

Artigo Técnico

Avaliação da eficácia biocida dos produtos sulfato de tetra (hidroximetil) fosfônio (THPS), glutaraldeído e isotiazolona frente a Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em diferentes escalas de cultivo de Número Mais Provável (NMP)

Evaluation of the biocidal efficacy of products tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS), glutaraldehyde and isothiazolone for Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) in different Most Probable Number (MPN) cultivation scales

Henrique Moreira Simon^a, Maria Filomena de Andrade Rodrigues^a.

^a Laboratório de Biotecnologia Industrial, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

*e-mail: hsimon@ipt.br

Palavras-chave: BRS; biocida; NMP; microescala.

Keywords: SRB; biocide; MPN; microscale.

Resumo

O controle de bactérias redutoras de sulfato (BRS) na indústria petrolífera é feito com biocidas. O monitoramento da eficácia destes produtos pode ser verificado com contagens de população viável após exposição ao biocida. A contagem de Número Mais Provável (NMP) é a mais utilizada para BRS. Aspectos como tempo de incubação e espaço físico motivam a busca de ensaios para avaliar de maneira célere a atividade antimicrobiana de biocidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de três produtos (THPS, glutaraldeído e isotiazolona) frente às linhagens *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 e *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, com métodos distintos para quantificação de NMP em relação ao meio de cultura utilizado e à escala de cultivo adotada para quantificação. Os ensaios foram realizados com o método convencional em frascos e com o método em microplacas incubadas em jarras com gerador de ambiente anaeróbico. Os produtos foram avaliados em 5 concentrações mais um controle (sem tratamento), determinadas a partir da sua concentração inibitória mínima teórica descrita pelo fabricante. O tempo de contato dos microrganismos com os biocidas foi de 15 minutos, e os ensaios de recuperação de carga microbiana foram realizados nas escalas informadas. Os resultados observados atestam as contagens de BRS em microplaca como opção viável para validar produtos biocidas de uso em campo, com obtenção de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) comparáveis para o THPS entre os diferentes métodos (100 mg/L) e com valores coerentes com os observados na literatura para glutaraldeído (100 mg/L e 250 mg/L).

Abstract

*The control of sulfate-reducing bacteria (SRB) in the oil industry is done with biocides. Monitoring the effectiveness of these products can be verified with viable counts after exposure to the biocide. The Most Probable Number (MPN) is the most commonly technique used for BRS. Aspects such as incubation time and physical space motivate the search for tests to quickly assess the antimicrobial activity of biocides. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of three products (THPS, Glutaraldehyde and Isothiazolone) against the strains *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 and *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, with different methods for quantification of MPN in relation to the culture medium used and the scale adopted for quantification. The assays were performed with the conventional method in flasks and with the method in microplates incubated in jars with anaerobic generator generator. The products were*

evaluated at 5 concentrations and with a control (without treatment), according their theoretical minimum inhibitory concentration described by the manufacturer. The contact time of the microorganisms with the biocides was 15 minutes, and the microbial load recovery tests were carried out at the informed scales. The observed results attest to SRB counts in microplates as a viable option to validate biocide products for use in-field, obtaining comparable Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values for THPS between different methods (100 mg/L) and values consistent with those observed in the literature for Glutaraldehyde (100 mg/L and 250 mg/L).

1 Introdução

A corrosão microbiológica ou biocorrosão é o fenômeno de corrosão ocasionado pela atividade de microrganismos na superfície de metais (ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE, 2014). A biocorrosão é associada como a causa direta de falhas por corrosão na indústria petrolífera, com custo anual de manutenção na ordem de bilhões de dólares (KOCH *et al*, 2016). Os microrganismos podem influenciar a corrosão por mecanismos diversos, tais como a produção de metabólitos corrosivos; a remoção direta de elétrons da superfície dos metais; e criação de células de aeração diferencial no interior dos biofilmes (LITTLE *et al.*, 2016; RODRIGUES, T. *et al.*, 2013). As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) são apontadas como as espécies mais significativas para eventos de biocorrosão no ambiente petrolífero, pois usam o sulfato como aceptor terminal de elétrons e carbono orgânico ou Fe(0) como doador de elétrons para seu metabolismo dissimilatório. Estas reações causam corrosão das superfícies de ligas como aço-carbono, e a concomitante produção de sulfeto de hidrogênio, um composto tóxico e corrosivo aos seres humanos. O tratamento de rotina para prevenção e controle da corrosão associada às BRS consiste na limpeza com agentes mecânicos e a aplicação de produtos químicos, como inibidores de corrosão ou biocidas, para mitigar a proliferação destes microrganismos nos sistemas petrolíferos (VIDELA e HERRERA, 2009; ARAÚJO, L. *et al*, 2013).

A rotina de monitoramento de contaminação microbiológica em ambientes industriais pode utilizar métodos dependentes de cultivo em meios específicos, com o intuito de confirmar a inativação de microrganismos após aplicação de biocidas (ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE, 2014). A técnica de contagem por número mais provável (NMP) em meio seletivo é utilizada historicamente para confirmar a presença de BRS, com a formação de precipitados negros de sulfeto ferroso

no conteúdo dos frascos utilizados no cultivo em diluição seriada para quantificação das BRS. Estas análises demandam longos tempos de incubação para obter contagens confiáveis de NMP, devido à ao metabolismo lento das bactérias e necessidade de adaptação no meio de cultura (POSTGATE, J.R., 1984).

Devido à exigência de rápidos resultados para os níveis de contaminação por BRS para direcionar a aplicação de biocidas, o objetivo deste trabalho foi propor ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana de três biocidas (THPS, glutaraldeído e isotiazolona) frente às espécies BRS *Desulfotomaculum nigrificans* e *Desulfovibrio desulfuricans*, com o uso de métodos distintos para quantificação do NMP em relação ao meio de cultura utilizado e à escala de cultivo adotada para obtenção dos resultados.

2 Procedimento metodológico

O planejamento experimental dos ensaios realizados considerou as condições apresentadas na TABELA 1.

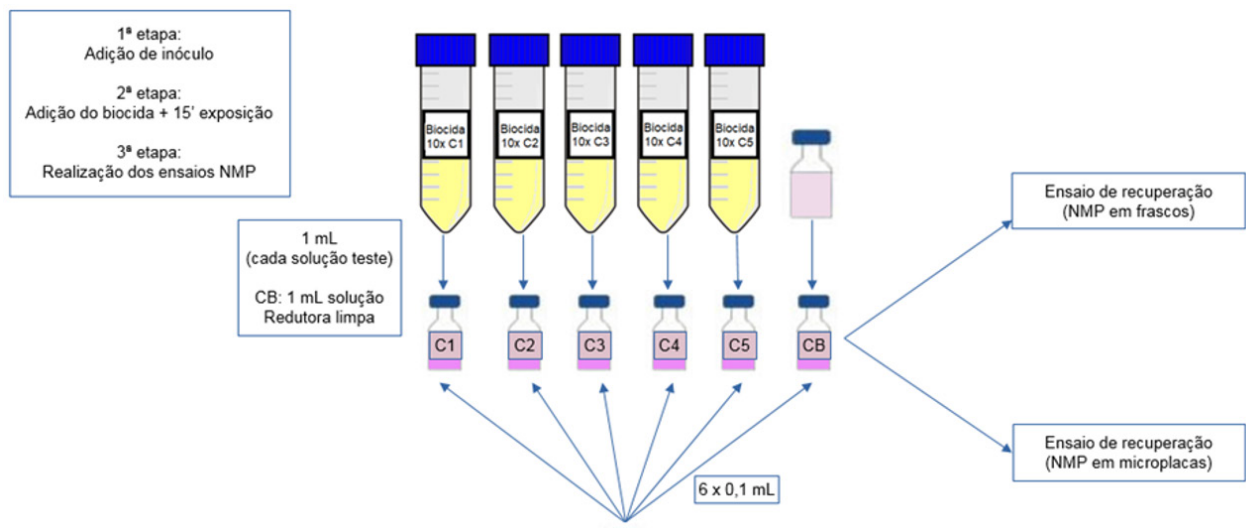
Tabela 1 - Condições utilizadas nos ensaios.

| |
|--|
| Linhagens |
| <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998 (T = 55°C) |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (T = 30°C) |
| Meios de Cultura |
| Postgate E Modificado (POSTGATE, 1984) |
| Meio ATCC nº 42 para espécies <i>Desulfovibrium</i> (ATCC, 2022) |
| Meio DA (NAKAO et al., 2009) |
| Meio DA modificado |
| Biocidas |
| Glutaraldeído, grau I (10, 25, 50, 100 e 250 mg/L) |
| Sulfato de Tetra(hidroximetil)fosfônio – THPS (10, 25, 50, 100 e 350 mg/L) |
| 2-Metil-4-Isotiazolin-3-Ona (25, 50, 75, 100 e 500 mg/L) |

Fonte: elaborado pelos autores.

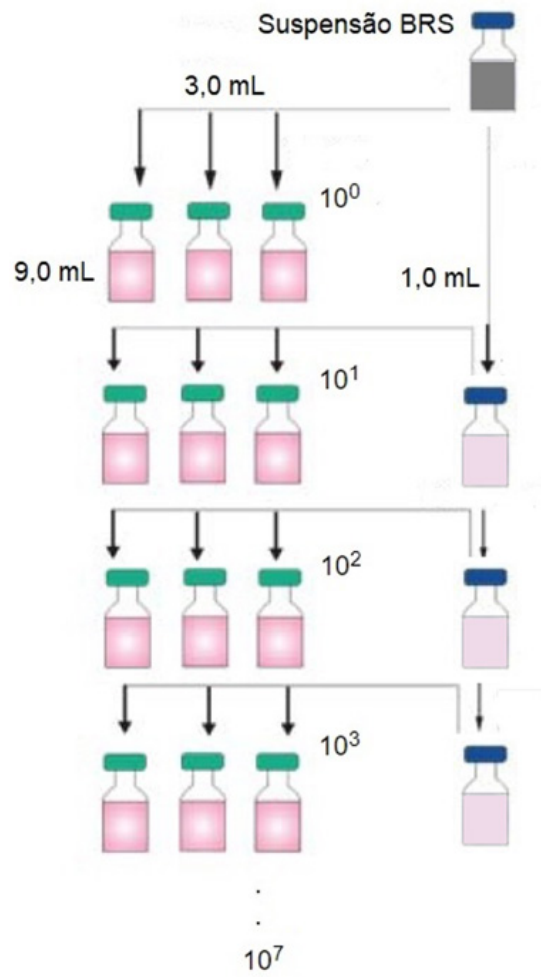
Os ensaios foram realizados com o método de NMP convencional em triplicata de frascos (HARRIGAN, 1998) e com o método de NMP em microplacas de 96 poços incubadas em jarra sob anaerobiose produzida por sistema Gaspak® a 30°C por até 7 dias, até a diluição de 10⁶ (NEUMANN, 2012). Todos os produtos foram avaliados em 5 concentrações mais um controle (sem tratamento), determinadas a partir da sua concentração inibitória mínima teórica descrita pelo fabricante. O tempo de contato das linhagens microbianas com os biocidas foi de 15 minutos, e imediatamente após a exposição foi realizada a quantificação de NMP pelos métodos descritos. As **figuras 1, 2 e 3** apresentam os esquemas utilizados nas atividades executadas.

Figura 1 - Esquema da avaliação de atividade antibacteriana.



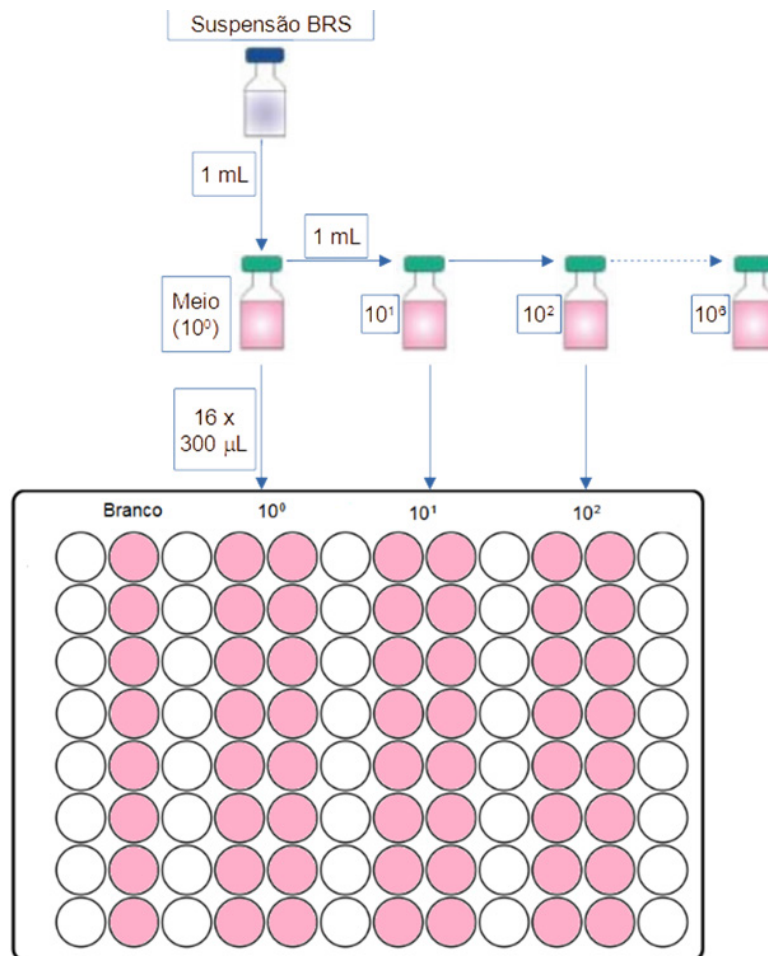
Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 2 - Esquema da Diluição do NMP em frascos.



Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 3 - Esquema da Diluição do NMP em microplacas.



Fonte: adaptado de Neumann (2012).

Os ensaios conduzidos avaliaram a possibilidade de redução do tempo de incubação em meios de cultura adequados para quantificar as BRS de maneira mais rápida como também otimizar o espaço físico necessário para incubação, com o uso de microplacas de 96 poços em comparação ao uso de frascos de 10 mL, baseado em trabalhos anteriores (BAUTISTA *et al.*, 2016; ASTUTI, PURWASENA e PUTRI, 2018).

3 Resultados e discussão

A avaliação biocida do THPS realizada por quantificação de NMP em frascos com o meio DA modificado apresentou as concentrações de 100 e 350 mg/L do produto THPS como inibitórias para o microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans*, com destaque para a inibição total do microrganismo frente a 350 mg/L, uma vez que não houve recuperação de microrganismo viável nos ensaios de NMP. Quando utilizado o meio DA nas quantificações do NMP, a inibição observada ocorreu a partir de 50 mg/L, e novamente a concentração 350 mg/L apresentou inibição completa.

Ao aplicar o uso do cultivo NMP em microplacas, a recuperação do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* somente apresentou resultados consistentes com o meio DA modificado para atestar atividade antibacteriana para o THPS pelo método NMP em microplacas. A inibição do microrganismo foi completa nas concentrações de 100 e 350 mg/L, com o detalhe de que foi possível confirmar um maior valor da carga de inóculo utilizado no ensaio ($3,2 \times 10^8$ NMP/mL), quando comparado ao método conduzido em frascos ($9,8 \times 10^6$ NMP/mL).

Os valores encontrados estão coerentes com os resultados obtidos em trabalhos anteriores, que apresentam este valor como responsável na redução de 3 ordens de grandeza na população de bactérias planctônicas e sésseis (DOW CHEMICAL CONTROL, 2009; LAVANIA *et al.*, 2011).

As **tabelas 2 e 3** apresentam os valores de contagens obtidos para a espécie *Desulfovibrio desulfuricans* pelos 2 tipos de ensaio de NMP, enquanto que as **figuras 4 e 5** apresentam os gráficos comparativos de populações BRS recuperadas em todas as condições.

Tabela 2 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 frente ao biocida THPS pelo ensaio de NMP em frascos, após 7 dias de incubação.

| Meio de Cultura | Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL) | | | | | |
|-----------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| | Controle (0 mg/L) | 10 | 25 | 50 | 100 | 350 |
| DA Modificado | $9,8 \times 10^6$ | $8,3 \times 10^6$ | $9,3 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^6$ | $8,3 \times 10^1$ | Não Detectado |
| DA | $4,6 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ | $2,5 \times 10^1$ | $1,5 \times 10^1$ | Não Detectado |

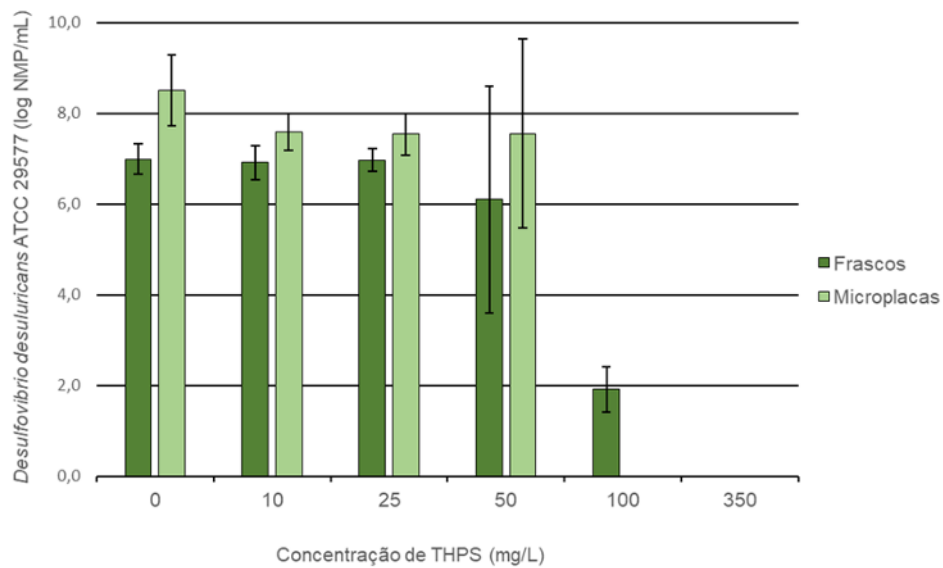
Fonte: elaborado pelos autores.

Tabela 3 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 frente ao biocida THPS pelo ensaio de NMP em microplacas, após 7 dias de incubação.

| Meio de Cultura | Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL) | | | | | |
|-----------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Controle (0 mg/L) | 10 | 25 | 50 | 100 | 350 |
| DA Modificado | $3,2 \times 10^8$ | $3,9 \times 10^7$ | $3,4 \times 10^7$ | $3,5 \times 10^7$ | Não Detectado | Não Detectado |
| DA | $9,3 \times 10^8$ | $2,9 \times 10^8$ | $2,9 \times 10^8$ | $2,9 \times 10^8$ | $9,3 \times 10^7$ | $2,9 \times 10^8$ |

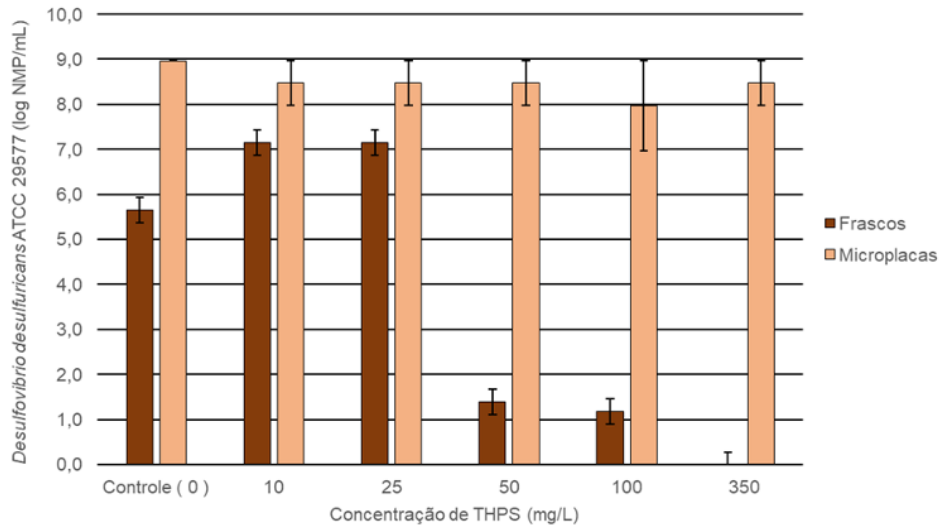
Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 4 – Avaliação do biocida THPS frente a *Desulfovibrium desulfuricans* no meio DA modificado (7 dias de incubação).



Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 5 – Avaliação do biocida THPS frente a *Desulfovibrium desulfuricans* no meio DA (7 dias de incubação).



Fonte: elaborado pelos autores.

O produto THPS apresentou resultados de inibição frente a *Desulfotomaculum nigrificans* em todas as concentrações avaliadas do THPS nos 3 meios de cultura usados na avaliação. Porém, não foi possível evidenciar uma concentração mínima inibitória do produto frente a este microrganismo pelo método de quantificação de NMP em microplacas com os meios Postgate E modificado e DA modificado. No caso do meio ATCC 42, foi possível evidenciar inibição completa do microrganismo na concentração de 350 mg/L. Não foi possível constatar ação antibacteriana nas demais concentrações avaliadas, uma vez que os valores de carga microbiana observados na exposição frente ao THPS a 10, 25, 50 e 100 mg/L apresentaram-se na mesma ordem de grandeza do valor observado na condição controle. Os resultados estão apresentados na **TABELA 4**.

Tabela 4 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 19998 frente ao biocida THPS pelo ensaio de NMP em microplacas, após 7 dias de incubação.

| Meio de Cultura | Concentração THPS (mg/L) / <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ATCC 19998 (NMP/mL) | | | | | |
|-----------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Controle (0 mg/L) | 10 | 25 | 50 | 100 | 350 |
| Postgate E Modificado | $7,7 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^4$ | $3,9 \times 10^4$ | $1,6 \times 10^4$ | $5,6 \times 10^4$ | $5,6 \times 10^4$ |
| DA Modificado | $1,7 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^3$ | $9,5 \times 10^3$ | $4,7 \times 10^3$ | $5,5 \times 10^3$ |
| Meio ATCC n° 42 | $1,6 \times 10^4$ | $3,9 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^4$ | $1,6 \times 10^4$ | Não Detectado |

Fonte: elaborado pelos autores.

Par ao produto glutaraldeído, foi realizado ensaio de avaliação da atividade frente ao microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* com a metodologia de quantificação de NMP em microplaca. Os resultados estão apresentados na TABELA 5.

Tabela 5 – Resultados da avaliação da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 frente ao biocida glutaraldeído pelo ensaio de NMP em microplacas, após 7 dias de incubação.

| Meio de Cultura | Concentração glutaraldeído (mg/L) / <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 29577 (NMP/mL) | | | | | |
|-----------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Controle | 10 | 25 | 50 | 100 | 350 |
| DA Modificado | $9,2 \times 10^8$ | $9,2 \times 10^8$ | $9,2 \times 10^8$ | $9,2 \times 10^8$ | $9,2 \times 10^8$ | $1,3 \times 10^3$ |
| DA | $9,3 \times 10^7$ | $5,6 \times 10^7$ | $5,6 \times 10^7$ | $6,9 \times 10^7$ | $4,6 \times 10^4$ | Não Detectado |

Fonte: elaborado pelos autores.

Foi possível observar inibição do microrganismo *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 a partir da concentração de 100 mg/L do glutaraldeído, valor este que se encontra de acordo com os dados encontrados na literatura frente aos microrganismos *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas*, também caracterizados como BRS. Cabe destacar que já foi observado que o glutaraldeído pode apresentar inibição a partir de baixos valores de concentração (25 mg/L) para este microrganismo, devido às suas propriedades físico-químicas que permitem auto-polimerização e reticulação das moléculas citoplasmáticas (LAVANIA et al., 2011; STRUCHTEMEYER, MORRISON e ELSHAHED, 2012).

Nos ensaios realizados não foram observados resultados de inibição do produto isotiazolona frente ao microrganismo *Dessulfovibrio dessulfuricans* ATCC 29577. É possível que o produto tenha interagido com os componentes da solução redutora usada como ambiente de ensaio, de modo a inativá-lo e assim permitindo a recuperação total da carga bacteriana usada no ensaio (WILLIAMS e SCHULTZ, 2015). O fato da avaliação do NMP em microescala não ter apresentado resultados após contato com a isotiazolona não significa que o método não serve para este produto biocida em especial. Um estudo mais aprofundado a respeito das interações dos compostos da classe das isotiazolonas precisa ser realizado antes de estabelecer a aplicação da metodologia de NMP em microplacas para suas avaliações.

A possibilidade de utilização do método em menor escala para quantificação de microrganismos em altas diluições nos testes de avaliação de biocidas abre uma perspectiva para a obtenção de respostas mais rápidas na rotina de controle da corrosão promovida pelas BRS para a tomada de decisões quanto ao produto mais adequado para utilização.

4 Conclusões

Os resultados obtidos permitem considerar como opção viável a adoção de contagens de NMP em microplaca como alternativa para validação de produtos biocidas de uso em campo. Os biocidas THPS e glutaraldeído apresentaram resultados de inibição comparáveis ao usar métodos distintos de recuperação e contagem de BRS viáveis, com a concentração de 100 mg/L do biocida THPS observada como a mínima inibitória quando realizada a exposição por 15 minutos e posterior quantificação do NMP da população viável recuperada com incubação de 7 dias nos meios selecionados e identificados como “DA” e “DA modificado”, em ambas as escalas selecionadas para a avaliação. O produto glutaraldeído apresentou resultados de inibição dos microrganismos nas concentrações de 100 mg/L e 250 mg/L nas mesmas condições de exposição e incubação, com a diferença de que este resultado foi verificado principalmente com uso dos meios de cultura “Postgate E Modificado”, “DA Modificado” e “ATCC 42 Medium”. Não foram observados resultados de inibição para o produto Isotiazolona nos ensaios realizados. Estudos futuros podem contribuir para a consolidação da metodologia em menor escala para avaliação de biocidas ou mesmo quantificação de microrganismos na rotina de monitoramento de corrosão com e com economia de tempo e insumos.

5 Agradecimentos

Fica o agradecimento ao IPT pela oportunidade de realizar a pós-graduação que gerou este trabalho, mediante Programa Interunidades em Biotecnologia (IPT-USP-Butantan), à Fundação de Apoio ao IPT (FIPT) pelo apoio financeiro disponibilizado para as atividades do projeto e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) e de Vazão (LV) na rotina de ensaios e tratamento de resultados.

6 Referências

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). **Consulta geral à Homepage**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

ARAÚJO, L. *et al.* Efeito de biocidas na corrosão induzida microbiologicamente do aço duplex em água de produção de petróleo. **Corrosão e Protecção de materiais**, v. 32, n. 4, p.108-114, out/nov/dez. 2013. Disponível em <https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros_Prot_Mater_Vol32_n4_2013.pdf>. Acesso em 30 jan. 2023.

ASSOCIATION FOR MATERIALS PROTECTION AND PERFORMANCE. **TM0194-2014-SG**: Field monitoring of bacterial growth in oil and gas systems. Houston, 2014. 31 p.

ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I. A.; PUTRI, F. Z. Potential of biosurfactant as an alternative biocide to control biofilm associated biocorrosion. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 104-111, 2018. Open Access, disponível em: <[doi: 10.3923/jest.2018.104.111](https://doi.org/10.3923/jest.2018.104.111)>. Acesso em 30 jan. 2023.

BARTLETT, K.; KRAMER, J. Comparative performance of industrial water treatment biocides. In: CORROSION CONFERENCE AND EXPO, Houston, 2011. **Proceedings...** Red Hook: Curran Associates, Inc., p. 11399, 2011.

BAUTISTA, L. F. *et al.* Assessment of biocides and ultrasound treatment to avoid bacterial growth in diesel fuel. **Fuel Processing Technology**, v. 152, p. 56 – 63, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.06.002>>. Acesso em 30 jan. 2023.

DOW CHEMICAL CONTROL. **AQUCAR™ THPS 75 Water Treatment Microbiocide Antimicrobial for Industrial Water Treatment**. 2009 Disponível em: <<http://www.ben-cide.co.kr/data/AQUCAR%20THPS.pdf>>. Acesso em 30 jan. 2023.

HARRIGAN, W.F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3rd Ed., San Diego, California, 1998.

KOCH, G. *et al.* **International Measures of Prevention, Application, and Economics of Corrosion Technologies (IMPACT) Study**. 216p., 2016. Disponível em: <<http://impact.nace.org/documents/Nace-International-Report.pdf>>. Acesso em 30 jan. 2023.

LAVANIA; M. *et al.* Efficacy of natural biocide on control of microbial induced corrosion in oil pipelines mediated by *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 8, p. 1394–1402, Aug. 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9)>. Acesso em 30 jan. 2023.

LITTLE, B. J. *et al.* Microbially influenced corrosion - Any progress? **Corrosion Science**, v. 170:108641, 17 p., July 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2020.108641>>. Acesso em 30 jan. 2023.

NAKAO, K. *et al.* Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* isolates from humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5308–5311, Dec. 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/AAC.00630-09>>. Acesso em 30 jan. 2023.

NEUMANN, B. **Avaliação de nova metodologia para detecção de microrganismos redutores de sulfato (MRS) aplicada à indústria de petróleo e gás**. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2012.

POSTGATE, J.R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, England, 1984.

RODRIGUES, T. *et al.* Diversidade de microrganismos relacionados com a biocorrosão no sistema óleo e gás. **Corrosão e Protecção de materiais**, v. 32, n. 4, p.108-114, out/nov/dez. 2013. Disponível em <https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/01/Corros_Prot_Mater_Vol32_n4_2013.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.

STRUCHTEMEYER, C. G.; MORRISON, M. D.; ELSHAHED, M. S. A critical assessment of the efficacy of biocides used during the hydraulic fracturing process in shale natural gas wells. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 71, p. 15-21, July 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.013>>. Acesso em 30 jan. 2023.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L.K. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n.7, p. 896-900, Oct. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.002>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

WILLIAMS, T. M.; SCHULTZ, C. M. Effect of environmental parameters on the stability and performance of oil and gas biocides. In: SPE **International Symposium on Oilfield Chemistry**, The Woodlands, April 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.2118/173782-MS>>. Acesso em 30 jan. 2022.

ZAMORA, A. C.; MALAVER, N. Methodological aspects for the culture and quantification of heterotrophic sulfate-reducing bacteria. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 32, n. 2, p. 121-125, May 2012. Disponível em: <http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/download/4811/4622>. Acesso em: 30 jan. 2023.

10.29327/2152495.8.23-2

