

# Práticas de Produção Agrícola e Conservação Ambiental

Tayronne de Almeida Rodrigues  
João Leandro Neto  
(Organizadores)



**Atena**  
Editora  
Ano 2019

Tayronne de Almeida Rodrigues  
João Leandro Neto  
(Organizadores)

# Práticas de Produção Agrícola e Conservação Ambiental

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Lorena Prestes  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
P912	Práticas de produção agrícola e conservação ambiental [recurso eletrônico] / Organizadores Tayronne de Almeida Rodrigues, João Leandro Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-557-0 DOI 10.22533/at.ed.570192308  1. Agroecologia – Pesquisa – Brasil. 2. Meio ambiente – Pesquisa – Brasil. 3. Sustentabilidade. I. Rodrigues, Tayronne de Almeida. II. Leandro Neto, João.  CDD 630
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

Práticas de Produção Agrícola e Conservação Ambiental esta obra aborda maneiras de conciliar a restauração e conservação do meio ambiente através do uso de práticas de extensão rural e tecnologias agrícolas aplicadas a pecuária, que juntamente com a agricultura é considerada fundamental ao desenvolvimento econômico quando há altos níveis de investimentos financeiros. Esta obra remonta também os cuidados ambientais a serem adotados na produção agrícola e procura a viabilização da mesma.

Dentro das temáticas trabalhadas é possível constatar a modernização intensa e a expansão da produção plural em nosso país, as plantações que atendem a pecuária, juntamente com a agricultura ocupam cerca de 30% do Brasil, segundo EMBRAPA. Portanto, vale ressaltar e fazer menção no que diz respeito as propriedades indígenas e outras unidades de conservação merecem uma legislação ambiental com real eficácia que resguardem os seus direitos.

Endossamos que a concretização deste *e-book* proporcionara mais dados para as pesquisas científicas realizadas dentro das temáticas da produção agrícola e áreas afins. Fazemos votos de excelente leitura!

Tayronne de Almeida Rodrigues  
João Leandro Neto

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
VALORAÇÃO ECONÔMICA DOS IMPACTOS AMBIENTAIS DA CITRICULTURA NO MUNICÍPIO DE RIO PRETO DA EVA (AMAZONAS/BRASIL)	
José Barbosa Filho Diogo Del Fiori Thales Henrique Almeida Nunes Valdeci Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5701923081</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>23</b>
COMPARAÇÃO DAS MEDIDAS CORPORAIS ENTRE FÊMEAS NULÍPARAS E PLURÍPARAS EM GADO DE CORTE	
Luciana da Silva Leal Karolewski Marcella Brendha Wacelechen Alana Cristine de Sousa Elaine Alaides Eidam José Luis Moletta	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5701923082</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>29</b>
PRODUÇÃO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	
Bárbara Ruivo Válio Barretti Adriane Almeida Gonçalves Leandro Inagaki Oshiro Alessandra Cristine Novak Sydney Luiz Gustavo Lacerda Eduardo Bittencourt Sydney	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5701923083</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>42</b>
LEVANTAMENTO PRELIMINAR DA COMERCIALIZAÇÃO DE JAVALIS ( <i>Sus scrofa</i> ) E SEUS HÍBRIDOS ATRAVÉS DA INTERNET_ CARACTERIZAÇÃO DO COMÉRCIO EM UM SITE DE GRANDE ACESSO	
Luis Enrique Dias Wisniewski Verônica Oliveira Vianna	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5701923084</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>44</b>
EXTENSÃO RURAL NA REGIÃO NORDESTE PARAENSE: AVALIAÇÃO DAS PRINCIPAIS PROBLEMÁTICAS EXISTENTES NO MEIO RURAL, TATAJUBA, VISEU-PA	
Alasse Oliveira da Silva Aline Oliveira da Silva Isabelle Caroline Bailosa do Rosário Elegi Teresinha Dias da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5701923085</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>51</b>
EFEITO DO PESO CORPORAL E DO SCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL NO PERÍMETRO ESCROTAL E NA BIOMETRIA TESTICULAR DE BOVINOS DE CORTE	
Luciana da Silva Leal Karolewski Naiara Valério Marcella Brenda Wacelechen Gilmara Antoniacomi	

José Luis Moletta

DOI 10.22533/at.ed.5701923086

**CAPÍTULO 7 ..... 56**

ANÁLISE DE IMAGENS DE SEMENTES DE SOJA UTILIZANDO ALGORITMO OTSU PARA CÁLCULO DO LIMiar ÓTIMO

Jaqueline Rissá Franco

Keila Sandrino

Rosane Falate

DOI 10.22533/at.ed.5701923087

**CAPÍTULO 8 ..... 63**

RELAÇÃO ENTRE O COMPORTAMENTO SEXUAL E AS MEDIDAS TESTICULARES DE TOUROS DE CORTE

Luciana da Silva Leal Karolewski

Ana Luara Rodrigues

Dayane Cheritt Batista

Naiara Valério

Gilmara Antoniacomi

José Luis Moletta

DOI 10.22533/at.ed.5701923088

**CAPÍTULO 9 ..... 68**

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICROORGANISMO ENVOLVIDO EM PROCESSO DE BIOCORROSÃO

Lillian Roberta Vieira da Rosa

Natan Wiele

Paloma Borges de Paula

Mariely Cristine dos Santos

José Carlos Alves Galvão

Juliana Vitória Messias Bittencourt

DOI 10.22533/at.ed.5701923089

**CAPÍTULO 10 ..... 79**

ANÁLISE DA SITUAÇÃO FUNDIÁRIA DE LOTES RURAIS LOCALIZADOS NAS ESTRADAS VICINAIS ZF-1 E ZF-2 E DIAGNOSTICO SOCIOECONÔMICO DO RAMAL ZF-1, INSERIDOS NO DISTRITO AGROPECUÁRIO DA SUFRAMA, PARA SUBSIDIAR TOMADA DE AÇÃO PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL DA REGIÃO

Cleiton dos Santos Gama

DOI 10.22533/at.ed.57019230810

**CAPÍTULO 11 ..... 93**

REVISÃO SISTEMÁTICA PARA A SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOCOSURFACTANTE

Arthur Baldomero Taques

Shelen Ponchielli Thomaz

Mariely Cristine dos Santos

Mariana Machado Fidelis Nascimento

Juliana Vitória Messias Bittencourt

DOI 10.22533/at.ed.57019230811

**SOBRE OS ORGANIZADORES..... 102**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 103**

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMO ENVOLVIDO EM PROCESSO DE BIOCORROSÃO

### **Lillian Roberta Vieira da Rosa**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Departamento de Tecnologia em Alimentos de  
Ponta Grossa – Paraná

### **Natan Wiele**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia de Ponta Grossa – Paraná

### **Paloma Borges de Paula**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia de Ponta Grossa – Paraná

### **Mariely Cristine dos Santos**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia de Ponta Grossa – Paraná

### **José Carlos Alves Galvão**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Departamento de Física em  
Ponta Grossa – Paraná

### **Juliana Vitória Messias Bittencourt**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia de Ponta Grossa – Paraná

**RESUMO:** A corrosão é a deterioração físico-química de um material ocasionado por reações químicas ou eletroquímicas. Quando o processo corrosivo tem a atuação de microrganismos é conhecido como biocorrosão. A biocorrosão pode acarretar sérios problemas de desempenho de

processos e altas perdas econômicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar um dos microrganismos participantes na biocorrosão de tubulações de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Para isso, corpos de prova (CP) de aço carbono SAE-1010, aço inox AISI-304 e aço galvanizado foram imersos no meio corrosivo da ETE para avaliação dos desempenho desses materiais quanto ao processo de biocorrosão e para isolamento dos microrganismos causadores deste tipo de deterioração. Os CPs foram incubados em caldo BHI e esfregados com *swabs* que foram imersos em água peptonada 0,1%. Depois de homogeneizada, a solução foi plaqueada em pour plate em meio PCA. Obteve-se o isolamento de 150 microrganismos onde, por semelhanças morfológicas, selecionaram-se 37 linhagens. Os microrganismos foram cultivados em meios específicos para biocorrosão (BANHT, BFHT, BPF, BRS). Realizou-se coloração de Gram e constatou-se a presença duas espécies Gram negativas na forma de bacilos e cocos. Ao realizar o isolamento, conseguiu-se manter a viabilidade de apenas uma delas. Da espécie isolada, extraiu-se o DNA, amplificou-se a região 16S por PCR e purificou-se o produto da amplificação. O DNA sequenciado foi comparado com o banco de dados do NCBI. Na identificação molecular foi possível chegar ao nome da família Enterobacteriaceae. Esse dado

é importante para o desenvolvimento de métodos de controle para esse microrganismo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biocorrosão, *Enterobacteriaceae*, taxonomia molecular.

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM INVOLVED IN A BIOCORROSION PROCESS

**ABSTRACT:** Corrosion is the physicochemical deterioration of a material due to chemical or electrochemical reactions. When the corrosive process has the performance of microorganisms, it is known as biocorrosion. Biocorrosion can lead to serious process performance problems and high economic losses. Therefore, the objective of this study was to identify one of the microorganisms involved in the biocorrosion of water pipes from Sewage Treatment Stations (STWs). To do that, specimens of SAE-1010 carbon steel, AISI-304 stainless steel and galvanized steel were immersed in the STWs's corrosive culture growth medium to evaluate the performance of these materials in the biocorrosion process and in the isolation of the causative microorganisms of this type deterioration. The specimens were incubated in BHI broth and wiped with swabs that were immersed in 0.1% peptone water. After homogenization, the solution was cultivated on pour plate in PCA medium. There were isolated 150 microorganisms where, by morphological similarities, 37 lines were selected. The selected microorganisms were cultivated in specific culture mediums for biocorrosion (BANHT, BFHT, BPF, BRS). Gram staining of the species were made and two Gram-negative species in the form of bacilli and coccus were found. By isolating the two species, we were only able to maintain the viability of one of them. From the isolated species, the DNA was extracted, the 16S region amplified by PCR and the amplification product purified. The DNA was sequenced and compared to the NCBI database. By the molecular identification, it was possible to identify only the family *Enterobacteriaceae*. This data is important for the development of control methods for this microorganism.

**KEYWORDS:** Biocorrosion, *Enterobacteriaceae*, molecular taxonomy.

## 1 | INTRODUÇÃO

A corrosão constitui-se como um processo orgânico, espontaneamente encontrado em diversos tipos de superfícies, o que representa um dos principais fatores de perdas econômicas no setor industrial. Em geral, os processos reacionais responsáveis pelo desencadeamento da corrosão são voluntários, de caráter químico, eletroquímico ou eletrolítico e tendem a modificar as características físico-químicas dos materiais (FELIPE, 2013).

Dentro desses processos encontra-se a corrosão influenciada por microrganismos, também conhecida como biocorrosão (FELIPE, 2013). Seu principal processo reativo acontece a partir da formação de biofilme, consistindo na aderência de bactérias às superfícies de um material, formando um consórcio bem estruturado onde vários grupos microbianos podem ser encontrados. Os grupos de microrganismos

presentes nestes biofilmes podem ser capazes de influenciar intensamente, através de seu metabolismo, o processo corrosivo, visto que a biocorrosão é muitas vezes resultado da interação entre a superfície do metal e produtos abióticos de corrosão, células microbianas e seus excrementos (SOUZA, 2010).

Há uma variedade ampla de organismos, mecanismos, e microrganismos que podem estar envolvidos na biocorrosão, o que pressupõe que seus efeitos podem ser característicos. Exemplos de efeitos característicos são a oxidação de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , a produção de ácidos orgânicos ou aparição de células de aeração diferencial pela formação de tubérculos de coloração específica, ou o aparecimento de irregularidades no biofilme (SANT'ANA, 2009).

Para a constatação dos microrganismos presentes que estão envolvidos no processo biocorrosivo faz-se necessário o isolamento desses microrganismos e a obtenção de culturas puras. No entanto, estes microrganismos, como por exemplo Bactérias redutoras de sulfato (BRS), Bactérias oxidantes de enxofre e as Bactérias oxidantes de ferro, demandam condições específicas para o seu crescimento, tornando mais difícil a sua identificação e classificação taxonômica (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000).

A classificação e detecção destes microrganismos, todavia, pode ser agilizada por meio do emprego de tecnologias de identificação molecular. A identificação molecular pode ser realizada a partir do DNA extraído de microrganismos presentes em materiais submetidos ao processo de biocorrosão, como as superfícies de metal de corpos de provas (CPs) e/ou de equipamentos. O DNA obtido então é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde terá um fragmento alvo, determinado por iniciadores específicos, amplificado para que se identifique quais são os microrganismos presentes nas amostras. Logo, torna-se possível identificar mais rapidamente quais são as bactérias responsáveis por influenciar a corrosão destes materiais (DEVEREUX et al., 1992).

A identificação precisa de microrganismos é fundamental para diversos pilares mundiais. Além de questões relacionadas à saúde pública e patogenia dos microrganismos, a minimização de gastos ocasionados por perdas e a otimização de processos industriais torna necessário que utilizem-se cada vez mais técnicas que possam assegurar a identidade de uma linhagem presente em determinado ambiente. Desta forma, a identificação molecular de microrganismos surgiu como forma de complementar e agilizar os processos taxonômicos.

O uso de técnicas moleculares facilita a classificação dos organismos além de diminuir a heterogeneidade dentro dos grupos de classificação, e, devido a sua alta sensibilidade, diferenciam mesmo pequenas variações que existam entre espécies próximas de microrganismos (CANADA, 2017).

Cada microrganismos têm sua diferente região conservada, sendo utilizadas diferentes técnicas para melhor abranger suas especificidades e identificá-las. O sequenciamento da região genômica 16S do rRNA de aproximadamente 500 pares

de base, é o método molecular mais empregado para a identificação de bactérias aeróbias e anaeróbias, visto que permite a classificação de uma ampla variedade desses microrganismos (RELLER; WEINSTEIN; PETTI, 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento de microrganismos relacionados ao processo biocorrosivo de tubulação de água, para sua posterior identificação molecular através do sequenciamento da região genômica 16S do rRNA.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

A amostragem do presente trabalho foi obtida com a exposição de corpos de prova (CPs) metálicos de carbono SAE 1010, aço inox AISI 304 e aço galvanizado ao meio corrosivo de estação de tratamento de esgoto, os quais foram retirados do efluente após sua imersão por um período de 30 dias para o isolamento de microrganismos.

### 2.2 Isolamento

Para a recuperação das células microbianas viáveis, o material foi submerso em caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) pelo período de 72h a 30° C. Após a incubação, os CPs foram assepticamente retirados do tubo para realização de um esfregaço com *swab* que posteriormente foi imerso em água peptonada 0,1%. A solução com o *swab* foi homogeneizada em vortex por 30 segundos até sua turbidez, sendo, em seguida, plaqueada em meio *Plate Count Agar* (PCA) pelo método *pour plate* e incubado a 30°C por 48h.

Dos microrganismos isolados, selecionaram-se as linhagens que poderiam ser classificadas morfológicamente como microrganismos diferentes. Os microrganismos selecionados foram então cultivados nos seguintes meios sólidos específicos para biocorrosão: meio Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT), Bactérias Facultativas Heterotróficas Totais (BFHT), Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Precipitantes de Ferro (BPF).

Nos meios BRS e BANHT utilizou-se resazurina 0,025% como indicador de oxidação. Concomitantemente, nos meios BFHT e BPF foram empregados como indicadores o citrato de ferro e citrato de ferro amoniacal respectivamente. A incubação foi novamente a 30° C por 72h.

As colônias desenvolvidas foram transferidas para uma solução diluente específica e depois semeadas até a diluição  $10^8$  nos mesmos meios sólidos específicos para biocorrosão. Foi realizada coloração de Gram para todas as linhagens de

microrganismos obtidas até então.

## 2.3 Extração De Dna

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi adaptada a partir do protocolo estabelecido por Moreira et al. (2010).

O microrganismo foi cultivados em 10 mL de caldo BHI sob temperatura de 30°C por 24 horas. Após crescimento, a cultura foi homogeneizada em vórtex e 1,5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para um microtubo do tipo eppendorf que foi submetidos a centrifugação por 1 minuto a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 450  $\mu$ L de CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), agitado em agitador de bandeja por 1 minuto e colocado em banho ultrassônico com gelo por 1 minuto e 30 segundos. O precipitado foi ressuspensionado novamente em 300  $\mu$ L de CTBA e solubilizado em banho-seco por 20 minutos a 65°C. Em seguida, foram adicionados 750  $\mu$ L de clorofórmio e o tubo foi agitado por 5 minutos em agitador de bandeja, sendo centrifugado por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para o outro tubo eppendorf e acrescentou-se etanol 96% (1:2) gelado, homogeneizando por inversão suavemente, incubando o tubo a -20°C por 30 minutos. A solução foi então centrifugada por 7 minutos a 12000 rpm e a fase líquida foi descartada. Ao precipitado foram adicionados 750  $\mu$ L de etanol 70% gelado e novamente centrifugou-se por 7 minutos a 12000 rpm. Após, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 50  $\mu$ L de água ultrapura e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose à 0,8%, submetidos a uma voltagem de 70 v por 30 minutos, corado com brometo de etídio (2 $\mu$ g/mL) por 15 minutos e sendo visualizado em Transluminador

## 2.4 Amplificação do Dna

Para a realização do sequenciamento, o DNA extraído foi submetido a PCR, para amplificação do segmento dos genes 16S rDNA, utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (fD1 - AGAGTTTGAAATCCTGGCTCA) e (rD1 - AAGGAGGTGATCCAGCC).

A reação de PCR foi realizada em termociclador. As reações de amplificação foram preparadas num volume de 25  $\mu$ L, contendo 13,4  $\mu$ L de água ultrapura, 2,5  $\mu$ L de tampão da enzima Taq DNA polimerase, 2,0  $\mu$ L de dNTP's, 1,5  $\mu$ L de cloreto de magnésio - MgCl<sub>2</sub>, 0,6  $\mu$ L de cada *primer* e 0,4  $\mu$ L de Taq Polimerase e 3  $\mu$ L de DNA. As condições de amplificação foram de 4 minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, e à 72°C por 1 minuto, em uma extensão final de 4 minutos a 72°C

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose de 1,4% por aproximadamente 40, utilizando 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio (2 $\mu$ g/mL) durante 15 minutos e fotografado, e foto

documentado em Transluminador. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb para estimativa do tamanho dos produtos de PCR.

## 2.5 Purificação do Dna

Com o objetivo de eliminar os resíduos de reagentes da reação de PCR (iniciadores e dNTP's) realizou-se uma purificação com o polímero PEG 8000 (Polietilenoglicol grau molecular), que foi adicionado ao microtubo de 0,2 mL com quantidade proporcional ao volume do produto da PCR (25  $\mu$ L). O microtubo foi incubado a 37°C por 30 minutos e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos, onde, após o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma micropipeta. Foram adicionados 125  $\mu$ L de etanol 80% gelado ao tubo, centrifugando-o em seguida a 13.000 rpm por 2 minutos. Novamente utilizou-se uma micropipeta para descartar o sobrenadante e adicionou-se 125  $\mu$ L de etanol 96% gelado que foi retirado logo em seguida. Em banho-seco, evaporou-se o restante do etanol 96%, ressuspensando o DNA purificado em 15  $\mu$ L de água ultrapura e, por fim, deixando-o a 37°C por 30 minutos em banho-seco.

## 2.6 Sequenciamento

O produto de PCR purificado foi preparado para o envio conforme recomendações da Myleus Biotechnology ([www.myleus.com](http://www.myleus.com)), responsável pelo sequenciamento da amostra. Após 7 dias, receberam-se duas sequências complementares referentes ao sequenciamento da bactéria, as quais foram tratadas com o software Bioedit e, em seguida comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a recuperação das células viáveis presentes nos corpos de prova cedidos, isolaram-se 150 colônias que acreditavam-se a princípio pertencer a microrganismos diferentes, descritas por cor e tamanho. Em comparação entre os aspectos morfológicos das colônias, foi possível isolar 37 linhagens, eliminando as que possuíam aspectos iguais.

As 37 linhagens foram cultivadas em meios específicos para isolamento de microrganismos envolvidos em biocorrosão. Para a realização das análises de seleção e quantificação foi necessário a elaboração de dois meios diluentes aos quais, três dos quatro grupos, as BRS, BANHT e BFHT utilizavam o meio diluente contendo tioglicolato de sódio, ácido ascórbico, resazurina e cloreto de sódio. Conforme observado por Rodrigues (2010) a utilização deste diluente para os grupos mencionados tinha relação com a melhor visualização das reações de redução, já

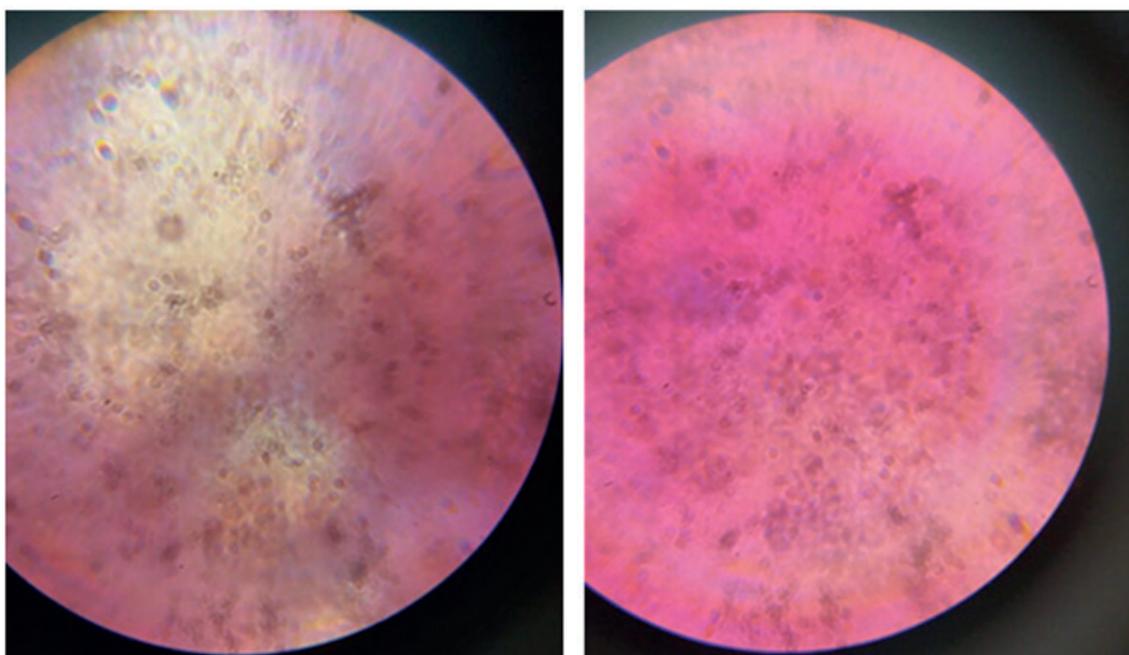
que para a formulação do meio era necessário a solução de resazurina para que se observa-se a oxidação.

Os meios sólidos utilizados continham determinados compostos específicos para cada grupo microbiológico, no entanto, ambos possuíam a suplementação do meio com resazurina, o que facilitava a análise de morfologia de colônias.

Mediante o isolamento e a seleção dos microrganismos envolvidos em biocorrosão obtiveram-se colônias puras de dois microrganismos, sendo estas de coloração esbranquiçada e em formato de grão de arroz quando crescidas em meios específicos de biocorrosão. Os dois microrganismos foram constatados como linhagens que obtinham crescimento sinérgico.

Por meio da técnica da coloração de Gram, descobriu-se que tratavam-se de dois microrganismos Gram-negativos. Segundo a metodologia de Gram, microrganismos que possuem parede celular com maior concentração de lipídeos favorecem a permanência da coloração rósea em suas paredes. A técnica se divide em etapas de pigmentação e repigmentação, sendo elas: a pigmentação com violeta genciana, tratamento com iodo, a descoloração com álcool acetona e pigmentação com fucsina.

Entende-se que a parte do processo que trata as bactérias com o álcool, extrai os lipídios, resultando em uma porosidade ou permeabilidade aumentada da parede celular das bactérias gram negativas pois as mesmas possuem maior quantidade de lipídios. Consequentemente afirma-se que quando comparadas bactérias gram negativas com Gram positivas, as bactérias Gram positivas, apresentam paredes celulares mais finas, o que sugere que, durante o processo de coloração, a pigmentação primária ocorra com maior facilidade. Logo podemos afirmar que, conforme Barbosa e Barbosa (2010), o microrganismo encontrado é classificado como Gram negativo, pois, após o processo de coloração permaneceu com coloração rósea, conforme evidenciamos na figura 1.



A corrosão microbiologicamente influenciada (CIM) que ocorre na presença de microrganismos degradantes de determinados tipos de nutrientes e excretam metabólitos que afetam a estabilidade das ligas metálicas, através de modificações estruturais como transformações de sulfatos a sulfetos, sulfitos, oxidação de íons ferrosos em íons férricos, assim como a formação de precipitados insolúveis de óxidos ou hidróxidos de ferro (SOUZA DE LIMA, 2010).

Como abordado anteriormente, o processo corrosivo quando causado por microrganismos é de responsabilidade de um grande grupo de organismos que convivem entre si trabalhando em conjunto e possibilitando o desenvolvimento mútuo. Dos microrganismos isolados no presente trabalho não foi possível manter as duas linhagens finais viáveis após seu isolamento completo. Isso pode ser justificado pelo fato de que a linhagem sobrevivente, através do seu metabolismo, poderia produzir compostos que ajudassem a manter a outra linhagem viva enquanto essas viviam em um consórcio. Portanto, seguiu-se com a identificação molecular de apenas um dos microrganismos.

Por meio da comparação com as sequências depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI, encontrou-se mais de um nome como provável identificação, impossibilitando a sua classificação a nível de espécie com 100% de precisão. Com os dados obtidos, pode-se afirmar que o micro-organismo pertence à família *Enterobacteriaceae*. A região amplificada utilizada para a taxonomia molecular da linhagem foi a região genômica 16S do rRNA, definida pelos iniciadores utilizados na reação de PCR.

Segundo Janda e Abbot (2007), outros autores também enfrentaram dificuldades ao empregar o sequenciamento da região 16S na identificação de gênero e espécie de determinados grupos de micro-organismos, dentre eles, os micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como aconteceu no presente trabalho.

Ainda segundo esses autores, esses problemas podem estar associados a fatores como: as novas classificações e/ou alterações de nomenclatura e taxonomia de bactérias e os valores de similaridade entre a sequência obtida com as sequências depositadas no banco de dados de nucleotídeos. Logo, quando existe uma pontuação de semelhança muito exorbitante entre as sequências, acaba havendo uma dificuldade em estabelecer uma resposta definitiva, principalmente na distinção de espécies separadas recentemente (JANDA E ABBOT, 2007).

Outros genes podem ser utilizados para melhor diferenciação entre espécies, principalmente entre aquelas que compartilham identidades completamente similares de sequência (MILLER, RHODEN, 1991).

Todavia, o presente resultado corrobora com Bermont-Bouis e seus

colaboradores (2007) que, ao identificarem microrganismos envolvidos no processo biocorrosivo de aço carbono, também encontraram como resultado organismos da família *Enterobacteriaceae*, pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Proteus*. Todavia, sua identificação foi por meio de métodos de cultivos e não molecular. Correia et al. (2010) também encontraram bactérias da família *Enterobacteriaceae* enquanto investigavam microrganismos causadores de biocorrosão.

Souza de Lima (2010) relata que as características do processo biocorrosivo decorrem da incidência comum do grupo bacteriano em ambientes naturais como participantes de consórcios microbianos mistos, onde mantém crescimento sinérgico com bactérias aeróbias e facultativas, visto que para suprir as necessidades nutritivas as redutoras de sulfato contam com os produtos resultantes dos metabolismos presentes no consórcio, além de possuírem baixa tolerância a oxigênio, o que permite que outros grupos como os aeróbias e facultativas consumam o mesmo, tornando o meio anaeróbio, o que o torna propício para o desenvolvimento das redutoras de sulfato.

Assim sendo, o ideal seria identificar todos os organismos atuantes no consórcio como um todo de forma a entender o papel de cada um deles no processo e conseguir classificá-los taxonomicamente com êxito.

A corrosão de materiais causa danos de alto valor para os por esta prejudicados. De acordo com dados obtidos na literatura, cerca de bilhões de dólares são gastos por diversos nichos de indústrias para reverter problemas oriundos de biocorrosão. O total previsto de despesas causado pela corrosão metálica seja ela biótica ou abiótica nos Estados Unidos representou próximo de 3,1% do produto interno bruto no ano 2002, o correspondente a cerca de 276 bilhões de dólares. Esses custos têm origens variadas e podem estar associados a suspensão no funcionamento das instalações para substituição de estruturas corroídas ou limpezas, manutenção e troca de elementos filtrantes ou de medição, retirada de sedimentos biológicos em sistemas de armazenamentos, tubulações e outros. Considera-se que em torno de um terço desse valor poderia ser economizado com uso de matérias primas mais resistentes à corrosão biótica (CORREA et al., 2013).

Este prejuízo com relação a biocorrosão não ocorre apenas em dutos de passagem de efluentes, água tratada ou em hidrelétricas. A corrosão microbiologicamente influenciada atinge desde equipamentos de diversas indústrias a pontes parcialmente submersas em água. Dessa maneira vários âmbitos da sociedade são afetados por estas reações oxidativas, desde a como a economia, a saúde e segurança pública.

No Brasil, embora não seja realizado levantamentos específicos, comumente adota-se cerca de 3,5% do Produto Interno Bruto com corrosões microbiologicamente influenciadas, o que corresponde a cerca de R\$45 milhões de reais (SOUZA DE LIMA, 2010).

De modo a prevenir os elevados custos devido ao processo de degradação dos

materias por biocorrosão, torna-se necessário adotar medidas de controle contra a ação dos metabólitos desses microorganismos causadores da biocorrosão. Dentre as alternativas está a implantação de materiais resistentes aos produtos metabólicos expelidos por esses microrganismos, assim como métodos de controle que evitem a formação de biofilme.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio de técnicas de isolamento e identificação de microorganismos, foi possível a identificação ao nível de família de uma espécie de bactéria envolvida no processo biocorrosivo dos corpos de prova analisados. Esta linhagem pertence à família *Enterobacteriaceae*, já citada em outros estudos como envolvida em biocorrosão. Sugere-se para outros trabalhos a identificação das espécies em forma de consórcio para que linhagens e informações importantes não sejam perdidas durante o isolamento dos organismos. Com a maior identificação das espécies envolvidas será possível o desenvolvimento de métodos de controle que evitem o desenvolvimento dos biofilmes.

#### REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Flávio Henrique Ferreira; BARBOSA, L. P. J. L. **Alternativas metodológicas em Microbiologia-viabilizando atividades práticas**. Revista de Biologia e Ciências da terra, v. 10, n. 2, p. 134-143, 2010.
- BERMONT-BOUIS, D.; JANVIER, M.; GRIMONT P. A.; DUPONT, I.; VALLAEYS, T. et al. **Both sulfate-reducing bacteria and Enterobacteriaceae take part in marine biocorrosion of carbon steel**. Journal Of Applied Microbiology, [s.l.], v. 102, n. 1, p.161-168, jan. 2007. Wiley.
- CANADA. **T-4-126 – Identification and taxonomic classification of microorganim(s) represented for use as suplementes inder the Fertilizers Act**. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/trade-memoranda/t-4-126/eng/1346524491267/1346527009874>>. Acesso em: 05 mai., 2019.
- CORREIA, A.; ORNELAS, S.S.; NÓBREGA, Y.; SEGOVIA, J. F. O.; BEZERRA, R. M.; GONÇALVES, M. C. A.; SILVEIRA, D.; DINIZ, S. P. S. S.; KANZAKI, L. I. B. **Identificação de Microorganismos Isolados de Corrosão em Estruturas Metálicas da Usina Hidroelétrica Coaracy Nunes/Amapá e Possível Forma de Controle Utilizando Plantas Medicinais**. In: VII Congresso de Inovação Tecnológica em Energia Elétrica (VII CITENEL), Rio de Janeiro, Brazil, 2013.
- CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; BEZERRA, R. M.; GONÇALVES, M. C. A.; ORNELAS, S. S.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; DINIZ, S. P. S. S.; KANZAKI, L. I. B. **Aerobic and Facultative Microorganisms Isolated from Corroded Metallic Structures in a Hydroelectric Power Unit in the Amazon Region of Brazil**. Air, Soil And Water Research, [s.l.], v. 3, p.113-121, jan. 2010. SAGE Publications.
- DALY, K., R. J. SHARP, e A. J. McCARTHY. **Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulphate-reducing bacteria**. Microbiology, 146. p. 1693-1705, 2000.
- DEVEREUX, R.; KANE, M. D.; WINFREY, J.; STAHL, D. A. Genus- and groupspecific hybridization probes for determinative and environmental studies

of sulfatereducing bacteria. System Applied Microbiology. v. 15, p. 601-609, 1992.

FELIPE, Maria Beatriz MC et al. **Aspectos gerais sobre corrosão e inibidores vegetais**. Revista Virtual de Química, v. 5, n. 4, p. 746-759, 2013.

JANDA, J. M.; ABBOT, S. L. **16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls**. J Clin Microbiol. v. 45, n. 9. p. 2761–2764, 2007.

Miller, J. M.; Rhoden, D. L. **Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification**. Journal of Clinical Microbiology, v. 29, n. 6, p. 1143-1147, 1991.

MOREIRA, M., NOSCHANG, J., NEIVA, I.F., CARVALHO, Y., HIGUTI, I.H., VICENTE, V.A. **Methological variations in the isolation of genomic from**

**Streptococcus bacteria**. Brazilian Archives of Biology and Technology. v.53, n.4, p.845-849, 2010.

RELLER, L. B.; WEINSTEIN, M. P.; PETTI, C. A. **Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing**. Clinical Infectious Diseases. v. 44, n. 8, p. 1108–1114, 2007.

RODRIGUES, Tatiana de Campos. **Efeito do Potencial de Proteção Catódica Sobre a Biocorrosão de Aço-Carbono em Solo Contendo BRS**. 2011.

SANT'ANA, G, S. **Monitoramento microbiológico e físico-químico de tanques de armazenamento de óleo e água**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

SOUZA DE LIMA, Edivania et al. Biocorrosão: sinergismo microbiano e influência nas características de corrosão e propriedades mecânicas do aço carbono aisi 1010. 2010.

## ÍNDICE REMISSIVO

### B

Biocorrosão 69, 78

Biossurfactantes 93, 100, 101

### C

Citricultura 6, 1, 20

Coleção Microbiológica 94, 95, 96, 98, 99

### D

Distocia 23

### E

Enterobacteriaceae 68, 69, 75, 76, 77

### F

Fungicultura 29

### I

Impactos Ambientais 6, 1, 20

### M

Monitoramento Ambiental 79

### P

Produção Agrícola 2, 5

Puberdade 63

### R

Reprodução 23, 27, 55, 63

### S

Saúde 48, 50

Substrato 29

SUFRAMA 7, 79, 80, 81, 82, 83, 85, 90, 91, 92

### T

Testículos 63

Touros 64

### V

Valoração Econômica 6, 1, 5, 20

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-557-0

