Copyright 2008, ABRACO
Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2008, em Recife/PE, no mês de maio de 2008.
As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Estudo preliminar da adesão de microrganismos em diferentes superfícies metálicas imersas em água de lavagem de usina de açúcar e álcool.

Márcia Teresa Soares Lutterbach[1], Ana Lúcia Oliveira[2], Elisa Machado[2], Luciana Contador[2], Viviane de Oliveira[2]

Abstract

Adhesion of microorganisms to solid surfaces and subsequent biofilm development leads to very serious problems in industrial water systems: flow velocity decrease, heat exchangers efficiency reduction, induction of deterioration and corrosion, increased maintenance costs etc. Different microorganisms are involved in the corrosion process being SRB (sulfate-reducing bacteria) pointed as the group responsable for the worst biocorrosion cases**.** The present work evaluates the adhesion of SRB cells to surface of metal cupons (carbon steel, cooper, austenitic stainless steel AISI-304 and ferric stainless steel UNS-439 and AISI-444) exposed to waste water from the sugar cane and alcohol industry. The metal coupons were immersed in the industrial water, which contained, among other microorganisms, iron oxidizing bacteria, IOB, (10^6 MPN/mL) and SRB (10^9 MPN/mL), assays with supplementary addition of microorganisms were also performed. Our results suggest a preference of SRB cells adhesion to carbon steel surfaces. The stainless steel UNS-439 presented the lower cell adhesion when immersed in waste water with addition of SRB. When IOB were added to the assay, the stainless steel AISI-304 presented the bests results. Further studies are necessary to better understand the interactions between SRB and IOB and their effect on the biofilm formation and corrosion process.

Resumo

A adesão de microrganismos a superfícies e a subseqüente formação de biofilmes ocasionam inúmeros problemas para sistemas de águas industriais, como por exemplo, redução de vazão, perda da eficiência em trocadores de calor, biodeterioração, biocorrosão e aumento no custo de manutenção. Diversos microrganismos estão envolvidos em processos de corrosão, sendo as bactérias redutoras de sulfato (BRS) freqüentemente associadas aos casos mais graves de biocorrosão. O presente trabalho avalia a adesão de células de BRS à superfície de biocupons metálicos (aço carbono; cobre; aços inox ferríticos UNS-439 e AISI-444 e aço inox austenítico AISI-304), submetidos à água de lavagem de usina de açúcar e álcool. Foram realizados ensaios de imersão nesta água, que continha, entre outros microrganismos, 10^6 NMP/mL de ferrobactérias e 10^9 NMP/mL de BRS e também ensaios com adição suplementar de microrganismos (BRS e ferrobactérias). Os resultados indicam a preferência de adesão das BRS ao aço carbono. Nos bioensaios realizados na água e na água com adição de BRS, o aço UNS-439 apresentou os melhores resultados, ou seja, menor adesão de BRS. Quanto aos ensaios com ferrobactérias adicionadas sozinhas ou em conjunto com as BRS, o aço AISI-304 apresentou um biofilme com menor quantidade de BRS. Outros estudos devem ser realizados a fim de se estudar a interação de BRS e ferrobactérias no biofilme e no processo corrosivo.

Palavras-chave: aço inox, biocupom, biofilme, BRS

[1] Doutora, Gerente do LABIO - INT
[2] Bolsitas do LABIO - INT

Introdução

A indústria sucroalcooleira desempenha um importante papel na economia do Brasil. A estimativa de produção de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira para safra de 2007/2008 é de 475,07 milhões de toneladas. A produção nacional de açúcar deve ser de 29,65 milhões de toneladas. A produção de álcool está estimada em 20,88 bilhões de litros, correspondendo a um aumento de 19,53% em relação à safra anterior (1). O setor de açúcar e álcool movimenta cerca de 6% do PIB. O aumento das demandas internacionais e o crescimento da tecnologia *flexfuel* (motores de combustíveis flexíveis) devem impulsionar o crescimento da de etanol.

Durante o processo de produção de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar, várias etapas estão sujeitas a problemas relacionados à corrosão e à biocorrosão (2). Para minimizar os desgastes e a perda de equipamentos, o aço inoxidável tem sido cada vez mais utilizado na indústria sucroalcooleira.

Os mecanismos da biocorrosão variam de acordo com a variedade fisiológica dos microrganismos envolvidos. Entre os principais grupos bacterianos tradicionalmente associados à biocorrosão encontram-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (3) e as bactérias oxidantes de ferro (ferrobactérias) (4). Estes microrganismos podem coexistir em biofilmes e contribuir para o processo biocorrosivo de forma sinergética (5).

As BRS são consideradas o grupo bacteriano responável pelos piores casos de corrosão metálica em ambientes anaeróbicos (6-9). No entanto, a ação das BRS no processo corrosivo não se restringe às condições anaeróbicas. Estudos sugerem que as condições mais agressivas associadas às BRS ocorrem em ambientes não totalmente anaeróbicos, mas em ambientes onde o oxigênio pode estar presente de tempos em tempos (10). As BRS podem sobreviver sob condições aeróbicas quando associadas ao crescimento de bactérias aeróbicas que leve à depleção de oxigênio (11). BRS sobrevivem e podem contribuir a problemas de corrosão em ambientes com presença de oxigênio (12).

O presente estudo analisou a adesão de BRS em cinco tipos de metal diferentes: cobre; aço carbono; aço inox AISI 304; aço inox UNS 439 e aço inox AISI 444. Para os ensaios de imersão foi utilizada água de lavagem de cana de açúcar.

Metodologia

1. Análise microbiológica da água utilizada nos ensaios

Foram conduzidas análises microbiológicas na água de lavagem de cana de açúcar para os microrganismos tradicionalmente associados aos processos de biocorrosão. A quantificação foi realizada de acordo com a técnica do número mais provável (13) em meios específicos para bactérias aeróbicas (caldo nutriente, incubação de 48 horas), bactérias oxidantes de ferro (caldo citrato férrico amoniacal, incubação de 14 dias), bactérias anaeróbicas (meio fluido ao tioglicolato, incubação de 28 dias) e bactérias redutoras de sulfato (14).

A partir dos cultivos realizados para quantificação, foram isoladas cepas bacterianas para o banco de cepas do LABIO.

2. Preparo das suspensões celulares

Para estimular o processo biocorrosivo, em alguns ensaios, foram adicionadas suspensões celulares de ferrobactérias e de BRS. As cepas utilizadas nesse estudo, LABIO 0002 (ferrobactéria) e LABIO 0004 (BRS) fazem parte do banco de cepas do LABIO e foram isoladas e purificadas a partir de amostras de produtos de corrosão.

Para o preparo das suspensões, as cepas, que estavam preservadas em DMSO a -80°C, foram descongeladas e inoculadas em meios de cultura (meio Postgate C para a BRS e caldo nutriente para a ferrobactéria). Após incubação a 30°C os cultivos foram centrifugados e os *pellets* foram ressuspensos em solução salina estéril, para separar as células do meio de cultura e concentrá-las.

Após a lavagem, as suspensões celulares foram adicionadas aos ensaios e analisadas para quantificação de sua concentração celular pela técnica do número mais provável. O protocolo de obtenção da suspensão celular encontra-se na Figura 1.

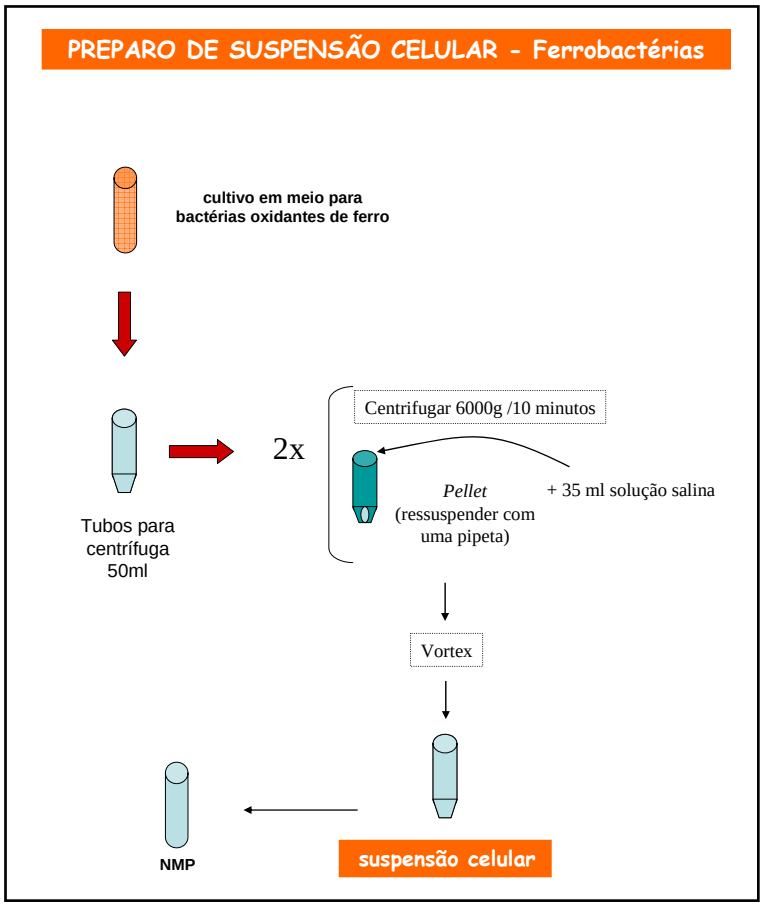

Figura 2 – Esquema do preparo da suspensão celular de ferrobactérias

3. Montagem do experimento

Os experimentos de imersão de biocupons metálicos em água de lavagem do processo foram montados de acordo com o protocolo a seguir.

Foram utilizados biocupons de cobre, aço carbono e aço inox (AISI 304; UNS 439 e AISI 444) (Figura 2).

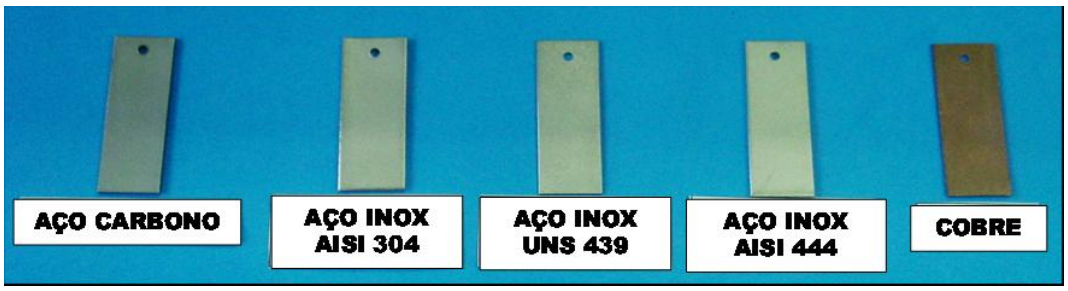

Figura 2 – Biocupons metálicos utilizados nos bioensaios.

Para cada tipo de biocupom um total de cinco frascos Erlenmeyers com 3 biocupons cada foram esterilizados em autoclave. Cada frasco recebeu 100mL da água de lavagem de cana-de -açúcar.

Um dos frascos (BRANCO) foi autoclavado imediatamente, outro recebeu apenas água (*água*) e outros três receberam respectivamente suspensão celular de ferrobactérias (*água + ferro*); de BRS (*água+ferro+BRS*) e ambas as suspensões celulares (água+BRS+ferro). Todos os Erlenmeyers ficaram incubados à temperatura de 30°C sob agitação constante.

Resultados

1. Análise microbiológica da água utilizada nos ensaios

A análise microbiológica realizada em amostra de água revelou uma elevada carga microbiana, com concentração de bactérias anaeróbicas acima do limite de detecção do método utilizado. A Tabela 1 apresenta os resultados das análises microbiológicas.

Tabela 1 – Número mais provável de bactérias por mL de água

Bactérias	NMP/mL
Aeróbicas	$3,6 \times 10^{8}$
Oxidantes de Ferro	$4,3 \times 10^{6}$
Anaeróbicas	$> 2,4 \times 10^{10}$
Redutoras de Sulfato	$1,5 \times 10^{9}$

2. Concentrações de ferrobactérias, de BRS e de sulfeto adicionadas aos ensaios

Foram adicionados aos bioensaios 10^{10} NMP/mL de ferrobactérias e 10^{6} NMP/mL de BRS. A Tabela 3 a seguir apresenta as concentrações de ferrobactérias, BRS e sulfeto total nas suspensões celulares e adicionadas aos bioensaios.

Tabela 2 - Concentrações de ferrobactérias, BRS e sulfeto dissolvido (da suspensão celular de BRS) nas suspensões celulares e adicionadas aos bioensaios

	Concentração na suspensão celular (NMP/mL)	Concentração final adicionada aos bioensaios em água do gasoduto		
		Água + BRS	Água + Fe	Água + BRS + Fe
Ferrobactérias	$2,4 \times 10^{12}$	-	$2,4 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$
BRS	$3,5 \times 10^{8}$	$3,5 \times 10^{6}$	-	$3,5 \times 10^{6}$

3. Análises microbiológicas ao final do experimento

Ao final do período de incubação, os cupons foram retirados dos ensaios. Os frascos Erlenmeyers apresentavam água na coloração de ferrugem. Os cupons apresentaram a formação de um filme de coloração ferruginosa, formado por adesão microbiana (biofilme) e/ou depósito abiótico (Figura 3). A Figura 4 apresenta a imagem do biofilme/produto de corrosão sobre o cupom obtida através de microscopia eletrônica de varredura.

Figura 3 - Cupom após ensaio de imersão, antes da raspagem.

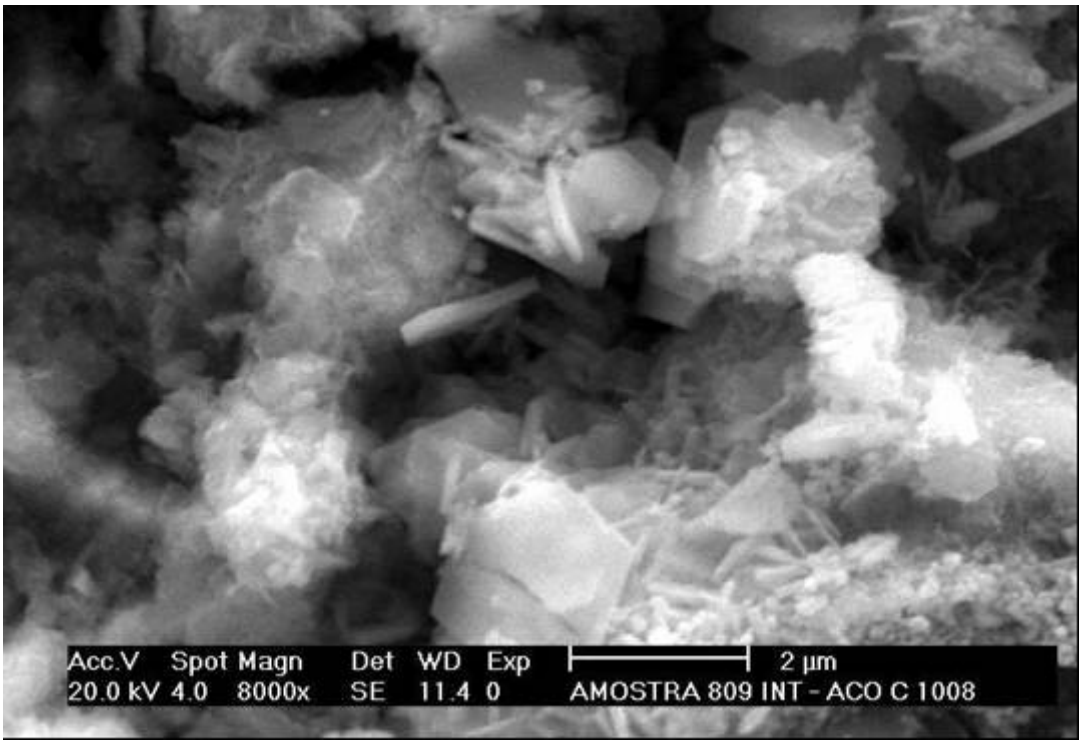

Figura 4 –Biofilme/produto de corrosão formados sobre biocupom de aço carbono após bioensaio de imersão em água de lavagem de cana-de-açúcar sem adição de microrganismos. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura.

Os filmes formados sobre os cupons foram removidos através de raspagem manual com espátulas estéreis e a concentração de BRS foi avaliada.

Os resultados das concentrações de BRS nos biocupons ao final dos diferentes bioensaios encontram-se na Tabela 3 e na Figura 5 a seguir.

Tabela 3 - Concentrações de BRS (NMP/cm^2) nos biocupons ao final dos bioensaios

Biocupons	Água estéril	Água	Água + BRS	Água + Fe	Água + BRS + Fe
Aço inox 304	ND*	$1,0 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
Aço inox 439	ND*	5,5 x 10	$3,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$
Aço inox 444	ND*	$7,7 \times 10^4$	$4,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$
Aço carbono	ND*	$8,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
Cobre	ND*	5,8 x 10	$1,4 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$

ND* - não detectável

O ensaio controle realizado em água de lavagem de cana-de açúcar estéril não apresentou crescimento microbiano (Tabela 3).

Os biocupons de cobre apresentaram as menores concentrações de BRS (10 NMP/cm^2) e os biocupons de aço carbono apresentaram os piores resultados, com maiores contagens de BRS (10^8 NMP/cm^2) (Tabela 3 e Figura 5).

Entre os aços inox, o aço UNS-439 apresentou a menor adesão de BRS para os ensaios em água e com adição de BRS. Quando as ferrobactérias foram adicionadas sozinhas ou em conjunto com as BRS, o aço AISI-304 apresentou o biofilme com menor quantidade de BRS entre os aços inox analisados (Figura 5).

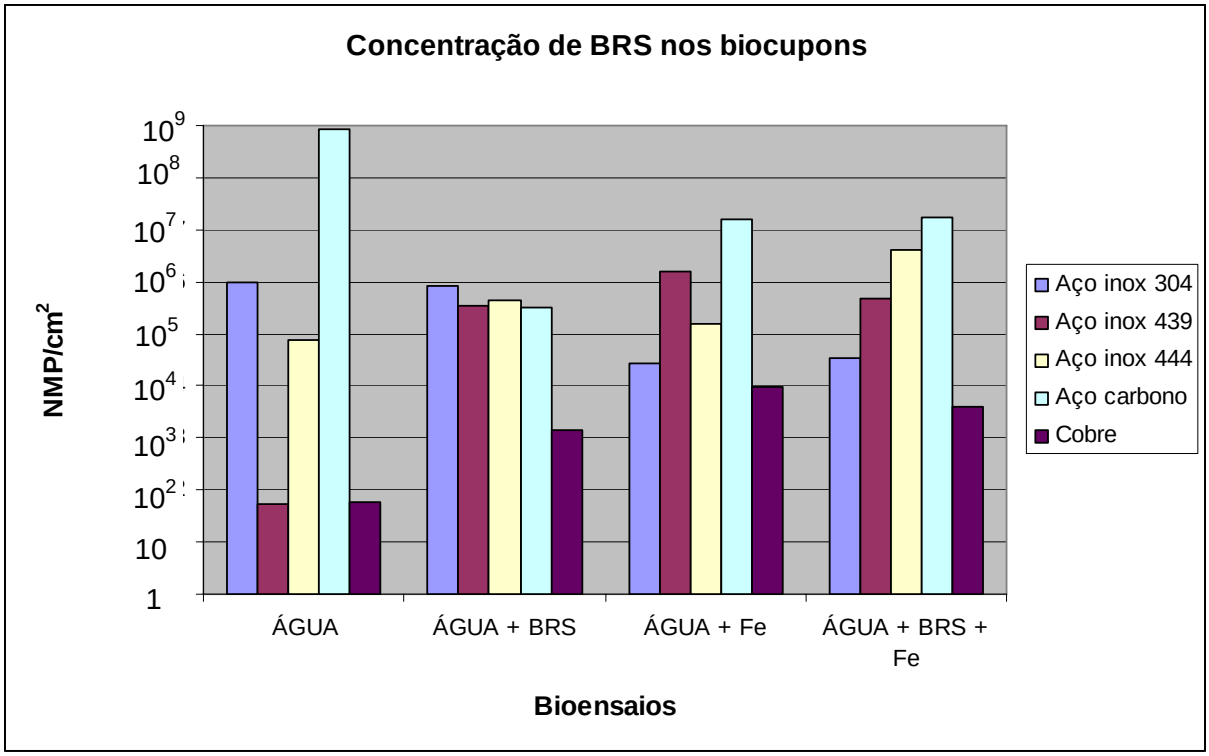

Figura 5 – Número mais provável de BRS nos diferentes biocupons metálicos ao final dos bioensaios realizados em água de lavagem de cana-de-açúcar; com e sem adição de microrganismos.

As diferenças observadas entre os resultados obtidos para a concentração de BRS nos biocupons após os ensaios com e sem a adição de ferrobactérias, podem indicar uma interação entre os dois grupos bacterianos.

O efeito sinergético da atividade metabólica das bactérias aeróbicas oxidantes de ferro e das BRS anaeróbicas foi observado por Felder e Stein (15) e por Xu e colaboradores (16). Outros estudos devem ser realizados a fim de se estudar a interação de BRS e ferrobactérias no biofilme e no processo corrosivo.

Conclusões

- ✓ Os biocupons de cobre apresentaram as menores contagens de BRS (10 NMP/cm^2).
- ✓ Foi observada uma preferência de adesão das BRS ao aço carbono (10^8 NMP/cm^2).
- ✓ Nos bioensaios realizados na água e na água com adição de BRS, o aço UNS-439 apresentou os melhores resultados, ou seja, menor adesão de BRS (Figura 5).
- ✓ O aço AISI-304 apresentou um biofilme com menor quantidade de BRS entre os cupons de aços inox testados para os bioensaios com adesão de ferrobactérias sozinhas ou em conjunto com as BRS (Figura 5).
- ✓ Outros estudos devem ser realizados a fim de se estudar a interação de BRS e ferrobactérias no biofilme e no processo corrosivo.

Referências bibliográficas

1. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar safra 2007/2008, terceiro levantamento, novembro/2007.** Companhia de Abastecimento. Brasília: Conab, 2007. 11p. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3lev-cana.pdf.

2. FERRAZ O.; SOUZA S. M. C.; ULLER L.; OLIVEIRA M.; ABUD, I. C. **Manual técnico de prevenção da corrosão em usinas de açúcar e destilarias de álcool.** . Rio de Janeiro. : MCT/INT. , 1988. . 160p.

3. HAMILTON, W.A. Sulphate reducing bacteria and anaerobic corrosion. **Ann. Rev. Microbiol.**, 39: 195-217, 1985.

4. OBUEKWE, C.O.; WESTLAKE, D.W.S.; PLAMBECK, J.A.; COOK, F.D. Corrosion of mild steel in cultures of ferric iron reducing bacterium isolated from crude oil I. polarization characteristics. **Corrosion**, 37 (8): 461-467, 1981.

5. DOWLING, N.J.E.; MITTELMAN, M.W.; WHITE, D.C. The role of consortia in microbially influenced corrosion. In: **Mixed Cultures in Biotechnology** eds. J.G. Zeikus, McGraw Hill, New York, 1991, p.†341-372.

6. CROMBIE, D.J.; MOODY, G.J.; THOMAS, J.D.R. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria. **Chem. Ind.** 21(6): 500-505, 1980.

7. PANKHANIA, I.P. Hydrogen metabolism in sulfate-reducing bacteria and its role in anaerobic corrosion. **Biofouling** 1:27-29, 1988.

8. FORD, T.; MITCHELL, R. **Advances in Microbial Ecology**. New York, N.Y.: Plenum Press, 1990.

9. HAO, O.J.; CHEN, J.M.; HUANG, L.; BUGLASS, R.L. Sulfate-reducing bacteria. **Critical Reviews in Environ. Sci. & Technol.** 26(1): 155-187, 1996.

10. HARDY, J.A.; BOWN, J.L. Sulfate-reducing bacteria: Their contribution to the corrosion process. **Corrosion** 40(12): 650-654, 1984.

11. SCOTT, P.J.B.; DAVIES, M. Microbiologically induce corrosion. **Civil engng.** 5:58-59, 1992.

12. Zhu, J.; Mackie, R.I.; Riskowski, G.L.; Day, D.L. Bacterial colonization on metal surfaces in animal buildings: Implication for microbial-induced corrosion. **Transactions of the ASAE** 37(3): 929-937, 1994.

13. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 19ª ed. Washington: APHA, 1998.

14. · Norma PETROBRAS – N-2463 - **DETECÇÃO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PLANTÔNICAS** M 20 abr/2006.

15. FELDER, C.M. ; STEIN, A.A. Microbiologically influenced corrosion of stainless steel weld and base metal – 4 year field test results. In: **Proceeding of Corrosion 1994**, Paper no. 275, NACE, Houston, TX, 1994.

16. XU, C; ZHANG, Y; CHENG, G.; ZHU, W. Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria. **Materials Science and Engineering: A** Volume 443, Issues 1-2, Pages 235-241, 2007.