essa característica, mas em todos os casos eles caracterizam alguns aspectos da atividade metabólica ou da integridade celular, os quais indicam que as células estão vivas, mesmo que incapazes de se desenvolverem em colônias no meio de cultura (OLIVER, 2005).

Quando as condições nutricionais se tornam desfavoráveis algumas espécies de bactérias, sésseis e planctônicas, reduzem de tamanho para formar ultramicrobactérias ( $\pm 0,3 \mu\text{m}$ ). Esse processo é conhecido como *starvation survival*. Nesse estado reversível, o DNA das células é estabilizado, enquanto suas capacidades metabólicas são seletivamente reduzidas para formar células dormentes que podem ser completamente “ressuscitadas” após muitos anos (COSTERTON et al., 1995).

O estado VBNC difere significativamente do estado *starvation survival*, em que as células também sofrem uma dramática redução do metabolismo, mas que podem ser cultiváveis. Um estudo proteômico recente, em *Enterococcus faecalis*, demonstrou

que os perfis de células que entram no estado VBNC é marcadamente diferente do crescimento exponencial e de células em starvation survival (HEIM *et al.*, 2002).

Células entram no estado VBNC como resposta a alguma forma de estresse natural, tais como starvation, incubação fora da faixa de temperatura de crescimento, elevadas concentrações osmóticas ou exposição a luz branca (OLIVER, 2000b). Esses são típicos estresses ambientais que poderiam ser letais se as células não entrassem em seu estado de dormência. Em adição, estudos tem mostrado que processos assumidos como bactericidas podem na verdade conduzir ao estado VBNC de bactérias. Esses incluem a pasteurização do leite (GUNASEKERA *et al.*, 2002) e cloração de águas residuais (OLIVER; DAGHER; LINDEN, 2005).

Enquanto a determinação do número total de células presentes em uma população pode ser obtida utilizando DAPI ou Laranja de Acridina, contagens de células viáveis podem ser determinadas usando ensaios de substratos responsivos (KOGURE; SIMIDU; TAGA, 1979), pela examinação da hidrólise intracelular ou redução de moléculas como indicação da atividade metabólica (RODRIGUEZ *et al.*, 1992; ZIMMERMAN; ITURRIAGA; BECKER-BIRCK, 1978), ou pela detecção da integridade da membrana citoplasmática, e.g. BacLight ou iodeto de propídio (OLIVER, 2005).

Em experimento utilizando um citometro de fluxo multi-paramétrico (PORTER; EDWARDS; PICKUP, 1995) foi encontrado que medidas do potencial de membrana, integridade membranar e atividade enzimática intracelular podem fornecer extensiva evidência para a validade de métodos para o monitoramento durante a adoção do estado VBNC em *E. coli* com privação nutricional.

Células que entram no estado VBNC frequentemente exibem *dwarfing* (redução de volume) e durante esse período um número de mudanças metabólicas ocorrem, incluindo redução no transporte de nutrientes, taxa de respiração e síntese macromolecular (OLIVER, 2000c; PORTER; EDWARDS; PICKUP, 1995). A biossíntese não cessa, contudo, e durante esse período, novas proteínas de inanição e de choque térmico são formadas (MCGOVERN; OLIVER, 1995; MORTON; OLIVER, 1994). Os níveis de ATP, os quais declinam rapidamente em células mortas ou "moribundas", tem sido encontrados permanecendo altos em células VBNC (BEUMER; DE VRIES; ROMBOUTS, 1992; FEDERIGHI *et al.*, 1998). Outros estudos demonstraram expressão gênica continuada em células VBNC (LLÉO *et al.*, 2001;

YARON; MATTHEWS, 2002). Células nesse estado podem ser capazes de captação ativa de metionina e sua incorporação em proteínas (RAHMAN et al., 1994). Mudanças extensivas na composição de ácidos graxos em membranas citoplasmáticas parecem ser essenciais para as células entrarem nesse estado (DAY; OLIVER, 2004), e essas mudanças são necessárias para a continuação do potencial de membrana (PORTER; EDWARDS; PICKUP, 1995; THOLOZAN et al., 1999). Mudanças significantes nas características bioquímicas das paredes celulares de células VBNC tem sido documentadas. A parede de peptidoglicano de *E. coli* que estão entrando no estado VBNC aumentam a reticulação (ou ligação cruzada), aumento de lipoproteínas covalentemente ligadas a muuropeptídeos de rolamento, e encurtamento das fitas de glicano em comparação com células em crescimento exponencial.

Apesar de estudos demonstrarem que bactérias podem permanecer VBNC no solo por um ano (BUNKER; BATES; OLIVER, 2004), esse estado apenas será significativo para a sobrevivência do organismo se ele for capaz de novamente se tornar metabolicamente ativo.

#### 4.6 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Dentro do contexto das BRS, é necessário que estejam disponíveis métodos válidos para a contagem dessas bactérias, permitindo estudos quantitativos de sua ecologia, particularmente em relação a corrosão, poluição, formação de enxofre, e outros fenômenos de importância econômica (POSTGATE, 1959).

Métodos tradicionais de cultura são laboriosos e demorados, conseqüentemente existe uma demanda para o desenvolvimento e a validação de uma rápida detecção e *screening* de bactérias. Recentemente, métodos moleculares como a PCR e a qPCR tem focado em marcadores genéticos, podendo reduzir o tempo de detecção a menos de 3 dias. A qPCR é mais rápida e mais sensível que a PCR convencional e fornece dados em tempo real sem a necessidade do uso de géis (VALASEK; REPA, 2005).

Outra ferramenta molecular promissora para a detecção de bactérias é o ensaio de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification – Multiplicação isotérmica mediada



por Loop) (HARA-KUDO et al., 2005). LAMP é uma técnica que multiplica ácidos nucleicos através da Bst DNA polimerase sob condições isotérmicas com altos níveis de especificidade, eficiência e velocidade (MORI et al., 2001; NOTOMI et al., 2000). A LAMP difere da PCR no fato de que quatro a seis primers são usados para a Multiplicação de um único gene alvo. A Multiplicação utiliza uma única etapa de temperatura de 63°C a 65 °C e é mantida a 65°C por 60 minutos. Muitos amplicons com várias conformações estruturais são produzidos nas reações de LAMP. Esses fragmentos resultantes podem ser detectados por turbidez simples ou fluorescência, a última das quais é relacionada com a produção de pirofosfato de magnésio, um coproduto das reações. A LAMP tem muitas vantagens sobre a PCR, incluindo o uso de um equipamento simples e custo efetivo, bem como altos níveis de especificidade e eficiência de multiplicação (NOTOMI et al., 2000).

Apesar dessa vantagem, a LAMP também tem a limitação de não distinguir células viáveis de não viáveis, particularmente pelo fato de que o DNA bacteriano é mais estável que o RNA bacteriano, podendo persistir em uma amostra mesmo após a morte de um organismo (DRAHOVSKÁ et al., 2001). Técnicas de multiplicação de ácidos nucleicos que utilizam a enzima transcriptase reversa (reverse transcriptase – RT) tem o potencial de detectar células viáveis, sendo altamente dependente da produção suficiente do mRNA alvo, e a ausência da expressão dessas moléculas em células vivas pode dificultar a distinção de microrganismos mortos dos vivos em matrizes alimentares (ZHANG; BROWN; GONZÁLEZ-ESCALONA, 2011).

Apesar da importância das ferramentas moleculares, existe a necessidade de desenvolver um procedimento simples, custo efetivo para monitorar a viabilidade celular e compreender seu comportamento em amostras ambientais sob diferentes condições. A aplicação de técnicas de filtro de epifluorescência direta em conjunção com corantes fluorescentes de viabilidade pode fornecer importantes informações na avaliação da viabilidade celular (OLSZEWSKA; PANFIL-KUNCEWICZ; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2014), porém são métodos laboriosos, o que muitas vezes dificulta a análise de numerosas amostras.

#### 4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ASSOCIADA A MONOAZIDA DE PROPÍDIO

É bem conhecido que a PCR (reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction*) é uma das ferramentas analíticas mais promissoras na análise microbiológica clínica e ambiental, devido a sua especificidade e sensibilidade (MCKILLIP; JAYKUS; DRAKE, 1999; NOGVA; RUDI, 2003). Contudo, métodos convencionais de PCR não distinguem células viáveis de mortas (VAN DER VLIET et al., 1994).

O DNA extraído de células mortas por calor ou outros tratamentos serve como template para PCR muitos dias após a perda de viabilidade celular (CHAIYANAN et al., 2001; NOGVA; RUDI, 2003), também podendo persistir por longos períodos em ambientes naturais se protegido da ação de DNAses, eg. pela aderência a partículas de solo (OGRAM; SAYLER; BARKAY, 1987). A presença de células mortas, portanto, limita o uso da PCR para o monitoramento microbiano. Vários autores tentaram detectar apenas células viáveis através da detecção de mRNA por RT-PCR (BENTSINK et al., 2002; MCBAIN et al., 2003; NOVAK; JUNEJA, 2001; VAN BECKHOVEN; STEAD; VAN DER WOLF, 2002; VAN DER VLIET et al., 1994). A DNA-PCR, contudo, apresenta sinais de multiplicação mais fortes, comparada aos da RT-PCR com um mesmos grupos de primers, indicando baixa eficiência da multiplicação do RNA, comparada a do DNA (MCKILLIP; JAYKUS; DRAKE, 1999).

A detecção seletiva de bactérias viáveis, mas não mortas, é o principal problema no diagnóstico baseado em ácidos nucleicos (RUDI et al., 2002). A cultura microbiana e a qPCR são os métodos mais usados para a quantificação de microrganismos em diferentes condições ou ambientes (MACIEL et al., 2011; SONTAKKE et al., 2009). Contudo, essas técnicas têm limitações, na medida em que tendem a subestimar ou superestimar contagens microbianas. Métodos que utilizam cultura, permitem apenas a contagem de células viáveis que são capazes de formar colônias em meios nutritivos, sem haver a detecção de células mortas, viáveis mas não cultiváveis e aquelas que requerem condições especiais de crescimento (CERCA et al., 2011; OLIVER, 2005). Por outro lado, a qPCR detecta o DNA de todas células em uma amostra, incluindo o DNA de células mortas ou de algumas delas que possa ser encontrado no ambiente (ELIZAQUÍVEL et al., 2012; PATHAK et al., 2012),

resultando em falsos positivos (NOGVA; RUDI, 2003). De fato, o DNA derivado de células destruídas por calor, desinfetantes e antibióticos pode servir como *template* para multiplicação por PCR por muitos dias após a perda da viabilidade celular (CHAIYANAN et al., 2001; NOGVA; RUDI, 2003; RUDI; MOEN; HOLCK, 2005). A possibilidade de resultados de PCR falso positivos limita a aplicação da técnica para o monitoramento microbiano (WANG; LEVIN, 2006).

Novos agentes intercalantes tem sido utilizados junto a reação de qPCR para discriminar e contar ambas células vivas e mortas em uma amostra microbiológica. Essa nova metodologia foi inicialmente descrita por (NOGVA; RUDI, 2003) e é baseada no uso da monoazida de propídio (*propidium monoazide* – PMA) ou monoazida de etídio (EMA – Etidium Monoazide), ambos derivados do iodeto de propídio (PI – *Propidium iodide*) utilizado em microscopia e citometria de fluxo para corar células mortas. Quando o PI penetra nas membranas de células que perderam sua integridade, o PI liga-se ao dsDNA, e se o complexo dsDNA-PI for excitado com um comprimento de onda de 493 nm, esse emite uma fluorescência de 630 nm (cor vermelha). O PMA e o EMA mantem as mesmas características do PI, porém, se o dsDNA-PMA/EMA for fotoativado (usando luz visível brilhante), o grupo monoazida é convertido a um radical nitreno altamente reativo, o qual reage com qualquer hidrocarboneto do meio para formar uma ligação covalente estável (NOCKER; CAMPER, 2006; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; ZHAO et al., 2013). Essa modificação permanente do DNA torna-o insolúvel, resultando em sua perda durante a extração, e também previne seu uso como um template para a reação de PCR. Ao mesmo tempo que ocorre a inativação do DNA, a luz também reage o excesso de corante com moléculas de água. A Hidroxilamina resultante não é mais reativa, não havendo a modificação do DNA de células com membranas intactas durante os procedimentos de extração (NOCKER; CAMPER, 2009).

Portanto, o pré-tratamento de uma amostra com PMA/EMA previne a multiplicação do DNA de células mortas, permitindo ao método de qPCR a discriminação quantitativa entre células vivas e células mortas (CHANG et al., 2010; HEISE et al., 2016; NOCKER; CAMPER, 2006; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006). Embora, ambas monoazidas inativem o DNA em células mortas, o EMA também pode inativar frações substanciais de populações de células vivas (KOBAYASHI et al., 2009; YÁÑEZ et al., 2011). Porém o tratamento de células vivas

com PMA tem resultado em pequena ou nula perda de material genômico disponível para PCR (KOBAYASHI et al., 2010; NOCKER; CAMPER, 2006; PAN; BREIDT, 2007).

Foi levantada a hipótese de que a alta seletividade para células vivas seja devido a maior carga do PMA (duas cargas positivas) comparada ao EMA (uma carga positiva), fazendo com que seja mais difícil para o PMA penetrar membranas celulares intactas (YÁÑEZ et al., 2011).

A maioria dos estudos com EMA ou PMA para discriminação entre o DNA de células vivas e mortas, envolve o tratamento de misturas de culturas viáveis e suspensões de células mortas por aquecimento a 80°C por 5 minutos (BAE; WUERTZ, 2009; CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; GEDALANGA; OLSON, 2009; KRALIK; NOCKER; PAVLIK, 2010; VARMA et al., 2009; WANG; LI; MUSTAPHA, 2009). Contudo, quando uma microbiota bacteriana é submetida a aquecimentos variando de 45 a 90 °C por 5 minutos, tem sido encontrado que nem todo o DNA das células mortas pelo aquecimento foi inativado pelas monoazidas (LEE; LEVIN, 2009a).

As incompatibilidades entre os números de células viáveis determinadas por contagem de colônias ou estimativas por qPCR são maiores nos tratamentos com PMA do que com EMA. A incerta inativação do DNA em células expostas a temperaturas letais relativamente baixas poderia limitar o uso prático do EMA ou PMA em conjunção com a qPCR para a rápida determinação dos efeitos microbiológicos da pasteurização utilizados em alimentos (YANG; BADONI; GILL, 2011). Essa limitação pode ser resolvida se as membranas de células mortas forem rompidas por um tratamento que seja tolerado por células vivas. O desoxicolato tem sido utilizado para aumentar a inativação do DNA em células de *Vibrio vulnificus* mortas por congelamento ou temperaturas brandas (LEE; LEVIN, 2009b; VENDRAME et al., 2014).

O uso de qPCR e PMA tem sido avaliado para diferentes microrganismos de amostras ambientais e clínicas. Esse método emergiu como uma ferramenta efetiva para quantificação e discriminação de células viáveis mas não cultiváveis em organismos fastidiosos ou de crescimento muito lento (KRALIK; NOCKER; PAVLIK, 2010). Por essa metodologia foram analisadas cepas de *Escherichia coli* O157 (ZHAO et al., 2013), *Escherichia coli* (YANG; BADONI; GILL, 2011), *Mycobacterium fortuitum* (LEE; LEE; KIM, 2015), *Bacillus cereus* (FORGHANI et al., 2015), *Enterobacter*

*sakazakii* (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008), *Legionella pneumophila* (YÁÑEZ et al., 2011) bactérias presentes em filetes de Bacalhau (LEE; LEVIN, 2009a), lácticas (LAI et al., 2016), *Bacteroidales* fecais (BAE; WUERTZ, 2009), *Bacillus cereus* eméticos e não eméticos (ZHANG et al., 2014) e aerossóis bacterianos (CHANG; HUNG; CHEN, 2017). Também tem sido utilizado em amostras contendo fungos (VESPER et al., 2008), esporos (RAWSTHORNE; DOCK; JAYKUS, 2009), vírus (FITTIPALDI et al., 2010; JEONG; PARK; HA, 2017) e protozoários (FITTIPALDI et al., 2011).

A fim de auxiliar na escolha das condições que vão ser empregadas no presente trabalho, foram coletados dados referentes ao tempo de incubação, potência da lâmpada utilizada, distância entre a amostra e a lâmpada e o tempo de exposição para a fotoativação (Tabela 1). Com base nesses dados, verificou-se que as concentrações otimizadas de PMA variaram de 6 até 100 µM, sendo rara a utilização de concentrações superiores a esse valor para procaríotos.

Tabela 1: Valores de PMA e condições de incubação obtidos na literatura

Bactéria	[PMA]	Tempo de incubação	Potência da luz halógena	Distância	Tempo de exposição	Referência
<i>S. oralis</i> <i>S. gordonii</i> <i>V. parvula</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. intermedia</i>	100 µM	10 minutos	650-W	20 cm	5 minutos	(ALVAREZ et al., 2013)
<i>E. coli</i>	100 µM	5 minutos	650-W	20 cm	2 minutos	(YANG; BADONI; GILL, 2011)
<i>B. cereus</i> eméticos e enterotóxicos; Outras bactérias enterotóxicas	10 µM 5ug/mL	10 minutos	650-W	20 cm	5 minutos	(FORGHANI et al., 2015)
<i>M. fortuitum</i>	30 µM*	5 minutos	500-W	20 cm	2 minutos	(LEE; LEE; KIM, 2015)
Bactéria	[PMA]	Tempo de incubação	Potência da luz halógena	Distância	Tempo de exposição	Referência
Flora bacteriana mista	6 µM 3µg/mL	5 minutos	500-W	15 cm	10 minutos	(LEE; LEVIN, 2009a)

<i>Escherichia coli</i> O157:H7	50 µM	5 minutos	Sistema de fotoativação	N/A	15 minutos	(ELIZAQUIVEL et al., 2012)
<i>Bacteroidales</i> fecais	100 µM	5 minutos	650-W	20 cm	10 minutos	(BAE; WUERTZ, 2009)
<i>B. cereus</i> eméticos e não eméticos	10 µM 5µg/mL	5 minutos	500-W	20 cm	5 minutos	(ZHANG et al., 2014)
<i>Enterobacter</i> <i>sakazakii</i>	100 µg/mL	5 minutos	750-W	20 cm	1 minuto	(CAWTHORN; WITTHUHN, 2008)
<i>Legionella</i> <i>pneumophila</i>	50 µM	5 minutos	500-W	20 cm	2 ou 5 minutos	(YÁÑEZ et al., 2011)
<i>Acanthamoeba</i> <i>castellani</i>	200 µM	30 minutos	Sistema de fotoativação	N/A	15 minutos	(FITTIPALDI et al., 2011)
<i>Mycobacterium</i> <i>avium</i>	25 µM	5 minutos	650-W	20 cm	2 minutos	(KRALIK; NOCKER; PAVLIK, 2010)
<i>Bacteriophage T4</i>	100 µM	5 minutos	Sistema de fotoativação	N/A	15 minutos	(FITTIPALDI et al., 2010)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	100 µM	10 minutos	600-W	20 cm	5 minutos	(TASKIN; GOZEN; DURAN, 2011)

## 5. MATERIAL E MÉTODOS:

### 5.1 CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação de uma cultura de bactérias vivas e mortas através da metodologia de PMA-qPCR. Com o objetivo de preparar a cepa que será utilizada ao longo de todo projeto, uma cultura crioconservada de *Desulfovibrio vulgaris* foi ativada e conservada. A cepa *Desulfovibrio vulgaris*, foi obtida previamente da Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (número de identificação DSMZ 644). A cepa se encontrava conservada a -80°C e foi ativada em meio Postgate C modificado sob condição anaeróbica a 38°C. Após 48h de ativação foi observado crescimento microbiano (formação de precipitado férreo), sendo realizado um repique em novo meio de cultura. Após 24h foram preparados 10 criotubos para crio conservação em Glicerol 50% (1:1). A cada utilização um dos criotubos contendo a cepa crioconservada era ativado em meio Postgate C modificado.

O meio Postgate C modificado é composto pelos seguintes reagentes, em proporções para 1L: NaCl - 1,%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05%; NH<sub>4</sub>Cl – 0,1%; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1%; CaCl<sub>2</sub> – 0,1%; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – 0,183%; extrato de levedura – 0,1%; ácido ascórbico – 0,01%; tioglicolato de sódio – 0,0013%, citrato de sódio – 0,638%; lactato de sódio 0,175%; resazurina 0,025% (p/v) – 0,4% e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,05% (CARVALHO, 2010). O meio destinado aos experimentos com PMA não teve Sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), pois o mesmo origina o resíduo metabólico sulfeto de ferro, o qual escurece o meio, podendo interferir na fotoativação do PMA.

O método utilizado para obtenção de culturas com bactérias na fase Log, consistiu na ativação das cepas crioconservadas, seguido de um repique após 24h. Decorridas 16h do repique, as culturas foram utilizadas para os experimentos. Para obtenção de amostras com aproximadamente 8 Log de bactérias foi utilizado um inóculo de 1,0 mL de cultura crioconservada para ativação em 9 mL de meio. Para obtenção de culturas com aproximadamente 6,5 Log, foi utilizado um inóculo de 0,5 mL de culturas crioconservadas em 9 mL de meio.

Como forma de quantificação, foi utilizado o método do número mais provável em micropoços, com 10 diluições em triplicata. Como forma de controle de mortalidade

foi utilizada inoculação da cultura termicamente tratada em meio Postgate com sulfato de ferro ou número mais provável.

## 5.2 CONDIÇÃO DE ESTRESSE

A metodologia de uso do PMA associado a qPCR foi adaptada de estudos anteriores (NOCKER et al., 2007; NOCKER; CAMPER, 2006). Foram utilizadas amostras de bactérias vivas e mortas para os testes com PMA. Culturas microbianas crescidas em meio Postgate foram submetidas ao tratamento com PMA em diferentes concentrações, para obtenção das culturas mortas foi utilizada a exposição térmica em termobloco ou banho maria a 90°C por 15 minutos para matar as bactérias (controle de letalidade).

Após o tratamento térmico as amostras foram incubadas em banho maria a temperatura ambiente, para que a temperatura de incubação com PMA fosse a mesma utilizada nas amostras não tratadas termicamente.

## 5.3 DILUIÇÃO DAS CULTURAS ANTES DO TRATAMENTO COM PMA

Foram realizados experimentos com amostras contendo 500 µL de cultura microbiana. Para testar a presença de inibidores e do efeito do PMA em diferentes concentrações de bactérias ( $10^5$  a  $10^8$ ), também foram utilizadas diluições 50% e 25% (250 µL de amostra + 250 µL de meio de cultura e 125 µL de amostra + 375 µL de cultura).

## 5.4 OTIMIZAÇÃO DO USO DO PMA

Com base na literatura, verificou-se que as concentrações otimizadas de PMA variaram de 6 até 100 µM, sendo rara a utilização de concentrações superiores a esse valor para procariotos. Por isso, optou-se em fazer a otimização dos experimentos com concentrações de 10, 25, 50 e 100 µM. Nesses experimentos, o PMA foi



adicionado em 500  $\mu$ L de amostras aquecidas e não aquecidas e mantido em tubos de microcentrifuga de 1,6 mL transparentes. Como controle foram utilizadas culturas idênticas, aquecidas e não aquecidas, sem PMA.

Foram testados diferentes períodos de fotoativação e formas de homogeneização durante esse processo. O primeiro método utilizado consistiu na incubação da amostra com PMA no escuro por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram expostas a luz halógena por 10 minutos, usando uma lâmpada halógena de 650 W (230 V, GX6.35 FS1, 3400 K; Osram GmbH, Augsburg, Germany) a distância de 20 cm. Os microtubos foram posicionados horizontalmente no gelo, sendo homogeneizados com um agitador tipo Vortex após 5 minutos. Durante a fotoativação das amostras não aquecidas, foi feito o tratamento térmico das demais amostras em banho maria a 90°C por 15 minutos.

Depois de testar o primeiro método de tratamento com PMA, foram feitos novos testes com períodos de fotoativação de 15 e 30 minutos e redução da distância da lâmpada halógena para 15 cm. Durante a fotoativação as amostras foram vortexeadas a cada 30s para garantir uma exposição homogênea a luz. Durante a fotoativação das amostras não aquecidas, foi feito o tratamento térmico em banho maria a 90°C/15 minutos.

Determinados o melhor período e distância para a fotoativação, foi feita uma modificação no homogeneizador tipo Vortex para que fosse possível homogeneizar continuamente todas as amostras. O esquema geral de tratamento com o PMA está ilustrado na figura 1:

Figura 1: Esquema do processamento de amostras com PMA



#### 5.4.1 Determinação da concentração ótima de PMA a ser utilizada nas culturas (Amostras DV-01)

A fim de determinar a concentração ótima de PMA a ser utilizada com a cepa de *Desulfovibrio vulgaris* foi realizado um experimento com alíquotas de 500 µL da cultura DV-01 e quatro concentrações de PMA (25, 50 e 100 µM). Concentração da cultura determinada por MPN:  $1,5 \times 10^8$  ou 8,18 Log. Após alíquotar 20 microtubos com 500 µL das amostras, foi feito o tratamento térmico com exposição das culturas a 90°C em 10 delas. Oito das outras dez amostras (sem tratamento térmico) foram adicionados volumes adequados de PMA 20 mM para se obter as concentrações de 10, 25, 50 e 100 µM (duplicatas), duas amostras não tiveram adição de PMA. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras tratadas termicamente. Após aplicação do PMA, as amostras foram incubadas por 10 minutos com ocasional homogeneização e em seguida fotoativadas por 10 minutos a distância de 20 cm da lâmpada halógena com mistura após 5 minutos. Após a fotoativação, as amostras (Tabela 2) foram centrifugadas e seus pellets congelados a -80°C para posterior extração de ácidos nucleicos e realização da qPCR.

Tabela 2: Identificação das amostras DV-01

DV-01-500	DV-01-500-25	DV-01-500-50	DV-01-500-100
DV-01-T-500	DV-01-500-T-25	DV-01-500-T-50	DV-01-500-T-100

Total de amostras (duplicatas): 16. Identificação: DV-01; sufixos: 500: volume (µL); T: com tratamento térmico; 25, 50 e 100: concentrações de PMA (µM).

Com base nos resultados da qPCR, foi feito um novo experimento para otimizar a fotoativação do PMA e verificar o seu funcionamento.

#### 5.4.2 Otimização da fotoativação e verificação do funcionamento do PMA (Amostras DV-02)

Com o objetivo de verificar o funcionamento do PMA, foi feito um experimento com 500 µL da cultura DV-02, apenas com amostras mortas pelo calor e submetidas as concentrações de 50 e 100 µM de PMA com tempo de incubação de 10 minutos e fotoativação de 15 e 30 minutos com distância da lâmpada halógena de 15 cm e homogeneização a cada 30 segundos. Concentração da cultura determinada por

MPN:  $7,4 \times 10^7$  ou 7,87 Log. Após a incubação e fotoativação, as amostras (Tabela 3) foram centrifugadas e seus pellets congelados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de ácidos nucleicos e realização da qPCR.

Tabela 3: Identificação das amostras DV-02

DV-02-500-T-15	DV-02-500-T-15- 50	DV-02-500-T-15- 100	DV-02-500-T-30- 50	DV-02-500-T-30- 100
----------------	-----------------------	------------------------	-----------------------	------------------------

Total de amostras (duplicatas): 10. Identificação: DV-02; sufixos: 500: volume ( $\mu\text{L}$ ); T: com tratamento térmico; 15 e 30: tempo de exposição a lâmpada halógena; 50 e 100: concentrações de PMA ( $\mu\text{M}$ ).

Otimizada a fotoativação e verificado o funcionamento do PMA, foi feito um novo experimento para determinação da concentração ótima de PMA a ser utilizada.

#### 5.4.3 Determinação da concentração ideal de PMA após a otimização da fotoativação (Amostras DV-03)

Otimizada a fotoativação e verificado o funcionamento do PMA, foi realizado um experimento para determinação da concentração ótima de PMA a ser utilizada com a cepa de *D. vulgaris*. Foram utilizados 500  $\mu\text{L}$  de cultura, com e sem tratamento térmico, e quatro concentrações de PMA (10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Foi utilizada homogeneização constante das amostras durante a fotoativação de 15 minutos com distância de 15 cm da lâmpada halógena. Concentração da cultura determinada por MPN:  $9,2 \times 10^5$  ou 5,96 Log. Após a incubação e fotoativação, as amostras (Tabela 4) foram centrifugadas e seus pellets congelados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de ácidos nucleicos e realização da qPCR.

Tabela 4: Identificação das amostras DV-03

DV-03-500	DV-03-500-10	DV-03-500-25	DV-03-500-50	DV-03-500-100
DV-03-T-500	DV-03-500-T-10	DV-03-500-T-25	DV-03-500-T-50	DV-03-500-T-100

Total de amostras (duplicatas): 20. Identificação: DV-03; sufixos: 500: volume ( $\mu\text{L}$ ); T: com tratamento térmico; 10, 25, 50 e 100: concentrações de PMA ( $\mu\text{M}$ ).

Após verificados os resultados foi feito novo experimento para verificar se existe linearidade com o uso do PMA e seu funcionamento com culturas de 500  $\mu\text{L}$  e suas diluições.

#### 5.4.4 Verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com culturas de 500 µL diluídas a 50 e 25% (Amostras DV-04)

Foi realizado um experimento que objetivou verificar se a proporção de células vivas/mortas inativadas pelo PMA, é a mesma, independente da quantidade de bactérias. Foram utilizados 500 µL da amostra DV-04 com e sem tratamento térmico, sem diluição, 50% diluída (250 µL da cultura + 250 µL de meio) e 75% diluída (125 µL da cultura + 375 µL de meio). Concentração da cultura sem diluição determinada por MPN:  $9,2 \times 10^4$  ou 4,96 Log. Os testes foram realizados em triplicatas, com 50 e 100 µM de PMA. Após a incubação e fotoativação, as amostras (Tabela 5) foram centrifugadas e seus pellets congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de ácidos nucleicos e realização da qPCR.

Tabela 5: Identificação das amostras DV-04

DV-04-500	DV-04-500-50	DV-04-250-50	DV-04-125-50
	DV-04-500-100	DV-04-250-100	DV-04-125-100
DV-04-500-T	DV-04-500-T-50	DV-04-250-T-50	DV-04-125-T-50
	DV-04-500-T-100	DV-04-250-T-100	DV-04-125-T-100

Total de amostras (triplicatas): 42. Identificação: DV-04; sufixos: 500, 250 e 125: volume (µL) da cultura; T: com tratamento térmico; 50 e 100: concentrações de PMA (µM).

Dispondo dos resultados obtidos com uma cultura de 4,96 Log, repetiu-se o experimento com uma cultura com maior carga microbiana (7,96 Log).

#### 5.4.5 Verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com uma cultura mais concentradas (Amostras DV-05)

Com o objetivo de reproduzir os resultados obtidos com a amostra DV-04 com uma cultura mais concentrada, foi realizado um experimento com a amostra DV-05. Foram utilizados 500 µL da amostra DV-05 com e sem tratamento térmico, sem diluição, 50% diluída (250 µL da cultura + 250 µL de meio) e 75% diluída (125 µL da cultura + 375 µL de meio). Concentração da cultura sem diluição determinada por MPN:  $9,2 \times 10^7$  ou 7,96 Log. Os testes foram realizados em triplicatas, com 25 e 50 µM de PMA. Após a incubação e fotoativação, as amostras (Tabela 6) foram

centrifugadas e seus pellets congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de ácidos nucléicos e realização da qPCR.

Tabela 6: Identificação das amostras DV-05

DV-05-500	DV-05-250	DV-05-125
DV-05-500-25	DV-05-250-25	DV-05-125-25
DV-05-500-50	DV-05-250-50	DV-05-125-50
DV-05-500-T	DV-05-250-T	DV-05-125-T
DV-05-500-T-25	DV-05-250-T-25	DV-05-125-T-25
DV-05-500-T-50	DV-05-250-T-50	DV-05-125-T-50

Total de amostras (triplicatas): 54. Identificação: DV-05; sufixos: 500, 250 e 125: volume (uL) da cultura; T: com tratamento térmico; 25 e 50: concentrações de PMA (uM);

## 5.5 TESTE DE BIOCIDA ATRAVÉS DE PMA-qPCR E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Para o teste do biocida TCICA foram utilizadas amostras com 250  $\mu\text{L}$  de cultura + 250  $\mu\text{L}$  de meio e três concentrações (500, 50 e 5 ppm). Concentração da amostra com 250  $\mu\text{L}$  de cultura determinada por MPN:  $4,2 \times 10^7$  ou 7,62 Log. Após avolumar 9 microtubos com 250  $\mu\text{L}$  de cultura foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de meio Postgate C modificado. Foram preparados estoques do biocida ácido tricloroisocianúrico (TCICA – Trichloroisocyanuric acid) em concentrações de 25000, 2500 e 250 ppm (MINERALURGII, 2002; NIE et al., 2008). Foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  de cada uma delas em 500  $\mu\text{L}$  das amostras para obtenção das concentrações finais de 500, 50 e 5 ppm. Após 20 minutos de incubação com o biocida foi aplicado PMA a amostra a concentração final de 50 uM.

Após a incubação e fotoativação, as amostras (Tabela 7) foram centrifugadas e seus pellets congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de ácidos nucléicos e realização da qPCR.

Tabela 7: Identificação das amostras DV-05 com 250  $\mu\text{L}$  tratadas com o biocida TCICA

DV-05-250-C1	DV-05-250-C2	DV-05-250-C3
--------------	--------------	--------------

Total de amostras (triplicatas): 9. Identificação: 250: volume de cultura. C1, C2 e C3: 500, 50 e 5 ppm de TCICA.

Adicionalmente ao uso do biocida TCICA, para realização do MPN foram utilizados como controle uma cultura exposta a 90°C por 15 minutos e outra não aquecida. Os dados das qPCR foram comparados com os obtidos pelo MPN das amostras antes e após o tratamento térmico (DV-01 a DV-05).

## 5.6 EXTRAÇÃO E CONDIÇÕES de qPCR

Logo após a fotoativação (formação de ligações cruzadas fotoinduzidas), as amostras foram centrifugadas a 10.000 X g durante 10 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet congelado a -80°C para posterior extração com o PureLink® Genomic DNA extraction kit (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante com algumas modificações.

Resumidamente, as células peletizadas foram suspendidas em 200 µL de PureLink™ Digestion Buffer e proteínase K a 20 mg/mL e incubadas por 30 minutos a 55°C com leve agitação vertical. Depois disso, foram adicionados 20 µL de RNase A (fornecido pelo kit) e incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 16,000 x g por 2 minutos, sendo transferido para outro microtubo onde foram adicionados 200 µL de PureLink™ genomic Lysis/Binding Buffer e 200 µL de etanol 96-100%. Procedimento adicional foi conduzido de acordo com o protocolo do fabricante para lavagem do lisado com as soluções PureLink® Genomic Wash Buffer 1 e 2. Finalmente, o DNA foi eluído com 65 µL de Elution Buffer a 72°C.

Os ensaios de qPCR foram realizados em um ciclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foi utilizado o método de qPCR com *Black Hole Quencher Dual-Labeled Probes* para detecção e quantificação de DNA microbiano. A figura 2 ilustra resumidamente os procedimentos realizados após a obtenção das amostras tratadas com PMA.

Figura 2: Procedimento adotado após obtenção das amostras tratadas com PMA.



A sonda (Macrogen) e os primers (Integrated DNA Technologies)(Tabela 8) foram desenhados tendo como alvo o gene para rRNA 16S de eubactérias e que após a análise das sequências pelo software Bioedit, mostrou-se exequível a utilização em monoculturas de *D. vulgaris*, bem como outras cepas do gênero *Desulfovibrio*. Após consultar o banco de dados rrnDB – *The Ribosomal RNA Database*, foi constatado que a espécie utilizada nesse estudo possui 5 cópias do referido gene alvo (STODDARD et al., 2015).

Tabela 8: Primers e sondas utilizados na pesquisa

Primers <sup>1</sup> /Sonda <sup>2</sup>	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto	Fonte
DSFV-16S-F	CTGAGGTGCGAAAGCGTG	111 pares de base	Esse estudo
DSFV-16S-R	GTTARCTACGGCACCGA		
Uni-16S-AS-P	CRAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCRC		Esse estudo

1) F – Primer Forward, R – Primer reverso.

2) A sonda está marcada com o fluóforo 6-FAM na posição 5' e o corante BHQ1 na posição 3'.

A fim de estabelecer as condições ótimas de multiplicação, diferentes concentrações de primers e sondas foram testados, realizando as reações em 25 µL de volume com o kit Platinum® Taq DNA Polymerase (TermoFisher Scientific), contendo 12,65 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase, 2,5 µL do PCR-Buffer [10x], 2,0 µL de DNTPs Mix [4 x 2,5 mM], 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> [50 mM], 0,75 µL de cada primer [10 uM],

0,5  $\mu\text{L}$  da sonda [10  $\mu\text{M}$ ], 0,1  $\mu\text{L}$  de Platinum Taq Polimerase [5U/ $\mu\text{L}$ ] e 5  $\mu\text{L}$  de DNA *template*.

As variáveis de otimização consistiram de redução do DNA *template* de 5 para 2,5  $\mu\text{L}$ , aumento de  $\text{MgCl}_2$  [50 mM] de 0,75 para 1,25  $\mu\text{L}$ , adição de 1 mg/mL de soro albumina bovina (BSA – Bovine Serum Albumin, uma proteína que reduz o efeito de inibidores de PCR), adição de 0,5  $\mu\text{L}$  de ROX [50x] (um fluoróforo de referência que normaliza o sinal fluorescente repórter na qPCR) e aumento de Platinum Taq Polimerase [5U/ $\mu\text{L}$ ] de 0,1  $\mu\text{L}$  para 0,15 e 0,2  $\mu\text{L}$  (sempre subtraindo o valor adicionado no volume de água).

A reação qPCR foi conduzida usando um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguida por 45 ou 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento e extensão a 58°C por 35 s. Para verificar a presença de inibidores de PCR, amostras extraídas foram diluídas em série de 10 até 10<sup>-2</sup>.

A análise dos dados e o *Cycle Threshold* (Ct) foram calculados utilizando o software do ciclador (Sequence Detection Software 1.4). Equações das curvas padrão e coeficientes de determinação foram obtidos com o Software Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Análises estatísticas das médias, desvios padrão, coeficientes de correlação de Pearson e teste-t foram conduzidas com os Softwares Microsoft Excel 2016 e IBM SPSS Statistics 21.

Curvas padrão foram desenvolvidas para qPCR utilizando a titulação de amostras controle. Foram feitas diluições em série de 10 em água estéril de grau de PCR para preparar o DNA padrão. Esse valor é inferido teoricamente, partindo de que o pellet utilizado para extração de ácidos nucleicos foi obtido a partir da centrifugação de 500  $\mu\text{L}$  de amostra. Os ácidos nucleicos presentes nesse volume, foram eluídos em um volume de 60  $\mu\text{L}$  (5 microlitros do tampão de eluição ficam na coluna de sílica). Dessa amostra extraída foram utilizados 2,5  $\mu\text{L}$  em cada reação de qPCR. Para que uma qPCR seja positiva, deve existir no mínimo 1 molécula de DNA no volume que entra no tubo de reação. Para que uma qPCR permita a quantificação de uma amostra, devem existir no mínimo 10 cópias no tubo de reação. Porém, é estatisticamente improvável que nas alíquotas tenham sempre 10 ou mais moléculas, algumas podem ter 7, 4 ou mesmo nenhuma molécula de ácido nucleico. Dessa forma, em termos práticos, para que seja possível quantificar uma amostra por qPCR, a quantidade de ácido nucleico presente na reação deve ser de 100 ou mais cópias,



sendo estatisticamente possível alíquotar o valor mínimo de 10 cópias para quantificação. Observando na curva de titulação, a partir de qual diluição a quantificação não apresenta mais aumento de 1 LOG (Cerca de 3,5 *Cycles Threshold*), definiu-se esse como o ponto do limite de quantificação. Por exemplo, se a diluição de  $10^{-5}$  possui 100 moléculas de DNA, o número de moléculas na alíquota de 2,5  $\mu\text{L}$  não diluída é  $10^7$  moléculas. Contudo, o volume de DNA eluído na extração foi de 60  $\mu\text{L}$ , sendo necessário dividir o valor do eluato pelo volume da amostra usada na qPCR ( $60/2,5$ ) obtendo-se o fator 24. Ou seja, em 500  $\mu\text{L}$  da amostra existem em média  $24 \times 10^7$  moléculas de DNA alvo, em 1 mL  $4,8 \times 10^8$  moléculas de DNA alvo e  $4,8 \times 10^5$  moléculas em 1  $\mu\text{L}$  de amostra.

O cálculo de quantificação do número de moléculas de DNA alvo é feito através da fórmula  $10^{ax+b}$ , em que “a” é o coeficiente angular, “x” é o número de Ct e “b” o coeficiente linear. Os valores de a e b são obtidos no SPSS a partir da regressão linear dos Ct fornecidos pela 7500 Real Time PCR System e os valores teóricos de quantificação. Após a quantificação, os valores foram divididos pelo número de cópias do gene alvo em cada bactéria (5 cópias). O valor em Log mais próximo do limite de 100 (2 Log) cópias por reação que pode ser obtido pelo Kit de extração utilizado é de 480 cópias (2,68 Log). As curvas padrão foram construídas pela plotagem do valor de Ct vs Log de células e usadas para quantificar o número de células baseado nos respectivos Ct das amostras. Quando analisando as amostras, cada corrida de qPCR foi conduzida com a curva padrão. Dessa forma, os seguintes dados foram estimados:

A – Log do número total de células: qPCR sem PMA;

B – Log do número de células vivas: PMA-qPCR;

C – Log do número de células mortas (Redução de multiplicação): qPCR - (PMA-qPCR)

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das médias, desvios padrão e coeficientes de correlação de Pearson ( $\rho$  de Pearson) foram calculados usando o Microsoft Excel 2016

(Microsoft, Redmond, WA, USA). Foi considerada correlação positiva quando  $\rho = 1$  e negativa quando  $\rho = -1$ .

As equações das curvas padrão e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram obtidos no Microsoft Excel 2016 pela regressão (gráfico de dispersão) dos valores de células em Log e do Ct do Sequence Detection Software 1.4. As médias das amostras não tratadas com PMA e tratadas com PMA foram comparadas pelo teste t de Student usando o IBM SPSS 21 (IBM, Armonk, New York, USA). Resultados foram considerados significantes quando o valor  $p \leq 0,05$ . A técnica do número mais provável foi analisada de acordo como descrito na literatura (JARVIS; WILRICH; WILRICH, 2010).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 OTIMIZAÇÕES DA qPCR

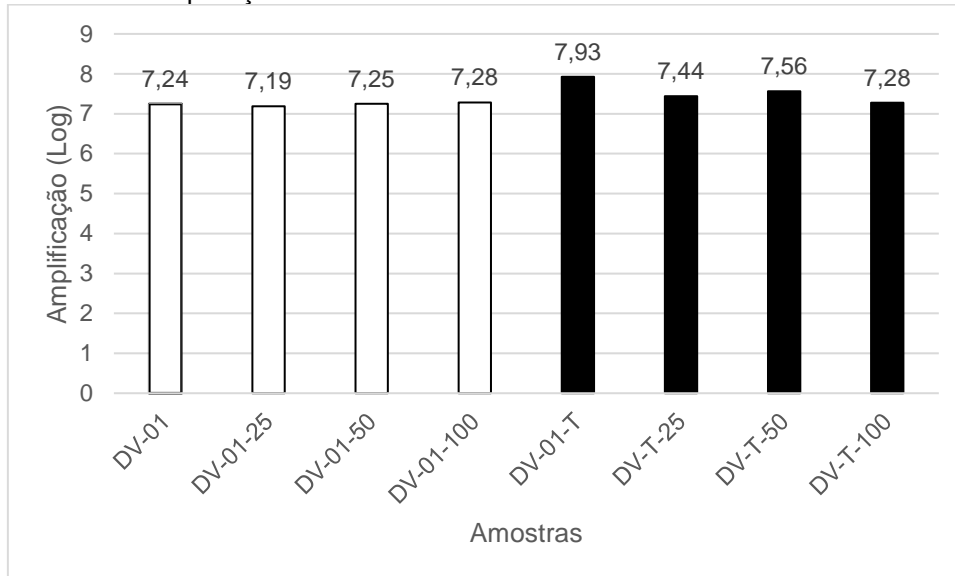
Um ensaio de qPCR utilizando uma cultura de *D. vulgaris*, diluída até  $10^{-11}$  apresentou multiplicação apenas nas diluições. Foi levantada a hipótese de que exista um inibidor de PCR nas amostras. Repetindo-se o experimento, porém com a metade de material extraído e aumentando 5 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, foi possível obter melhor multiplicação da amostra não diluída. A adição posterior de 1  $\mu\text{L}$  de BSA [1mg/mL], 0,5  $\mu\text{L}$  de ROX [50x] e aumento da Platinum Taq Polimerase [5U/ $\mu\text{L}$ ] de 0,1 para 0,2  $\mu\text{L}$  permitiu a obtenção de correta multiplicação dos extratos de diferentes amostras de *D. vulgaris* comparado a suas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

### 6.2 OTIMIZAÇÃO DO USO DO PMA

#### 6.2.1 Resultados da determinação da concentração ótima de PMA (Amostras DV-01)

Foram realizados uma série de testes a fim de otimizar a concentração e condições de incubação e fotoativação do PMA. O experimento que utilizou tempo de incubação com PMA de 10 minutos, fotoativação de 10 minutos com a fonte de luz a 20 cm e homogeneização após 5 minutos apresentou estatisticamente o mesmo resultado de multiplicação de ácidos nucleicos ( $p = 0,066$ ), não havendo diferença significativa entre as amostras tratadas e não tratadas com PMA (Gráfico 1). As amostras tratadas termicamente apresentaram em média 0,28 Log a mais que as amostras não tratadas (Desvio padrão de 0,31).

Gráfico 1: Multiplicação das amostras DV-01 com 500 uL



T: com tratamento térmico; 25, 50 e 100: concentrações de PMA (uM).

Após a incubação com PMA, foi possível constatar a mudança de coloração dos pellets microbianos das culturas termicamente tratadas, de incolor, para rosa/vermelho (Figura 3). Isso evidenciou que houve penetração do PMA nas células que foram mortas pelo calor. Diante disso, foi levantada a hipótese de que a fotoativação não teria funcionado. Já a maior multiplicação nas amostras termicamente tratadas e com PMA, pode ser explicada pelo fato do tratamento térmico ter sido feito diretamente no tubo de ensaio, antes de aliquotar essas amostras. Dessa forma, é possível que já nessa etapa tenha ocorrido lise, havendo maior concentração de material genômico em comparação com as amostras não tratadas termicamente. Nos experimentos seguintes as amostras foram aliquotadas antes do tratamento térmico.

Figura 3: Pellets microbianos após a incubação com PMA 50 uM

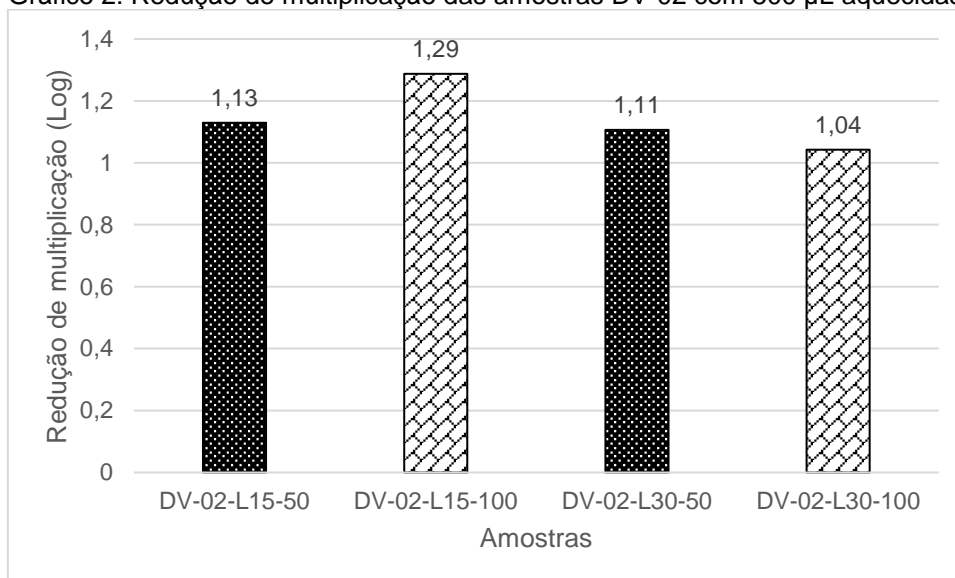


Amostras com tratamento térmico (esquerda) e sem tratamento térmico (direita). A coloração rosa/vermelho indica que o PMA penetrou nas células mortas.

### 6.2.2 Resultados da otimização da fotoativação (Amostra DV-02)

Diante desse resultado, o experimento foi repetido apenas com culturas mortas pelo calor, com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de PMA, reduzindo a distância da fonte de luz para 15 cm e aumentando a fotoativação para 15 e 30 minutos com homogeneização contínua em um agitador. Esse experimento teve como objetivo verificar o funcionamento do PMA e da fotoativação. A amostra sem PMA teve um Log de 6,78. As amostras tratadas com PMA apresentaram multiplicação tardia dos amplicons (Gráfico 2), mas não houve mudança significativa entre a fotoativação de 15 e 30 minutos ( $p = 0,262$ ). Aumentando a concentração de 50 para 100  $\mu\text{M}$  foi obtida um aumento de redução de apenas 0,16 Log para fotoativação de 15 minutos e redução de 0,06 Log para fotoativação de 30 minutos. Alterando a fotoativação para 30 minutos, houve piora da redução de multiplicação de 0,02 Log para as amostras com 50  $\mu\text{M}$  e piora de 0,24 Log para 100  $\mu\text{M}$ .

Gráfico 2: Redução de multiplicação das amostras DV-02 com 500  $\mu\text{L}$  aquecidas e tratadas com PMA



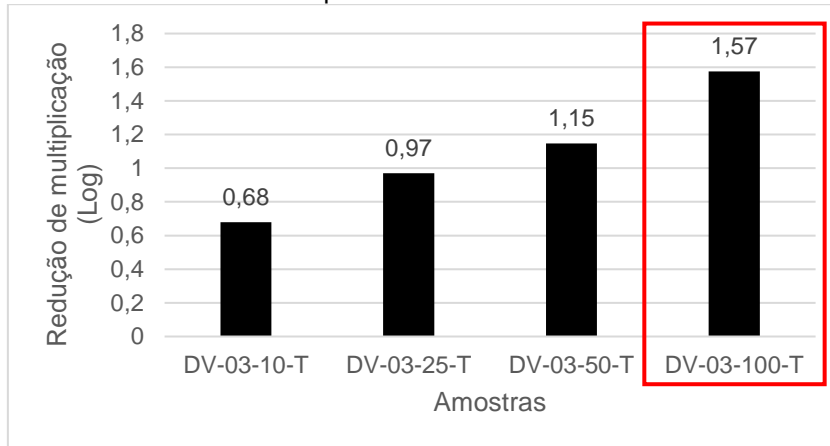
L15 e L30: 15 e 30 minutos de fotoativação; 50 e 100: concentrações de PMA ( $\mu\text{M}$ ).

### 6.2.3 Resultados da determinação da concentração ideal de PMA após a otimização da fotoativação (Amostras DV-03)

Após otimizada a fotoativação (15 minutos com 15 cm de distância da fonte de luz), foi realizado um experimento de determinação da concentração ótima de PMA. Tomando como referência a amostra não tratada termicamente e sem PMA (4,33 Log)

houve uma redução máxima de 1,57 Log na amostra tratada termicamente e com 100  $\mu\text{M}$  de PMA (Gráfico 3).

Gráfico 3: DNA inativado após o tratamento com PMA com culturas de 500  $\mu\text{L}$

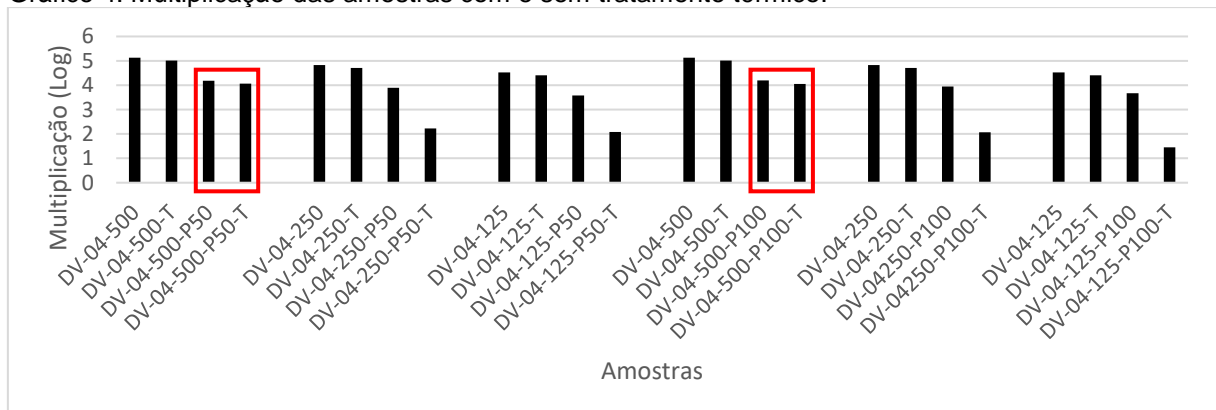


10, 25, 50 e 100 indicam as concentrações de PMA ( $\mu\text{M}$ ).

#### 6.2.4 Resultados da verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com culturas de 500 $\mu\text{L}$ diluídas a 50 e 25% (Amostras DV-04)

No experimento utilizando 500, 250 e 125  $\mu\text{L}$  das amostras foi observada multiplicação máxima de 5,12 e 5,00 Log para a amostra contendo 500  $\mu\text{L}$  sem e com tratamento térmico respectivamente (DV-500 e DV-500-T). As amostras contendo 250 e 125  $\mu\text{L}$  de cultura tratadas termicamente tiveram melhor redução de multiplicação provocada pelo PMA (Gráfico 4).

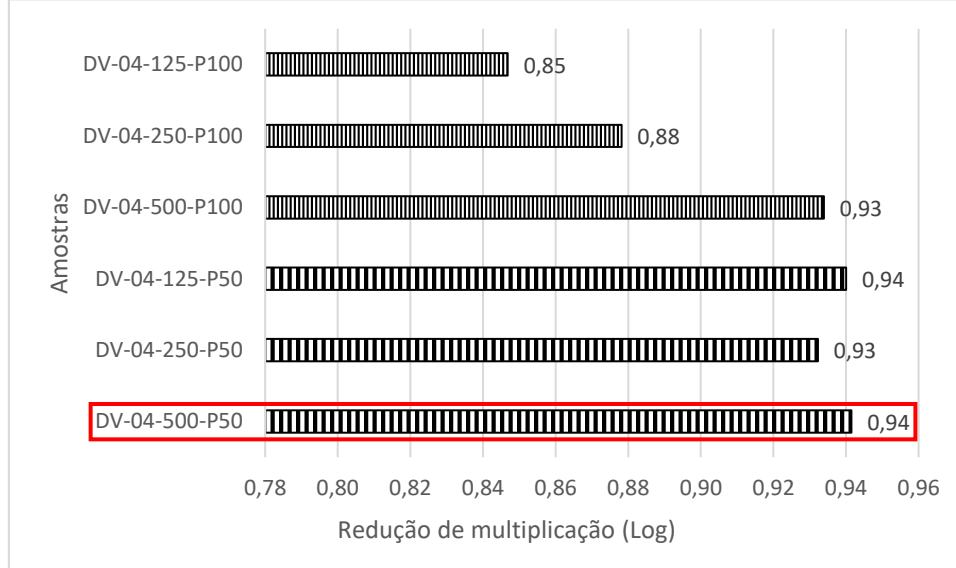
Gráfico 4: Multiplicação das amostras com e sem tratamento térmico.



500, 250 e 125 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500  $\mu\text{L}$ ; P50 e 100 determinam 50 e 100  $\mu\text{M}$  de PMA; T indica tratamento térmico.

Nas amostras tratadas com 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de PMA, não foi observada variação significativa na inativação do DNA de células vivas ( $p = 0,101$ ). Porém nas amostras tratadas com 100  $\mu\text{M}$  foi observada variação na redução de DNA de células vivas proporcional a concentração microbiana (Gráfico 5).

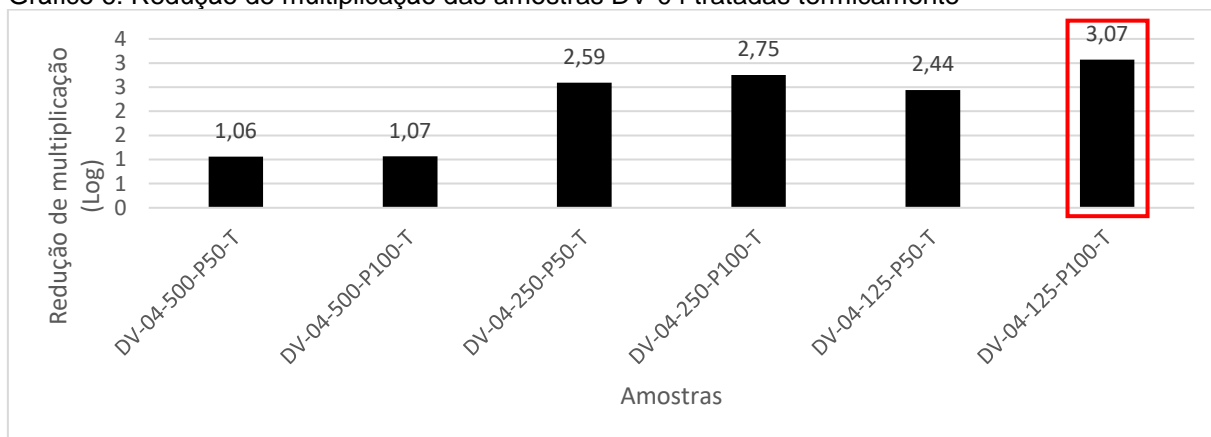
Gráfico 5: Inativação do DNA de células vivas pelo PMA em diferentes concentrações (Log)



125 e 250 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500  $\mu\text{L}$ ; P100 e P50 indicam a concentração de PMA ( $\mu\text{M}$ ).

Tomando como referência as alíquotas sem tratamento térmico, nas amostras tratadas termicamente foi observada redução de 1,06 e 1,07 Log com 500  $\mu\text{L}$  de cultura – 50 e 100  $\mu\text{M}$  respectivamente. Nas amostras contendo 250  $\mu\text{L}$  de cultura foi observada redução de 2,59 e 2,75 Log para 50 e 100  $\mu\text{M}$  de PMA (diferença de 0,16 Log) e nas amostras contendo 125  $\mu\text{L}$  reduções de 2,44 Log com 50  $\mu\text{M}$  de PMA e 3,07 Log com as tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de PMA (diferença de 0,63 Log)(Gráfico 6). Estatisticamente não houve diferença entre a quantidade de DNA inativado de células mortas nas amostras tratadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de PMA ( $p = 0,752$ ).

Gráfico 6: Redução de multiplicação das amostras DV-04 tratadas termicamente



500, 250 e 125 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500  $\mu$ L; P100 e P50 indicam a concentração de PMA ( $\mu$ M); T indica tratamento térmico.

Após fazer otimizações no Mastermix de PCR, foi repetida uma corrida de qPCR com as amostras DV-04 (já haviam sido congeladas, ocorrendo perda de parte do DNA).

As amostras tratadas termicamente contendo 125 e 250  $\mu$ L com PMA 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M tornaram-se detectáveis, mas não quantificáveis ( $L_q = 2,68$  Log de cópias ou 1,98 Log de bactérias) (Tabela 9). As amostras de 500  $\mu$ L tratadas termicamente não apresentaram redução de multiplicação (Gráfico 7).

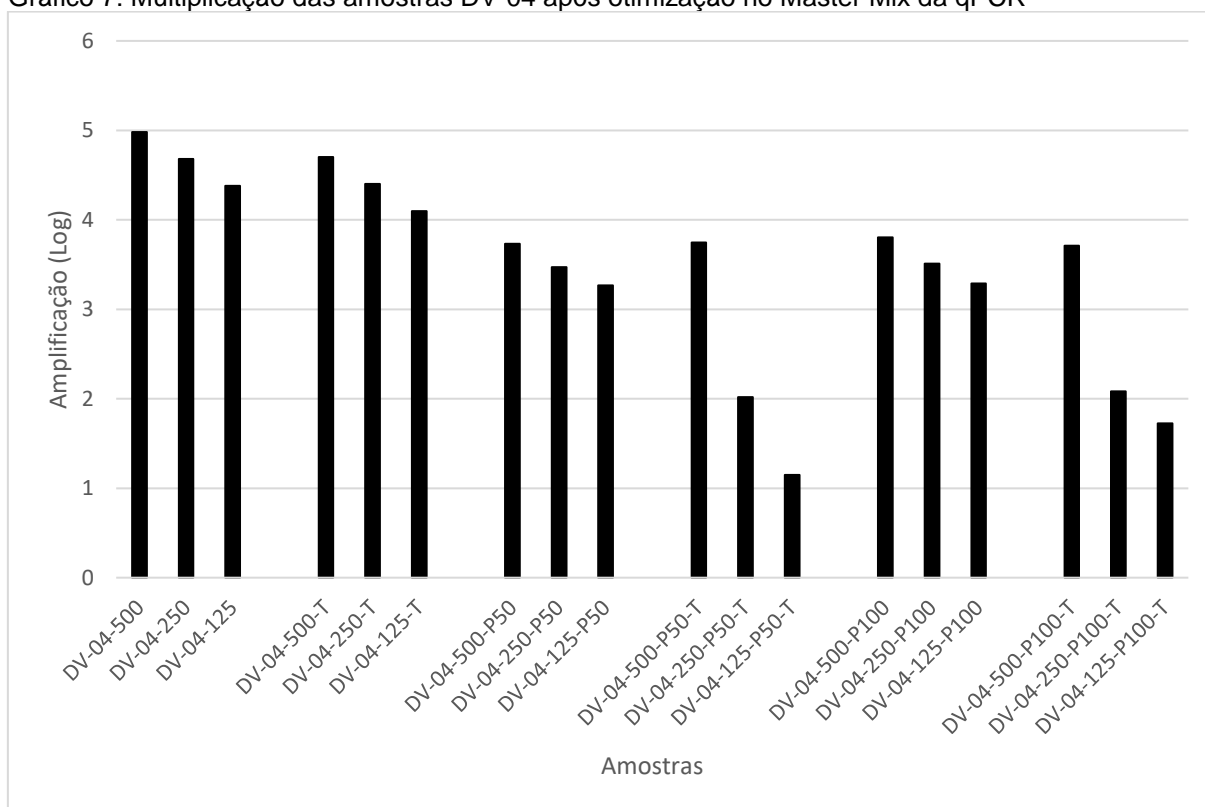
Tabela 9: Quantificação após tratamento com PMA das amostras DV-04 após otimização do Master Mix

Amostra	PMA-qPCR (Log)	Redução de multiplicação (Log)
DV04-125-P100-T	1,72	2,66
DV04-125-P50-T	1,15	3,23
DV04-250-P100-T	2,08	2,60
DV04-250-P50-T	2,02	2,66

250 e 125 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500  $\mu$ L; P100 e P50 indicam a concentração de PMA ( $\mu$ M); T indica tratamento térmico.



Gráfico 7: Multiplicação das amostras DV-04 após otimização no Master Mix da qPCR



500, 250 e 125 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500  $\mu$ L; P100 e P50 indicam a concentração de PMA ( $\mu$ M); T indica tratamento térmico.

Na amostra DV-04-500 foi possível observar redução de exatamente 1 Log na diluição de  $10^{-1}$  e de 2 Log na diluição de  $10^{-2}$ , evidenciando que a qPCR está funcionando normalmente após as modificações no Mix, não havendo mais o efeito de um inibidor de PCR.

#### 6.2.5 Resultados da verificação da linearidade do uso do PMA e seu funcionamento com uma cultura mais concentradas (Amostras DV-05)

Repetindo o experimento com as amostras DV-05 foi observada uma redução média de 1 Log nas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  das amostras com 125 e 250  $\mu$ L de cultura, com desvio padrão de 0,073, evidenciando o correto funcionamento da qPCR e a supressão do efeito de possíveis inibidores presentes no meio de cultura. Dados das curvas de calibração da PCR podem ser vistos na Tabela 10.

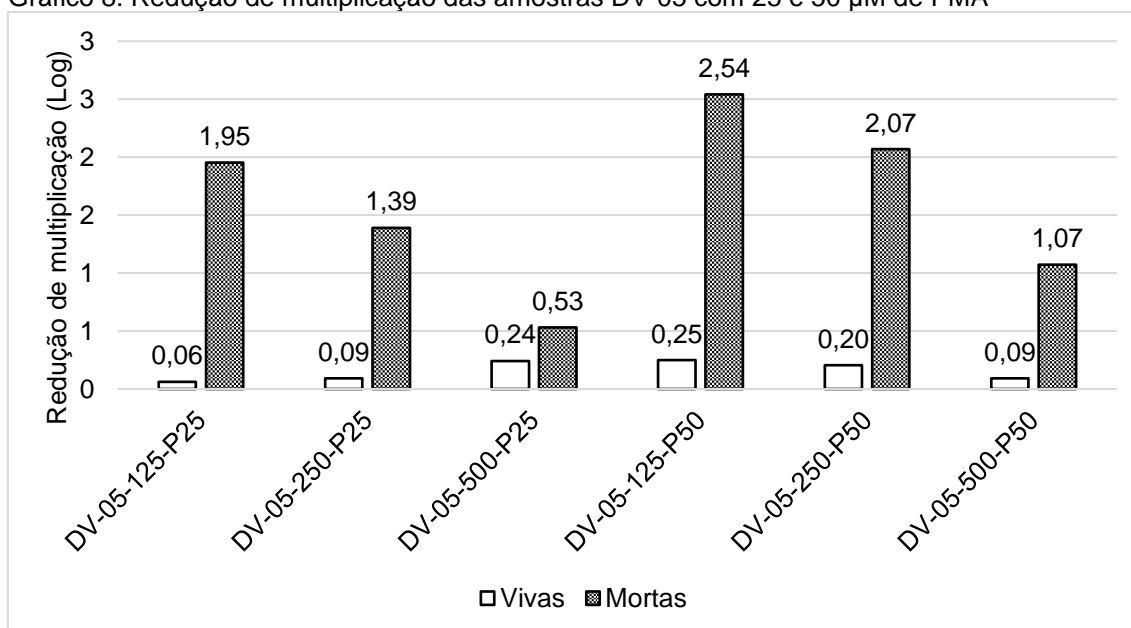
Tabela 10: Linearidade das curvas de calibração da qPCR após todas otimizações.

R <sup>2</sup>	E	p
0,999	0,96	0,000
0,998	1,00	0,000
1,000	0,97	0,000

R<sup>2</sup> é o coeficiente de regressão. A eficiência da PCR (E) foi obtida a partir da equação  $E=10(-1/s)-1$ , onde s é o *slope* obtido da linha de regressão entre o Ct e o valor em Log de células da curva de titulação plotada no Excel (KNUTSSON et al., 2002).

O tratamento com PMA apresentou menor inativação do DNA de células vivas com a concentração de 25 µM e maior inativação do DNA de células mortas com a concentração de 50 µM e 125 µL de amostra. Não houve diferença estatística entre o DNA de células vivas inativadas com 25 e 50 µM ( $p = 0,531$ ). Tomando como referência as amostras não tratadas termicamente e sem PMA, o melhor resultado de redução de multiplicação foi de 2,54 Log (DV-05-125-T-P50) (Gráfico 8).

Gráfico 8: Redução de multiplicação das amostras DV-05 com 25 e 50 µM de PMA



500, 250 e 125 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500 µL; P100 e P50 indicam a concentração de PMA (µM).

Os coeficientes de correlação  $\rho$  de Pearson (Tabela 11) indicam forte correlação negativa entre as concentrações de PMA e de bactérias mortas na amostra, ou seja, quanto menor a concentração de bactérias maior será a quantidade de DNA inativado pelo PMA. Da mesma forma, a concentração de bactérias mortas e o volume de PMA apresentaram correlação perfeita positiva, ou seja, quanto maior a

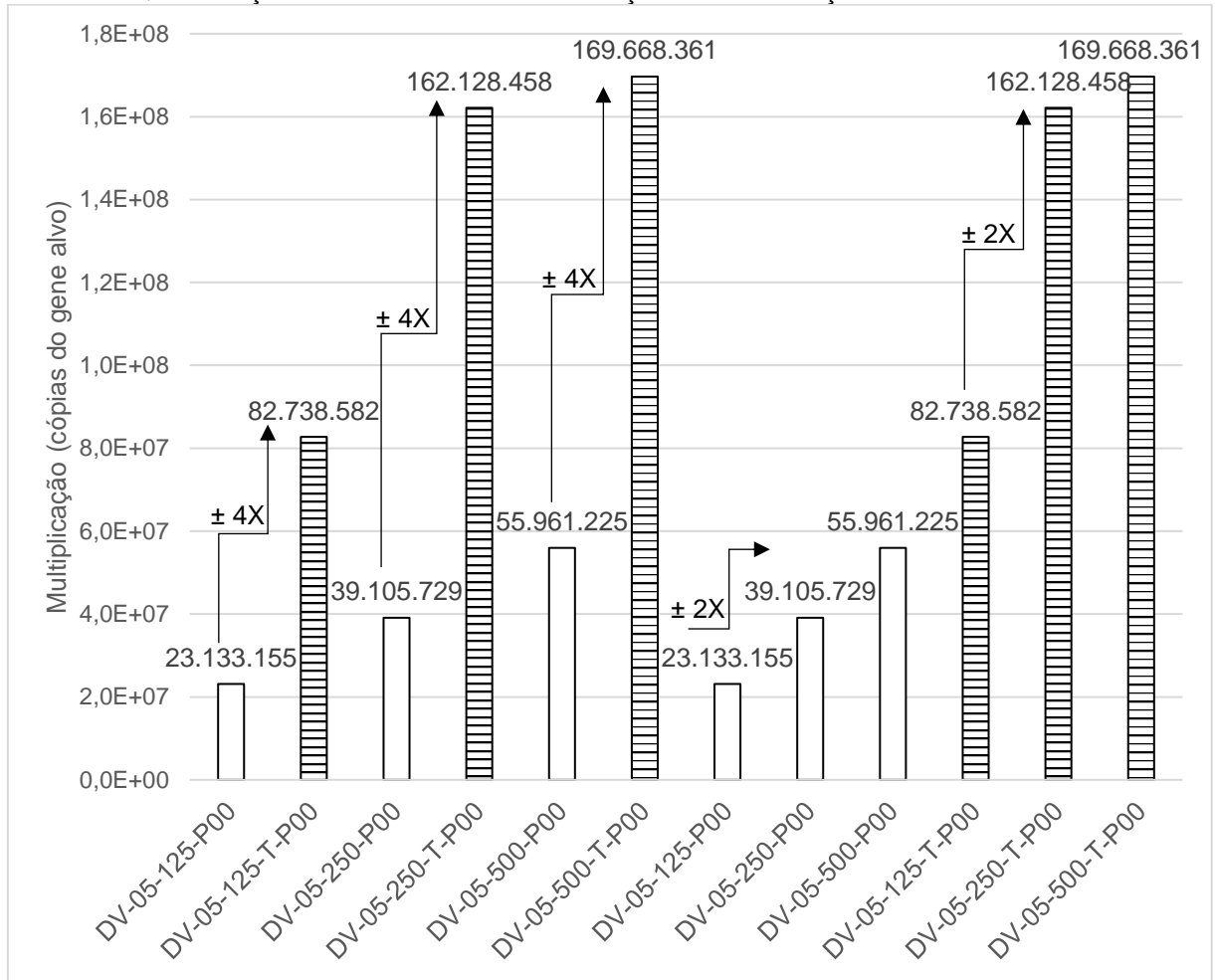
concentração e bactérias, maior será a quantidade de PMA necessária para a inativação do DNA. Analisando os coeficientes de correlação  $\rho$  de Pearson das amostras com bactérias vivas podemos observar correlação perfeita positiva entre a concentração de PMA 25  $\mu\text{M}$  e a concentração microbiana, ou seja, a quantidade de DNA inativado aumenta com a quantidade de bactérias. Porém, com a concentração de 50  $\mu\text{M}$ , observamos o oposto, quanto maior a quantidade de bactérias, menor a quantidade de DNA inativado. Com as amostras de 125 e 250  $\mu\text{L}$  existe correlação perfeita positiva com a concentração de PMA, quanto maior o volume e a concentração de PMA, maior a quantidade de DNA inativado. Porém, com a amostra de 500  $\mu\text{L}$  essa correlação é negativa perfeita, ou seja, quanto maior a concentração de PMA, menos DNA é inativado.

Tabela 11: Coeficientes de correlação  $\rho$  de Pearson

	<b>Variável Independente</b>	<b>Variável Dependente</b>	<b>Coefficiente <math>\rho</math> de Pearson</b>
<b>Mortas</b>	PMA 25 $\mu\text{M}$	Concentração microbiana	-0,99
	PMA 50 $\mu\text{M}$	Concentração microbiana	-0,99
	125 $\mu\text{L}$	Concentração de PMA	1
	250 $\mu\text{L}$	Concentração de PMA	1
	500 $\mu\text{L}$	Concentração de PMA	1
<b>Vivas</b>	PMA 25 $\mu\text{M}$	Concentração microbiana	1
	PMA 50 $\mu\text{M}$	Concentração microbiana	-1
	125 $\mu\text{L}$	Concentração de PMA	1
	250 $\mu\text{L}$	Concentração de PMA	1
	500 $\mu\text{L}$	Concentração de PMA	-1

Observando os valores absolutos do número de amplicons das amostras sem PMA (Gráfico 9) podemos verificar que as amostras de 125 e 250  $\mu\text{L}$  sem tratamento térmico e sem PMA são cerca de quatro vezes menores que as com tratamento térmico. O mesmo não ocorre com a amostra DV-05-500-P00, que deveria ter o dobro da amostra DV-05-250-P00 (aproximadamente 80,000), mas tem apenas 56,000. Da mesma forma, a amostra DV-05-500-T-P00 deveria ter o dobro da amostra DV-05-250-T-P00 (aproximadamente 320,000), mas possui apenas 170,000.

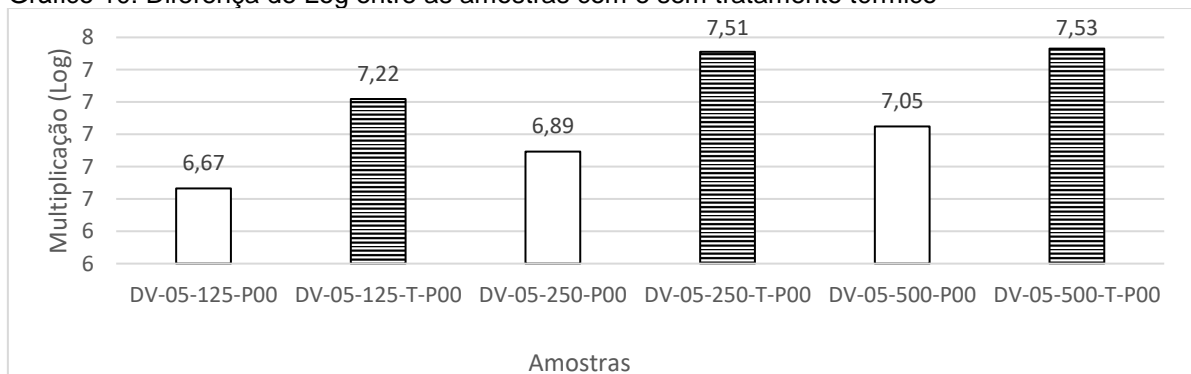
Gráfico 9: Quantificação em valores absolutos e relação entre as diluições das amostras sem PMA



125, 250 e 500 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500  $\mu$ L; T indica tratamento térmico; P00 indica ausência de PMA.

Analisando os mesmos valores em Log (Gráfico 10), é observada um aumento de em média 0,55 Log nas amostras tratadas termicamente.

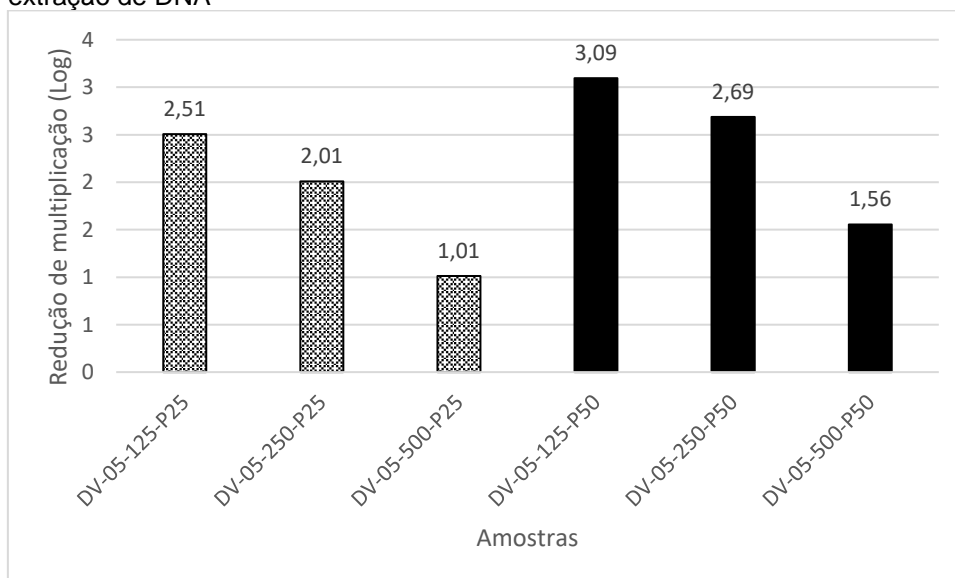
Gráfico 10: Diferença de Log entre as amostras com e sem tratamento térmico



Dessa forma, pode-se afirmar que quando utilizada uma cultura  $10^3$  mais concentrada o Kit de extração não foi capaz de extrair DNA da mesma forma nas

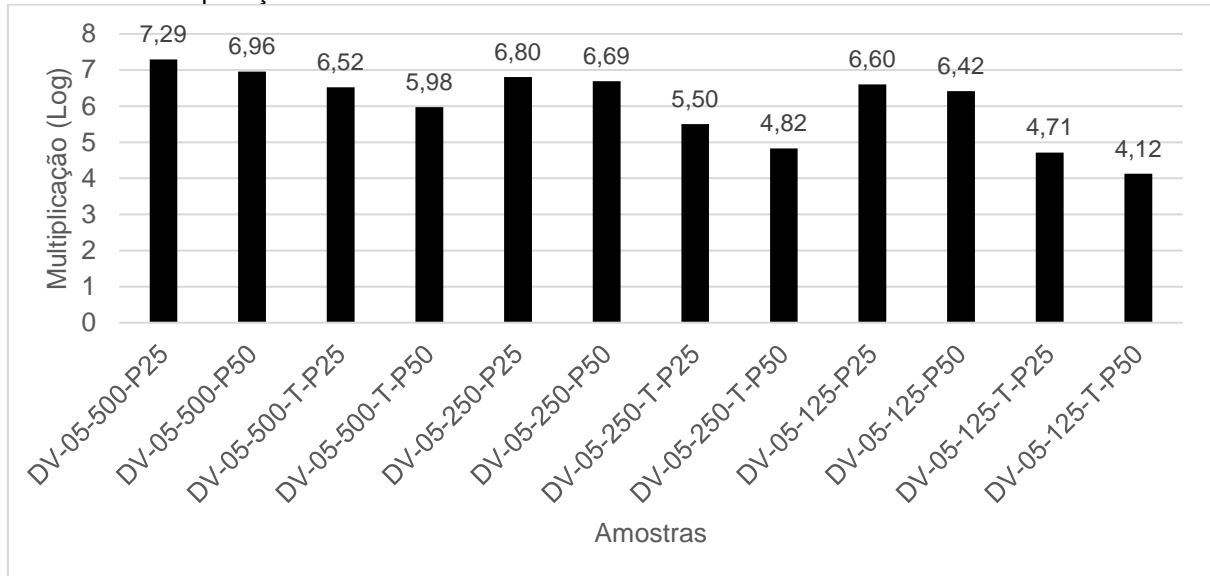
amostras com e sem tratamento térmico. Sendo assim, o resultado de redução multiplicação de ácidos nucleicos (Gráfico 8) apresenta um resultado pior do que deveria ser (melhor resultado 2,54 Log). Considerando que as amostras sem tratamento térmico devem ter, no mínimo, a mesma concentração de DNA das com tratamento térmico, foi realizada a avaliação de redução de multiplicação tomando como referência as amostras tratadas termicamente. Considerando essa situação hipotética, pode-se afirmar que caso a extração funcionasse corretamente, o melhor resultado de redução de multiplicação seria de 3,09 Log com 125  $\mu$ L de cultura (Gráfico 11).

Gráfico 11: Redução de multiplicação das amostras DV-05 considerando o valor mínimo esperado da extração de DNA



Comparando as médias do Log das culturas tratadas termicamente (Gráfico 12) e das não tratadas com o Teste-T de Student com amostras independentes obtemos valor  $p = 0,467$  para as amostras de bactérias vivas e  $p = 0,003$  para as amostras de bactérias mortas.

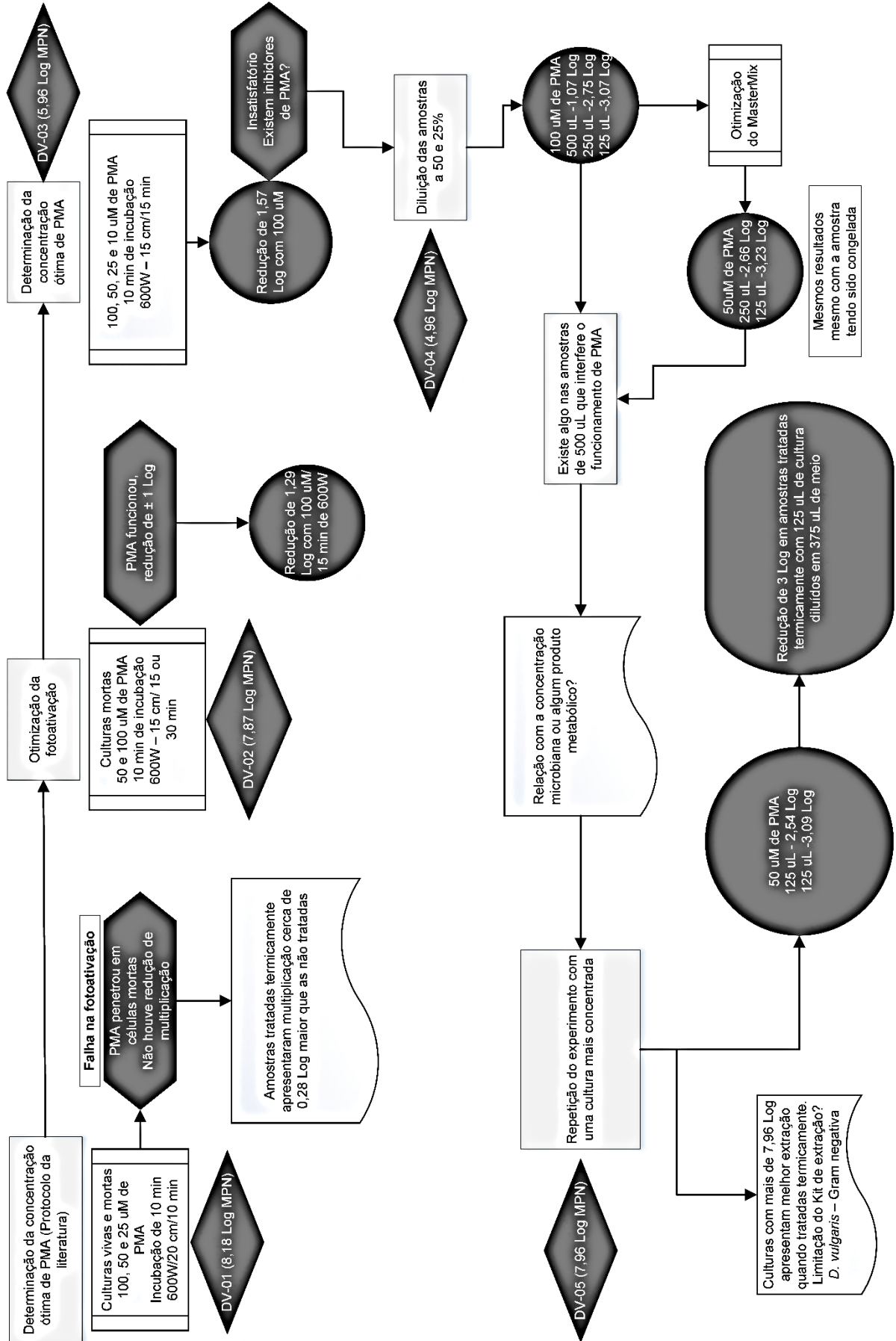
Gráfico 12: Multiplicação das amostras tratadas com PMA



500, 250 e 125 indicam o volume de cultura presente na amostra de 500 uL; T indica tratamento térmico; P25 e P50 indicam as concentrações de PMA ( $\mu\text{M}$ ).

A figura na página a seguir ilustra resumidamente a otimização do PMA (Figura 4).

Figura 4: Esquema da otimização do PMA



### 6.3 TESTE DE BIOCIDA ATRAVÉS DE PMA-qPCR E COMPARAÇÃO COM MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Os dados de todos experimentos de número mais provável (Tabela 12) foram comparados com o teste t de Student. Analisando os resultados obtidos por MPN e qPCR das amostras sem tratamento térmico (bactérias vivas) obtemos o valor de  $p = 0,133$ , ou seja, não existe diferença estatística entre os resultados obtidos pelos dois métodos de quantificação.

Tabela 12: Resultados do número mais provável (MPN) e qPCR/PMA-qPCR

Amostra	MPN	Log10 MPN	Log10 qPCR
DV-01-500	1,50E+08	8,18	7,24
DV-02-500	7,40E+07	7,87	6,78
DV-03-500	9,20E+05	5,96	4,33
DV-04-500	9,20E+04	4,96	5,12
DV-05-500	9,20E+07	7,96	7,05
DV-05-250	4,20E+07	7,62	6,89
DV-01-500-T	0	0,00	7,28
DV-02-500-T	0	0,00	5,50
DV-03-500-T	0	0,00	2,76
DV-04-125-T	0	0,00	1,15
DV-05-125-T	0	0,00	4,12
DV-05-250-C1	9,20E+06	6,96	7,01
DV-05-250-C2	4,20E+07	7,62	6,69
DV-05-250-C3	4,20E+07	7,62	6,69

Porém, ao realizar o mesmo teste com as amostras mortas pelo tratamento térmico não obtivemos resultados de igualdade significativos, com valor  $p = 0,036$  (acima do limite aceitável de 0,05). Estatisticamente os resultados obtidos por MPN e qPCR-PMA das bactérias mortas são distintos. As amostras DV-01-500-T e DV-02-500-T não foram incluídas na análise desse teste t, pois a metodologia ainda não estava otimizada.

Analisando os resultados do MPN das amostras DV-05-250 tratadas com três concentrações do biocida TCICA obteve-se o valor  $p = 0,667$ , não havendo diferença entre as amostras tratadas com o biocida e o controle. Comparando os resultados obtidos com MPN e qPCR após tratamento com TCICA, obteve-se valor  $p = 0,067$ , não havendo diferença dos resultados entre amostra controle e amostras de teste.



Sabendo-se que as amostras tratadas termicamente apresentam maior multiplicação de DNA na qPCR, deve-se utilizar como controle para avaliação do biocida TCICA a amostras DV-05-250-P00 (Gráfico 10). Considerando essa amostra como controle, foi possível detectar uma redução de multiplicação de 0,5 Log através da PMA-qPCR.

## 7. DISCUSSÃO

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são organismos anaeróbios que representam um problema para a indústria do petróleo e de gás. A quantificação desses organismos utilizando técnicas tradicionais de cultura, e.g. técnica do número mais provável, pode envolver longos períodos de incubação (28 dias), bem como os inconvenientes e dificuldades de se trabalhar com organismos anaeróbios e meios de cultura específicos. Muitos trabalhos têm relatado que a metodologia de PMA-qPCR é um bom indicador de viabilidade celular e pode ser aplicada para diferenciar e quantificar bactérias viáveis e aquelas com membranas comprometidas em diferentes tipos de amostras bacterianas.

Essa metodologia tem sido aplicada a várias espécies, como por exemplo, *B. cereus*, *S. oralis*, *S. goordoni*, *V. parvula*, *M. fortuitum*, *F. nucleatum* e *P. intermedia* (ALVAREZ et al., 2013; FORGHANI et al., 2015; LEE; LEE; KIM, 2015; ZHANG et al., 2014) e seu uso é considerado de grande importância em amostras que contenham microrganismos fastidiosos ou de crescimento lento, onde a cultura envolve longos períodos e também onde o cálculo ou estimativa da sobrevivência celular é difícil (KAYIGIRE et al., 2016; KRALIK; NOCKER; PAVLIK, 2010; LEE; LEE; KIM, 2015; VENDRAME et al., 2013, 2014). Distintos métodos de desinfecção foram avaliados por essa metodologia, tais como o uso de cloreto de cetilpiridínio, ozônio, cloro e radiação ultra-violeta (ALVAREZ et al., 2013; LEE; LEE; KIM, 2015).

Nesse trabalho foi padronizada a metodologia para avaliação da viabilidade de culturas planctônicas da bactéria *D. vulgaris* através da qPCR associada ao PMA (PMA-qPCR) e sua comparação com o método tradicional de quantificação, o número mais provável (MPN). Também foi avaliada a susceptibilidade da cepa ao biocida ácido tricloroisocianúrico (TCICA).

De acordo com buscas bibliográficas, essa é a primeira pesquisa utilizando a técnica de PMA-qPCR para quantificar bactérias redutoras de sulfato vivas e mortas. Foi utilizada uma cultura de *Desulfovibrio vulgaris* (DSMZ) em meio Postgate C modificado. Durante a padronização da metodologia de PMA-qPCR foram testadas diferentes concentrações de PMA (10, 25, 50 e 100  $\mu$ M), distância da fonte de luz halógena (20 e 15 cm) e tempos de exposição (15 e 30 minutos). Essas condições são similares com as utilizadas com outras bactérias gram negativas e em

experimentos que utilizaram amostras ambientais (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008; LEE; LEE; KIM, 2015; NOCKER et al., 2007).

Nesse estudo, a condição ótima estabelecida para a bactéria *D. vulgaris* sob sua forma planctônica foi: 50  $\mu$ M de PMA, incubação no escuro por 10 minutos, distância da lâmpada halógena de 15 cm e tempo de exposição a luz de 15 minutos.

Durante os ensaios de padronização observamos que, quando utilizando culturas com concentração microbiana de 8,18 e 7,96 Log (MPN), em média as amostras tratadas pelo calor tinham respectivamente 0,28 e 0,55 Log a mais que as não tratadas. Uma hipótese levantada é que o processo de exposição térmica a 90°C por 15 minutos melhoraria a lise das bactérias durante o processo de extração de DNA, havendo nesse caso uma limitação no protocolo de extração recomendado pelo fabricante. Essa característica não foi observada com as demais culturas (até 6 Log). Foi observada menor redução de multiplicação nas amostras que continham 500  $\mu$ L de cultura, bem como incompatível valor absoluto de bactérias tomando como referências as diluições com 250 e 125  $\mu$ L (Gráfico 9). Uma hipótese para esse baixo valor absoluto, praticamente igual a diluição com 250  $\mu$ L, é que exista alguma substância que interfira na extração de DNA, já que foi mostrado o correto funcionamento da qPCR.

Não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizaram a diluição da amostra a 50 ou 25% antes do tratamento com PMA como forma de aumentar sua eficiência. Alguns trabalhos detectaram redução de multiplicação inferior a 2 Log com culturas de bactérias mortas pelo calor. Nessas publicações, é possível que os resultados de redução de multiplicação possam ser melhorados, já que existe a possibilidade das bactérias utilizadas produzirem substâncias que interfiram no funcionamento do PMA, sendo necessário fazer uma diluição das amostras antes do tratamento com o intercalante.

Como mostrado nas otimizações da técnica, os efeitos de inibidores de PCR presentes nas amostras foram suprimidos. Com os estudos realizados não foi possível concluir de que forma a cultura de bactérias não diluída poderia interferir no funcionamento do PMA. Visualmente os pellets dessas amostras tinham coloração vermelha após o tratamento com PMA, ou seja, o PMA de fato penetrou nas membranas das células mortas. Outro aspecto a ser considerado é que o meio Postgate C modificado foi utilizado para diluição nas amostras com 250 e 125  $\mu$ L de

cultura, que apresentaram resultados superiores aos das amostras com 500 µL de cultura. Por esse motivo, exclui-se a possibilidade de que substâncias presentes no meio possam reagir com o PMA ou interferir na fotoativação. Tal aspecto tinha sido levado em consideração no desenho da metodologia, já se sabendo que o PMA possui afinidade por hidrocarbonetos (ausentes no meio de cultura). São levantadas duas hipóteses: (a) a cepa *D. vulgaris* produziu níveis de exopolissacarídeos ou outros produtos metabólicos altos o suficiente para reagir com moléculas de PMA, reduzindo sua disponibilidade para o DNA genômico; (b) Esses produtos metabólicos não reagem com o PMA, mas podem reduzir a eficiência da fotoativação.

Após otimizar nossa fotoativação, mostramos que não houve diferença significativa entre 15 ou 30 minutos de exposição a luz halógena, o que reduz a plausibilidade de que produtos metabólicos interfiram na fotoativação. De qualquer forma, estudos adicionais com a lavagem das amostras com PBS 1X seriam necessários para a exclusão dessa hipótese. Tal aspecto não invalida o presente trabalho, pois mostramos que utilizando culturas diluídas a 50 ou 25% é possível obter resultados compatíveis com os descritos na literatura (ALVAREZ et al., 2013; CHANG et al., 2010; SLIMANI et al., 2012). Alguns trabalhos utilizaram a lavagem do pellet de amostras com PBS 1X. Porém mesmo com esse procedimento adicional, foi relatada redução de multiplicação inferior a 3 Log (ALVAREZ et al., 2013).

Após a otimização da metodologia de PMA-qPCR foi possível obter reduções de aproximadamente 3 Log. Com uma cultura de 4,96 Log (MPN) foi possível reduzir 3,23 Log de multiplicação com 50 µM de PMA e amostras contendo 125 µL de cultura (Tabela 9). Utilizando uma cultura de 7,92 Log (MPN) foi possível obter uma redução de multiplicação de 2,54 Log. Como já descrito acima, nessa cultura os resultados de multiplicação apresentaram em média 0,55 Log a mais nas alíquotas tratadas termicamente. Por esse motivo, esse resultado de redução (2,54 Log) não corresponde a real inativação pelo PMA. Considerando os resultados normais de multiplicação é possível inferir seguramente que as amostras sem tratamento térmico deveriam ter no mínimo o mesmo Log que as com tratamento térmico. Como as amostras foram obtidas de uma cultura em fase log, em teoria todas as bactérias deveriam estar vivas. Por esse motivo, os resultados de redução de multiplicação foram recalculados, tendo como referência as amostras de bactérias mortas (vivas antes do tratamento), obtendo-se uma redução de 3,09 Log (Gráfico

11), ou seja, mesmo aumentando a concentração microbiana por um fator de 1000, não houve mudança nos resultados de inativação pelo PMA a 50  $\mu\text{M}$ .

Os resultados dessa pesquisa apoiam o uso dessa metodologia para a análise de culturas submetidas a condições de letalidade que afetem suas membranas ou mesmo para verificar a viabilidade de bactérias em amostras liofilizadas, probióticos e culturas em produção de bioativos. Essa metodologia pode ser útil na análise de amostras ambientais de água produzida, bem como testes de inibição que utilizem candidatos não conhecidos a atividade biocida dentro do limite de detecção obtido (3 Log).

Alguns autores têm relatado características que favorecem a eficiência dessa metodologia, tais como amplicons pequenos e sequências de cópia única (ALVAREZ et al., 2013; SOEJIMA et al., 2008), ao passo que outros estudos mostram que o PMA não pode inibir completamente a multiplicação quando o DNA alvo é pequeno e alvos grandes de DNA são melhor suprimidos que os pequenos (CONTRERAS et al., 2011; LEE; LEE; KIM, 2015).

Como descrito na literatura, a mortalidade detectada por métodos tradicionais de cultivo geralmente é maior do que os obtidos pela metodologia de PMA-qPCR (CHANG et al., 2010; LØVDAL et al., 2011; YÁÑEZ et al., 2011). Os resultados dessa pesquisa têm a mesma característica, sendo detectada redução de 3 Log através de PMA-qPCR, ao passo que o método do número mais provável negatizou os resultados. Sendo assim, os resultados obtidos pelas duas metodologias são distintos ( $p < 0,05$ ).

Essa discrepância pode ser atribuída ao fato do PMA poder detectar como vivas células que, embora tenham perdido sua atividade metabólica, ainda tenham suas membranas íntegras, resultando na impossibilidade de crescerem no meio. O mesmo ocorre quando são consideradas células viáveis mas não cultiváveis (VBNC), as quais podem ser detectadas como vivas utilizando a metodologia de PMA-qPCR, mas não podem crescer em meios (NOCKER; CAMPER, 2009). Autores tem relatado a perda de correlação linear entre os resultados obtidos por cultura e aqueles estimados por PMA-qPCR, quando a proporção células vivas/mortas é acima de 4 Log (PAN; BREIDT, 2007).

Existe outra metodologia de detecção de viabilidade que não utiliza cultura, baseada na integridade de membrana, também atrativa como a PMA-qPCR. O

LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific) utiliza fluoróforos que coram bactérias vivas e mortas de forma distinta (verde/vermelho), possibilitando a quantificação ao microscópio de epifluorescência. A metodologia de PMA-qPCR é mais vantajosa que o BacLight, possibilitando a análise de muitas amostras em pouco tempo, e.g. 96 amostras podem ser analisadas em uma corrida de qPCR, com praticamente o mesmo trabalho que seria analisar 48 ou 24 amostras. Isso é possível por que a etapa de “detecção/quantificação” é automatizada.

Quantificar uma única amostra por microscopia é uma tarefa laboriosa, sendo na maioria das vezes inviável utilizar softwares de quantificação, pois muitas amostras apresentam background de fluorescência e artefatos. Na melhor das hipóteses a quantificação da duplicata de uma amostra demoraria no mínimo 30 minutos, não sendo possível analisar muitas amostras no mesmo dia devido ao cansaço produzido pela análise. Além disso, como a quantificação é feita de forma manual, a probabilidade de erros e viés aumenta. Por esses motivos, a quantificação de numerosas amostras por microscopia de epifluorescência se torna uma tarefa demorada e em alguns casos inviável.

Trabalhos têm utilizado o LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit associado a citometria de fluxo para quantificação total de bactérias. Em algumas publicações, a metodologia de PMA-qPCR foi comparada com o “BacLight-citometria de fluxo” (KRAMER et al., 2009; ZACHARIAS; KISTEMANN; SCHREIBER, 2015). Em um desses trabalhos, os resultados obtidos pelas distintas metodologias permitiu a detecção de alta viabilidade em liofilizados de probióticos (aproximadamente 90% - dentro do limite de detecção obtido no presente trabalho) (ZACHARIAS; KISTEMANN; SCHREIBER, 2015).

Uma vantagem da PMA-qPCR sobre a citometria de fluxo é o fato da real-time PCR permitir a quantificação absoluta de amostras, ao passo que a citometria de fluxo detecta a uma proporção de bactérias integras contra as totais. Além disso, a PMA-qPCR pode utilizar primers específicos para espécies ou de amplo espectro, enquanto a a citometria de fluxo utilizando o “BacLight” permite apenas a determinação do total de bactérias. Algumas amostras também podem apresentar bactérias agrupadas (grumos microbianos), sendo a otimização para amostras complexas difícil e laboriosa (KRAMER et al., 2009; ZACHARIAS; KISTEMANN; SCHREIBER, 2015).

Alguns trabalhos relatam capacidade de redução de multiplicação de amostras tratadas termicamente inferior a 3 Log (Tabela 13) com certos tipos de cepas, e.g. *V. parvula*, *Mycobacterium fortuitum*, *Escherichia coli*, *Methanobacterium movilense*, *Methanosarcina soligelidi* (ALVAREZ et al., 2013; HEISE et al., 2016; LEE; LEE; KIM, 2015; TAKAHASHI et al., 2017). As espécies citadas são conhecidas produtoras de exopolissacarídeos, ou fazem constituição de biofilmes ou possuem membranas celulares com constituintes que as tornam mais resistentes a fatores ambientais (e.g. baixas temperaturas), sendo em teoria menos permeáveis ou suscetíveis ao PMA (ALVAREZ et al., 2013; HALL-STOODLEY; LAPPIN-SCOTT, 1998; KOGA, 2012; NWODO; GREEN; OKOH, 2012; SCHIRMACK et al., 2014; WAGNER et al., 2013).

Tabela 13: Publicações com redução de multiplicação inferior a 3 Log.

Bactéria	Redução de multiplicação*	[PMA]	Referência
<i>V. parvula</i>	2,23	100 uM	(ALVAREZ et al., 2013)
<i>Escherichia coli</i>	± 2,5	50 uM	(TAKAHASHI et al., 2017)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	< 2	30 uM	(LEE; LEE; KIM, 2015)
<i>Methanobacterium movilense</i>	< 2	130 uM	(HEISE et al., 2016)
<i>Methanosarcina soligelidi</i>	< 1,2		

\*Utilizando o método de controle de mortalidade de 85 – 90°C/15 minutos ou exposição a isopropanol em culturas com 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> bactérias

Não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizaram PMA-qPCR para quantificar a espécie do presente estudo. Utilizando uma cepa da bactéria *Desulfovibrio vulgaris*, conseguimos uma redução máxima de 3 Log com 50 µM de PMA. Esses resultados são compatíveis com os obtidos por outros autores com a

concentração de 50  $\mu\text{M}$  e outras bactérias, sendo relatada redução de multiplicação entre 2 e 4,1 Log<sub>10</sub> (CHANG et al., 2010; LAI et al., 2016; LEE; LEE; KIM, 2015).

Melhores reduções de multiplicação foram possíveis apenas com o uso de concentrações maiores de PMA, e.g. redução da multiplicação de 5 Log com o uso de 200  $\mu\text{M}$  de PMA (CHANG et al., 2010); redução de 4 Log com tratamento duplo das amostras com 50  $\mu\text{M}$  de PMA e 250 ppm de SDS (TAKAHASHI et al., 2017; ZACHARIAS; KISTEMANN; SCHREIBER, 2015).

Em nenhum trabalho foi relatada supressão total da multiplicação do material genético de células mortas, independente da forma de controle a que foram submetidas. Desde que altas concentrações de PMA podem inibir a multiplicação do DNA de células vivas (PHOLWAT et al., 2011), alguns autores conseguiram aumentar sutilmente os sinais de exclusão de células mortas com tratamento repetidos de PMA e com o uso de moléculas que destruam ou aumentem a permeabilidade de membranas de células mortas (KRALIK; NOCKER; PAVLIK, 2010; TAKAHASHI et al., 2017). Em um trabalho foi proposto que o uso da metodologia de PMA-qPCR é mais adequada para o monitoramento de amostras ambientais com baixo nível de biomassa, e.g. amostras de redes de água quente, em vez de amostras altamente contaminadas, e.g. amostras de torres de resfriamento. Segundo o autor, em amostras com alta concentração de bactérias mortas, ocorre uma superestimação do valor de bactérias vivas pela metodologia de PMA-qPCR (SLIMANI et al., 2012). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os dados dessa publicação.

Também foi encontrada forte correlação entre a a concentração de PMA necessária para a inativação de multiplicação e o número de células presentes na amostra (Tabela 11). Tal aspecto foi relatado por outros autores (CHANG et al., 2010).

Não foi observada diferença significativa entre o número de bactérias estimado por MPN e qPCR, o que está de acordo com resultados encontrados na literatura quando comparando a qPCR e métodos de quantificação que envolvem cultivo microbiano (CHANG et al., 2010; KRAMER et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2017).

Quando analisando o número de bactérias mortas pelo calor, nossos resultados estão compatíveis com os obtidos por outros autores (CHANG et al., 2010; LEE; LEE; KIM, 2015; LI; CHEN, 2013; TAKAHASHI et al., 2017). Não foi observada diferença significativa entre os resultados com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de PMA ( $p > 0,05$ ).



Nos testes com o biocida TCICA, utilizando a técnica de MPN foi mostrado que nas concentrações de 500, 50 e 5 ppm não houve efeito significativo de morte celular ( $p > 0,05$ ). Apenas a amostra tratada com 500 ppm de TCICA apresentou redução de 0,66 Log no MPN. Os resultados por qPCR e PMA-qPCR foram os mesmos para essas amostras, porém, a amostra tratada com 500 ppm, que deveria conter menos amplicons apresentou maior resultado de multiplicação. Esse mesmo aspecto foi relatado por outros autores quando comparado a redução de multiplicação no controle (morte celular a 90°C/15 minutos) com outros métodos de controle microbiano, e.g. compostos quaternários de amônio, ozônio, radiação UV e cloro (ALVAREZ et al., 2013; LEE; LEE; KIM, 2015; NOCKER; SOSSA; CAMPER, 2007).

Uma hipótese para tal resultado é o fato dessas substâncias terem ação direta sobre a membrana citoplasmática interna de bactérias (CARMONA-RIBEIRO; DE MELO CARRASCO, 2013; HUGO; FRIER, 1969; IOANNOU; HANLON; DENYER, 2007). Dessa forma, as bactérias submetidas a esse tipo de tratamento foram lisadas ou se tornaram mais susceptíveis a penetração do PMA, disponibilizando o material genético a essa molécula intercalante de forma mais eficiente do que o tratamento térmico. Sabendo que as amostras tratadas termicamente apresentaram melhor resultado de multiplicação de DNA que as sem aquecimento, foi realizada nova análise dos resultados do biocida TCICA pela metodologia de PMA-qPCR. Considerando o controle como a amostra tratada termicamente, foi possível detectar uma redução de multiplicação e 0,5 Log. Esse valor detectado pela metodologia de PMA-qPCR é compatível com o obtido pelo método do número mais provável (0,66 Log), evidenciando que a técnica é sensível o suficiente para detectar baixos níveis de mortalidade.

O tamanho do amplicon de PCR é um importante parâmetro experimental quando analisando amostras tratadas com EMA/PMA (CONTRERAS et al., 2011). Por exemplo, em um experimento que utilizou primers que geravam amplicons grandes foi possível obter bons sinais de redução de multiplicação, uma vez que a concentração de PMA utilizada foi de apenas 10  $\mu$ M, cinco vezes menor que a utilizada em um estudo similar (NOCKER et al., 2007). Em uma publicação, quando os autores compararam os sinais de qPCR de células mortas tratadas com EMA, foi possível observar a redução de 6,3 ciclos com um produto de 79 bp e de 13,3 ciclos com um produto de 236 bp (NOCKER et al., 2007). Esses resultados podem ser interpretados

com a hipótese de que a multiplicação de fragmentos longos aumenta a probabilidade da DNA polimerase encontrar um dano provocado pelo PMA que interfira com a elongação da fita (CONTRERAS et al., 2011).

Por ser a segunda geração de intercalantes de ácidos nucleicos capazes de danificá-los e impedir sua multiplicação por PCR, tendo a primeira publicação recente (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006), existe considerável confusão quanto a correta interpretação e significância dos resultados. Vários fatores podem influenciar na eficiência de tal metodologia, desde o tamanho dos amplicons, concentração do PMA, intensidade e tempo de exposição a luz, método que foi utilizado para matar as células, espécie, fase de crescimento (Log ou Lag) e características de membrana (KRAMER et al., 2009; KRÜGER et al., 2014; LI; CHEN, 2013; RADULOVIĆ et al., 2012; YANG; BADONI; GILL, 2011). Por esse motivo, experimentos que visem reduzir a multiplicação do DNA de células mortas produzem resultados bem variáveis.

Em resumo, essa pesquisa mostrou a utilidade da metodologia de PMA-qPCR para a quantificação diferencial entre bactérias vivas e mortas em culturas de *D. vulgaris*. O limite de detecção de bactérias mortas obtido para a cepa *D. vulgaris* foi de aproximadamente 3 Log utilizando culturas com  $10^5$ — $10^8$  bactérias tratadas termicamente e diluídas a 25% (125  $\mu$ L de cultura + 375  $\mu$ L de meio). Esse valor de redução corresponde a 99,9% de uma amostra. Também é possível afirmar que a qPCR desenhada para o estudo foi capaz de quantificar corretamente as amostras analisadas, já que não existe diferença estatística entre o número de bactérias estimado pela qPCR e o número de bactérias obtido por número mais provável.

Concluimos que nas condições testadas o PMA não foi capaz de reduzir completamente os sinais de multiplicação de células mortas pelo calor. Apesar disso, a metodologia padronizada se mostrou útil para a triagem de métodos de controle microbiano, dentro do espectro de redução de  $10^3$ , em menos tempo (1—3 dias) que o método tradicional rotineiramente utilizado nos laboratórios – número mais provável (28 dias) ou para análise de amostras com baixa carga microbiana. Para melhorar a eficiência da detecção de células vivas e mortas de *Desulfovibrio vulgaris* através de PMA-qPCR mais estudos são necessários.

## 8. REFERÊNCIAS

ABU SHAQRA, Q. M.; HILL, E. C. Distribution of sulphate reducing bacteria in oil emulsion and its relationship to aeration and swarf. **Tribology International**, v. 17, n. 1, p. 31–34, fev. 1984.

AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN, K.; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil-water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. **Anaerobe**, v. 16, n. 1, p. 12–8, mar. 2010.

AGUILAR-BARAJAS, E. et al. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. **BioMetals**, v. 24, n. 4, p. 687–707, 2011.

ALLISON, D. G.; MAIRA-LITRAN, T.; GILBERT, P. Antimicrobial resistance of biofilms. In: EVANS, L. . (Ed.). . **Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control**. Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 149–166.

ALVAREZ, G. et al. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1–8, jan. 2013.

AMY, P. S.; HALDEMAN, D. L. Denizens of the deep. In: AMY, P. S.; HALDEMAN, D. L. (Eds.). . **The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface**. 1. ed. New York: CRC Lewis, 1997. p. 1–3.

BAE, S.; WUERTZ, S. Discrimination of Viable and Dead Fecal Bacteroidales Bacteria by Quantitative PCR with Propidium Monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2940–2944, 2009.

BAHR, M. et al. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1175–85, ago. 2005.

BANIN, E.; BRADY, K. M.; GREENBERG, E. P. Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2064–2069, 2006.

BARTON, L. L.; TOMEI, F. A. Characteristics and Activities of Sulfate-Reducing Bacteria. In: BARTON, L. L. (Ed.). . **Sulfate-Reducing Bacteria**. 8. ed. New York:

Plenum Press, 1995. p. 1–32.

BASS, C.; LAPPIN-SCOTT, H. The bad guys and the good guys in petroleum microbiology. **Oilfield Review**, v. 10, n. October 1996, p. 17–25, 1997.

BASTIN, E. S. The problem of the natural reduction of sulphates. **Bulletin - American Association of Petroleum Geologists**, v. 10, p. 1270–1299, 1926.

BENTSINK, L. et al. Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 647–655, 2002.

BERNARD, F. P.; CONNAN, J.; MAGOT, M. Indigenous microorganisms in connate water of many oil fields: a new tool in exploration and production techniques. In: BERNARD, F. P.; CONNAN, J.; MAGOT, M. (Eds.). . **SPE 24811. Proceedings of the Society of Petroleum Engineers, vol. II**. Richardson, TX: Society of Petroleum Engineers, Inc, 1992. p. 467–475.

BEUMER, R. R.; DE VRIES, J.; ROMBOUTS, F. M. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 153–163, 1992.

BISWAS, K. C. et al. Reduction of molybdate by sulfate-reducing bacteria. **BioMetals**, v. 22, n. 1, p. 131–139, 2009.

BLAGODATSKI, A. et al. Diverse set of Turing nanopatterns coat corneae across insect lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 34, p. 10750–10755, 2015.

BUNKER, S. T.; BATES, T. C.; OLIVER, J. D. Effects of temperature on detection of plasmid and chromosomally encoded *gfp* and *lux*-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. **Environmental Biosafety Research**, v. 3, p. 1–8, 2004.

CARABALLO, A. E. S. Evaluación del molibdato y nitrato sobre bacterias sulfato-reductoras asociadas a procesos de corrosión en sistemas industriales. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 52–62, 2008.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; DE MELO CARRASCO, L. D. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9906–9946, 2013.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 6, p. 499–511, 1993.

CARVALHO, A. S. **Desenvolvimento e Aplicação da Tecnologia de Exclusão Biocompetitiva no Controle da Biossulfetogênese na Indústria de Petróleo na Região da Bahia-Brasil**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2010.

CASTRO, H.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2000.

CAWTHORN, D. M.; WITTHUHN, R. C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1178–1185, 2008.

CERCA, F. et al. SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, p. 850–856, 2011.

ÇETIN, D.; BILGIÇ, S.; DÖNMEZ, G. Biocorrosion of Low Alloy Steel by *Desulfotomaculum* sp. and Effect of Biocides on Corrosion Control. **ISIJ International**, v. 47, n. 7, p. 1023–1028, 2007.

CHAIYANAN, S. et al. Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Systematic and applied microbiology**, v. 24, p. 331–341, 2001.

CHANG, B. et al. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, n. 2, p. 119–123, 2010.

CHANG, C.; HUNG, N.; CHEN, N. Optimization and application of propidium monoazide- quantitative PCR method for viable bacterial bioaerosols. **Journal of Aerosol Science**, v. 104, n. 17, p. 90–99, 2017.

CHANG, Y.-J.; CHANG, Y.-T.; CHEN, H.-J. A method for controlling hydrogen sulfide in water by adding solid phase oxygen. **Bioresource technology**, v. 98, n. 2, p. 478–83, 2007.

CHEN, Y. Q. et al. Inactivation of Resistant *Mycobacteria mucogenicum* in Water: Chlorine Resistance and Mechanism Analysis \*. **Biomedical and environmental**

sciences: **BES**, v. 25, n. 2, p. 230–237, 2012.

CHUDZIK, B. et al. In vitro inhibitory activity of EDTA against planktonic and adherent cells of *Candida* sp. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 115–119, 2007.

CONTRERAS, P. J. et al. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 1, p. 89–95, 2011.

CORD-RUWICH, R.; KLEINITZ, W.; WIDDEL, F. Sulphate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology**, v. 1, p. 97–106, 1987.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K.-J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86–95, 1978.

DAVIDOVA, I. et al. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 80–86, 2001.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.

DAY, A. P.; OLIVER, J. D. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 69–73, 2004.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 36, n. 3–4, p. 227–245, 1995.

DIÓSI, G. et al. Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 151–156, 2003.

DOW MICROBIAL CONTROL. AQUICAR™ THPS 75 Water Treatment Microbiocide Antimicrobial for Industrial Water Treatment Applications. . 2009.

DRAHOVSKÁ, H. et al. Detection of Salmonella by polymerase chain reaction targeted to fimC gene. **Biologia, Bratislava**, v. 6, p. 611–616, 2001.

DU, J. B. et al. Advances on corrosion caused by marine microorganisms. **Shandong Metallurgy**, v. 29, p. 1–3, 2007.

DUNNE, W. M.; BURD, E. M. The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the in vitro adhesion of Staphylococcus epidermidis to plastic. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 10, p. 1019–1027, 1992.

ELIZAQUÍVEL, P. et al. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of Escherichia coli O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 316–320, 2012.

FALKINHAM, J. O. Factors Influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5685–5689, 2003.

FAUQUE, G. D. Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. In: BARTON, L. L. (Ed.). . **Sulfate-Reducing Bacteria**. 8. ed. New York: Plenum Press, 1995. p. 217–241.

FEDERIGHI, M. et al. Evidence of non-cocoid viable but non-culturable Campylobacter jejuni cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. **Food Microbiology**, v. 15, n. 539–550, 1998.

FITTIPALDI, M. et al. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 168, n. 1–2, p. 228–232, 2010.

FITTIPALDI, M. et al. Discrimination of Viable Acanthamoeba castellani Trophozoites and Cysts by Propidium Monoazide Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 359–364, 2011.

FORGHANI, F. et al. Rapid detection of viable Bacillus cereus emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). **Food Control**, v. 55, p. 151–157, 2015.

FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**,

v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 354–360, 2002.

GEDALANGA, P. B.; OLSON, B. H. Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 587–596, 2009.

GÓMEZ DE SARAVIA, S.; DE LORENZO MELE, M. F. Enhancement of glutaraldehyde biocidal efficacy by the application of an electric field. Effect on sessile cells and on cells released by the biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6–7, p. 1077–1081, 2005.

GRASSIA, G. S. et al. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. **FEMS microbiology ecology**, v. 21, p. 47–58, 1996.

GREENE, E. A. et al. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 607–617, 2003.

GUNASEKERA, T. S. et al. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, p. 1988–1993, 2002.

HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 1, p. 77–84, 1998.

HARA-KUDO, Y. et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 155–161, 2005.

HEIM, S. et al. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6739–6745, 2002.

HEISE, J. et al. Propidium monoazide treatment to distinguish between live and dead methanogens in pure cultures and environmental samples. **Journal of**



**Microbiological Methods**, v. 121, p. 11–23, 2016.

HENRY, E. A. et al. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. **Archives of Microbiology**, v. 161, p. 62–69, 1994.

HUBERT, C. et al. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 272–282, 2005.

HUGO, W. B.; FRIER, M. Mode of action of the antibacterial compound dequalinium acetate. **Applied microbiology**, v. 17, n. 1, p. 118–127, 1969.

IEA. **Key World Energy Statistics** Paris, 2014a.

IEA. **CO2 Emissions From Fuel Combustion: Highlights** Paris, 2014b.

IOANNOU, C. J.; HANLON, G. W.; DENYER, S. P. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 296–306, 2007.

JARVIS, B.; WILRICH, C.; WILRICH, P. T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1660–1667, 2010.

JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. Effect of nitrate on biogenic sulfide production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1205–1211, 1986.

JEONG, M.-I.; PARK, S. Y.; HA, S.-D. Thermal inactivation of human norovirus on spinach using propidium or ethidium monoazide combined with real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Food Control**, v. 78, p. 79–84, 2017.

JESUS, E. B. et al. Inhibition of microbial sulfate reduction by molybdate. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 55, n. 71, p. 1–12, 2015.

JORDAN, L. C.; WALSH, J. M. **Selection of an active souring management**

**solution for a Gulf of Mexico waterflood.** Proceedings of the 2004 SPE Corrosion. New Orleans, Louisiana: 2004.

KAYIGIRE, X. A. et al. Propidium monoazide and Xpert MTB/RIF to quantify *Mycobacterium tuberculosis* cells. **Tuberculosis**, v. 101, p. 79–84, 2016.

KNUTSSON, R. et al. Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 52–60, 2002.

KOBAYASHI, H. et al. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 5, p. 633–8, 2009.

KOBAYASHI, H. et al. Distinction between intact and antibiotic-inactivated bacteria by real-time PCR after treatment with propidium monoazide. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 9, p. 1245–1251, 2010.

KOGA, Y. Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. **Archaea**, v. 2012, 2012.

KOGURE, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 415–420, 1979.

KRALIK, P.; NOCKER, A.; PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S80–S86, 2010.

KRAMER, M. et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1137–1147, 2009.

KRÜGER, N. J. et al. “Limits of control” - Crucial parameters for a reliable quantification of viable *Campylobacter* by Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

LAI, C.-H. et al. Designing primers and evaluation of the efficiency of propidium monoazide – Quantitative polymerase chain reaction for counting the viable cells of

Lactobacillus gasseri and Lactobacillus salivarius. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1–10, 2016.

LARSEN, J.; ROD, M. H.; ZWOLLE, S. **Prevention of reservoir souring in the Halfdan field by nitrate injection**. Proceedings of the 2004 SPE Corrosion. **Anais...**New Orleans, Louisiana: 2004.

LARSEN, J.; SANDERS, P. F.; TALBOT, R. E. **Experience with use of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) for the control of downhole hydrogen sulfide**. Proceedings of the 2000 SPE Corrosion. **Anais...**Orlando, Florida: 2000.

LEE, E.-S.; LEE, M.-H.; KIM, B.-S. Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable Mycobacterium fortuitum after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 143–148, 2015.

LEE, J.-L.; LEVIN, R. E. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. **Journal of microbiological methods**, v. 76, n. 1, p. 93–6, 2009a.

LEE, J. L.; LEVIN, R. E. Discrimination of viable and dead Vibrio vulnificus after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 2, p. 184–188, 2009b.

LI, B.; CHEN, J.-Q. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live Salmonella spp. in food. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 273, 2013.

LISLE, J. T.; PYLE, B. H.; MCFETERS, G. A. The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected Escherichia coli O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 42–47, 1999.

LLÉO, M. M. et al. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 1095–1102, 2001.

LØVDAL, T. et al. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed Listeria innocua. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 164–169, 2011.

MACIEL, B. M. et al. Detection of Salmonella Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2578–2588, 2011.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 103–16, fev. 2000.

MASSA, E. M.; LOPEZ VINALS, A.; FARIAS, R. N. Influence of unsaturated fatty acid membrane component on sensitivity of an Escherichia coli fatty acid auxotroph to conditions of nutrient depletion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2107–2111, 1988.

MAXWELL, S. et al. **In-field biocide optimization for magnus water injection system**. Proceedings of the 2002 SPE Corrosion. **Anais...Denver, Colorado: 2002.**

MCBAIN, A. J. et al. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 177–185, 2003.

MCGOVERN, V. P.; OLIVER, J. D. Induction of cold responsive proteins in Vibrio vulnificus. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4131–4133, 1995.

MCINERNEY, M. J.; NAGLE, D. P.; KNAPP, R. M. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future. In: BERNARD, O.; MICHEL, M. (Eds.). **Petroleum microbiology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005. p. 215–237.

MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L.-A.; DRAKE, M. Nucleic Acid Persistence in Heat-Killed Escherichia coli O157:H7 from Contaminated Skim Milk. **Journal of Food Protection**, v. 8, n. 6, p. 839–844, 1999.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 249–253, 2003.

MINERALURGII, F. P. the Effect of Waste Phosphogypsum on the Denitrification and Desulfurification Processes. v. 36, n. 6, p. 209–216, 2002.

MORI, Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 150–154, 2001.

MORTON, D.; OLIVER, J. D. Induction of carbon starvation proteins in *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, p. 3653–3659, 1994.

MORTON, L. H. G. et al. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 41, n. 3–4, p. 247–259, 1998.

MYHR, S. et al. Inhibition of microbial H<sub>2</sub>S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 400–8, 2002.

NIE, X. et al. Response of the freshwater Alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 27, n. 1, p. 168–173, 2008.

NILSEN, R. K. et al. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in north sea oil field waters and oil reservoirs. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1793–8, maio 1996.

NOCKER, A. et al. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5111–5117, 2007.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1997–2004, 2006.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **FEMS Microbiol Lett**, v. 291, n. 2, p. 137–142, 2009.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.-Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 310–320, 2006.

NOCKER, A.; SOSSA, K. E.; CAMPER, A. K. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 2, p. 252–260, 2007.

NOGVA, H. K.; RUDI, K. Ethidium Monoazide for DNA-Based Differentiation of Viable and Dead Bacteria by 5' -Nuclease PCR. **BioTechniques**, v. 34, n. 4, p. 804–813, 2003.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. E63, 2000.

NOVAK, J. S.; JUNEJA, V. K. Detection of Heat Injury in *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, v. 11, n. 5, p. 1739–1743, 2001.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002–14015, 2012.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological M**, v. 7, p. 57–66, 1987.

OLIVER, J. D. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: COLWELL, R. R.; GRIMES, D. J. (Eds.). **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 2000a. p. 277–299.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In: BELL, C. R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. (Eds.). **Microbial Biosystems: New Frontiers**. Halifax, Canada: The Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 2000b. p. 723–730.

OLIVER, J. D. Problems in detecting dormant (VBNC) cells and the role of DNA elements in this response. In: JANSSON, J. K.; ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J. (Eds.). **Tracking Genetically-Engineered Microorganisms**. Georgetown, TX: Landes Biosciences, 2000c. p. 1–15.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43 Spec No, n. February, p. 93–100, 2005.

OLIVER, J. D.; DAGHER, M.; LINDEN, K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. **Journal of Water and Health**, v. September, n. 3 (3), p. 249–257, 2005.

OLLIVIER, B.; CAYOL, J. L. The fermentative, iron-reducing, and nitrate-reducing microorganisms. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Eds.). **Petroleum microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2005. p. 71–88.

OLSZEWSKA, M. A.; PANFIL-KUNCEWICZ, H.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. Detection of Viable but Nonculturable Cells of *Listeria monocytogenes* with the Use of Direct Epifluorescent Filter Technique. **Journal of Food Safety**, p. 1–5, 2014.

PAN, Y.; BREIDT, F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 24, p. 8028–8031, 2007.

PATHAK, S. et al. Counting Mycobacteria in Infected Human Cells and Mouse Tissue: A Comparison between qPCR and CFU. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34931, 2012.

PATIDAR, S. K.; TARE, V. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1215–1222, 2005.

PHILIPPI, G. T. On the depth, time, and mechanism of origin of the heavy to medium gravity naphthenic crude oil. **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 41, p. 33–52, 1977.

PHOLWAT, S. et al. Rapid first- and second-line drug susceptibility assay for mycobacterium tuberculosis isolates by use of quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 69–75, 2011.

PIET, L.; ROSSMOORE, H. . The evaluation of monocopper (II) citrate as a potential antimicrobial metal complex. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 25, p. 531–536, 1984.

PORTER, J.; EDWARDS, C.; PICKUP, R. W. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 4, p. 399–408, 1995.

POSTGATE, J. Sulphate reduction by bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, p. 505–520, 1959.

PREDICALA, B. et al. Control of H<sub>2</sub>S emission from swine manure using Na-nitrite and Na-molybdate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 300–309, 2008.

RAAD, I. et al. In Vitro and Ex Vivo Activities of Minocycline and EDTA against Microorganisms Embedded in Biofilm on Catheter Surfaces. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3580–3585, 2003.

RAAD, I. et al. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 78–83, 2007.

RADULOVIĆ, Z. et al. Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 4, p. 1465–1472, 2012.

RAHMAN, I. et al. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, p. 3573–3578, 1994.

RAMAN, V.; TAMILSELVI, S.; RAJENDRAN, N. Evaluation of effective biocides for SRB to control microbiologically influenced corrosion. **Materials and Corrosion**, v. 59, p. 329–334, 2008.

RAWSTHORNE, H.; DOCK, C. N.; JAYKUS, L. A. PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores.

**Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2936–9, 2009.

REMPEL, C. L.; EVITTS, R. W.; NEMATI, M. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 878–86, 2006.

RIZK, T. Y. et al. **The effect of desulphated seawater injection on microbiological hydrogen sulphide generation and implication for corrosion control.** SPE CORROSION 1998. *Anais...*San Diego, CA: 1998.

ROBINSON, K. et al. **Reservoir souring in a field with sulphate removal: a case study.** Proceedings of the 2010 SPE Annual Technical Conference and Exhibition. 2010.

RODRIGUEZ, G. G. et al. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, p.



1801–1808, 1992.

RUDI, K. et al. Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in food. . **International journal of food microbiology**. , v. 78, p. 171–180, 2002.

RUDI, K.; MOEN, B.; HOLCK, A. L. Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1018–1024, 2005.

SCHIRMACK, J. et al. Methanobacterium movilense sp. nov., a hydrogenotrophic, secondary-alcohol-utilizing methanogen from the anoxic sediment of a subsurface lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 522–527, 2014.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.

SLIMANI, S. et al. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable Legionella by qPCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 2, p. 319–321, 2012.

SOEJIMA, T. et al. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2305–2313, 2008.

SONTAKKE, S. et al. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 76, n. 3, p. 217–25, 2009.

SPEIGHT, J. G. History and Terminology. In: SPEIGHT, J. G. (Ed.). . **Chemical Industries/137: The Chemistry and Technology of Petroleum**. 5th. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 3–30.

STACKEBRANDT, E.; STAHL, D. A.; DEVEREUX, R. Taxonomic Relationships. In: BARTON, L. L. (Ed.). . **Sulfate-Reducing Bacteria**. 8. ed. New York: Plenum Press, 1995. p. 49–87.

STEWART, M. H.; OLSON, B. H. Physiological studies of chloramine resistance developed by Klebsiella pneumoniae under low-nutrient growth conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2918–2927, 1992.

STODDARD, S. F. et al. rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D593–D598, 2015.

STOODLEY, P. et al. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. **Journal of applied microbiology**, v. 85 Suppl 1, p. 19S–28S, 1998.

SUNDE, E.; THORESTENSTON, T.; TORSVIK, T. **Field-related mathematical model to predict and reduce reservoir souring. SPE 25197**. Proceedings of the SPE annual technical conference. **Anais...**Richardson, Texas: Society of Petroleum Engineers, 1993.

TAKAHASHI, H. et al. Discrimination of live and dead cells of *Escherichia coli* using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment. **Food Control**, v. 71, p. 79–82, 2017.

TASKIN, B.; GOZEN, A. G.; DURAN, M. Selective quantification of viable *Escherichia coli* bacteria in biosolids by quantitative PCR with propidium monoazide modification. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 13, p. 4329–4335, 2011.

TAWEECHASUPAPONG, S.; DOYLE, R. J. Sensitivity of bacterial coaggregation to chelating agents. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 343–346, 2000.

TAYLOR, R. H. et al. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1702–1705, 2000.

THOLOZAN, J. L. et al. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, p. 1110–1116, 1999.

TURING, A. M. The chemical basis of morphogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 52, n. 1–2, p. 37–72, 1952.

VAARA, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 395–411, 1992.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p. 151–159, 2005.

VAN BECKHOVEN, J. R. C. M.; STEAD, D. E.; VAN DER WOLF, J. M. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 5, p. 840–849, 2002.

VAN DER VLIET, G. M. E. et al. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 1959–1965, 1994.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VARMA, M. et al. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. **Water Research**, v. 43, n. 19, p. 4790–4801, 2009.

VENDRAME, M. et al. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Oenococcus oeni* in must and wine by quantitative PCR. **Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 48–57, 2013.

VENDRAME, M. et al. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. **Food Microbiology**, v. 42, p. 196–204, 2014.

VENKOBACHAR, C.; IYENGAR, L.; RAO, A. V. S. P. Mechanism of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions. **Water Research**, v. 11, p. 727–729, 1977.

VESPER, S. et al. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 180–184, 2008.

VIRTO, R. et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5022–5028, 2005a.

VIRTO, R. et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5022–5028, 2005b.

VON REGE, H.; SAND, W.; VON RÄ"GE, H. Evaluation of biocide efficacy by microcalorimetric determination of microbial activity in biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, p. 227–235, 1998.

W.B, H. Disinfection Mechanisms. In: RUSSELL A.D., HUGO W.B., A. G. A. . (Ed.). . **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization**. 3rd. ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1999. p. 258–293.

WAGNER, D. et al. Methanosarcina soligelidi sp. nov., a desiccation and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART8, p. 2986–2991, 2013.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, A. Detection of viable Escherichia coli O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1719–28, 2009.

WANG, S.; LEVIN, R. E. Discrimination of viable Vibrio vulnificus cells from dead cells in real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 1, p. 1–8, 2006.

WEINBERG, E. D. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. **Medical Hypotheses**, v. 63, n. 5, p. 863–865, 2004.

WEN, J. et al. A green biocide enhancer for the treatment of sulfate-reducing bacteria (SRB) biofilms on carbon steel surfaces using glutaraldehyde. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 1102–1106, 2009a.

WEN, J. et al. Chelators enhanced biocide inhibition of planktonic sulfate-reducing bacterial growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1053–1057, 2009b.

WEN, J.; GU, T. **Evaluations of a green biocide and a green biocide enhancer for the mitigation of biocorrosion using an electrochemical bioreactor**. (American Institute of Chemical Engineers, Ed.) Annual Meeting Conference Proceedings. Salt Lake City, UT, USA: AIChE, 2007.

WIDDEL, F. The Genus Desulfotomaculum. In: BALOWS, A. et al. (Eds.). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 1792–1799.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.

WORLD HERITAGE ENCYCLOPEDIA. **Abraham Gesner**. Disponível em: <[http://www.worldlibrary.org/articles/abraham\\_gesner](http://www.worldlibrary.org/articles/abraham_gesner)>. Acesso em: 12 maio. 2017.

YÁÑEZ, M. A. et al. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 124–130, 2011.

YANG, X.; BADONI, M.; GILL, C. O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1478–1482, 2011.

YARON, S.; MATTHEWS, K. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 633–640, 2002.

YUAN, H. T. et al. Review on microbiologically influenced corrosion by sulfate-reducing bacteria and the protective measures. **Chemistry&Bioengineering**, v. 26, p. 11–14, 2009.

ZACHARIAS, N.; KISTEMANN, T.; SCHREIBER, C. Application of flow cytometry and PMA-qPCR to distinguish between membrane intact and membrane compromised bacteria cells in an aquatic milieu. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 8, p. 714–722, 2015.

ZEIKUS, J. G. et al. Microbial Ecology of Volcanic Sulphidogenesis: Isolation and Characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 1159–1169, 1983.

ZHANG, C.; WEN, F.; CAO, Y. Progress in Research of Corrosion and Protection by Sulfate-Reducing Bacteria. **Procedia Environmental Sciences**, v. 10, n. Esia, p. 1177–1182, 2011.

ZHANG, G.; BROWN, E. W.; GONZÁLEZ-ESCALONA, N. Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6495–

6501, 2011.

ZHANG, J. Z. et al. Progress in research on thermophilic sulfate-reducing bacteria. **Chemical Engineering&Equipment**, v. 10, p. 105–106, 2009.

ZHANG, Z. H. et al. Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 401–406, 2014.

ZHAO, X. et al. Rapid detection of viable *Escherichia coli* O157 by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1708–16, 2013.

ZIMMERMAN, R.; ITURRIAGA, R.; BECKER-BIRCK, J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. **Applied and environmental microbiology**, v. 36, p. 926–935, 1978.

ZOBELL, C. E.; ANDERSON, D. Q. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. **The Biological Bulletin**, v. 71, p. 324–342, 1936.