

Copyright 2012, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2012, em Salvador/BA no mês de maio de 2012.

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

Diversidade de Microrganismos Relacionados à Biocorrosão em Amostras de Etanol

Viviane Oliveira^a, Mariana M. Galvão^a, Diogo A. Coutinho^a, Marcelo Araújo^b,
Gutemberg S. Pimenta^b, Márcia T. S. Lutterbach^a

Abstract

Ethanol is the most common alcohol and a renewable energy source that can be produced from biomass. Brazil and the United States are world leaders in ethanol production, using as raw material sugar cane and corn, respectively. In Brazil, ethanol is used as automotive fuel in two forms: hydrated, used in ethanol using cars and flex fuel cars or anhydrous alcohol, which is added to gasoline. Ethanol is capable of being metabolized by various microorganisms serving as a carbon source for them. Under favorable conditions, bacteria and fungi can form biofilms and participate actively in the process of biocorrosion. The presence of some microorganisms in the biofilms may enhance corrosion by the production of corrosive metabolites such as organic acids. Given the scarcity of studies in the area, this work aimed to study the diversity of microorganisms present in samples of ethanol in order to identify possible causes of the process of biocorrosion. For this, several samples of ethanol from different origins were received and analyzed by LABIO/INT since 2007. The main groups of cultivable microorganisms related to biocorrosion were quantified. Furthermore, analysis of non-cultivable microorganisms were performed using molecular biology techniques. The results allow a better assessment of the susceptibility of storage tanks and pipelines to microbiological corrosion in the presence of ethanol.

Keywords: biocorrosion, ethanol, cloning, *Acetobacter aceti*.

Resumo

O etanol é o mais comum dos álcoois sendo uma fonte de energia renovável que pode ser produzida através da biomassa. O Brasil e os Estados Unidos são líderes mundiais na produção de etanol, utilizando como matéria prima a cana e o milho, respectivamente. No Brasil o etanol é utilizado como combustível automotivo de duas formas: hidratado, usado em carros a álcool ou flex fuel e anidro, que é adicionado à gasolina. O etanol é capaz de ser metabolizado por diversos microrganismos servindo como fonte de carbono para os mesmos. Sob condições favoráveis, bactérias e fungos podem formar biofilmes e participar ativamente do processo de biocorrosão. A presença de alguns microrganismos em biofilmes pode intensificar a corrosão através da produção de metabólitos corrosivos como ácidos orgânicos. Dada a escassez de estudos na área, este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade de microrganismos presentes em amostras de etanol a fim de identificar possíveis causadores do processo de biocorrosão. Para isso, diversas amostras de etanol de diferentes origens foram recebidas e analisadas no LABIO/INT desde 2007. Foram feitas quantificações dos principais grupos de microrganismos cultiváveis relacionados à biocorrosão. Além disso, análise da diversidade de microrganismos não-cultiváveis através de técnicas de biologia molecular foi

^a Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação - Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI)

^b Petrobras

realizada. Os resultados obtidos permitem uma melhor avaliação da susceptibilidade de tanques de armazenamento e dutos de transporte à corrosão microbiana em presença de etanol.

Palavras-chave: biocorrosão, etanol, clonagem, *Acetobacter aceti*.

Introdução

O Brasil é o país mais avançado, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso do etanol como combustível, seguido dos EUA (1). Diferente do petróleo, que é um recurso finito, o etanol é um combustível de origem renovável normalmente produzido a partir de plantas cultivadas, como a cana-de-açúcar, o milho, a beterraba, o trigo e a mandioca. No Brasil, o etanol é produzido pela fermentação da cana-de-açúcar, uma das matérias-primas mais eficientes para a sua produção comercial.

A introdução de combustíveis contendo etanol e etanol anidro em sistemas de transporte e armazenamento tem representado um desafio adicional às indústrias. Como a água tem uma solubilidade muito elevada em etanol, o transporte por dutos pode resultar em da perda da octanagem do combustível além de deixar para trás quantidades residuais de etanol, água, e soluções orgânicas nas linhas. Esses compostos podem fornecer todos os nutrientes necessários para as comunidades microbianas, o que poderia levar ao desgaste da infraestrutura de transporte e armazenamento. O etanol pode ser igualmente susceptível a dissolver e incorporar impurezas presentes no interior de polidutos quando é transportado por esses sistemas.

O etanol pode servir como fonte de carbono em concentrações mais baixas para microrganismos aeróbicos e anaeróbicos (2). Sendo assim, a infra-estrutura que transporta e armazena combustíveis que contém etanol pode fornecer as condições e nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos: água, fonte de carbono, doadores de elétrons e receptores de elétrons. Ambientes que apresentem condições favoráveis ao crescimento microbiano estão susceptíveis à corrosão microbiologicamente induzida (CMI). A CMI já foi encontrada em ambientes aquosos, poços de petróleo e sistemas de transporte de combustíveis refinados (3).

Em estudo recente conduzido pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST), pesquisadores associaram o aumento da corrosão de dutos metálicos à presença da bactéria *Acetobacter aceti* em amostra de etanol (4). Essa bactéria é comumente encontrada em ambientes com etanol uma vez que ela é capaz de transformar o etanol em ácido acético o qual teria atuação direta sobre a corrosão dos materiais.

Uma vez que o etanol é produzido a partir de matérias-primas naturais, as quais apresentam uma grande variabilidade, o risco de CMI e biodegradação do combustível e de suas misturas é, talvez, mais elevado do que nos combustíveis convencionais. A fim de prevenir e controlar a ocorrência destes problemas é essencial uma melhor compreensão dos tipos de microrganismos encontrados no etanol. Dada a escassez de estudos sobre a microbiota presente no etanol combustível e a importância deste estudo para garantir a qualidade do produto desde a sua produção e armazenamento até o consumidor final, foram analisadas diversas amostras de etanol de diferentes origens com o objetivo de estudar e detectar microrganismos envolvidos em processos de biocorrosão.

Metodologia

Diversas amostras de etanol foram coletadas de diferentes origens e analisadas pelo Laboratório de Biorrosão e Biodegradação (LABIO/INT) desde 2007 (Tabela 1).

Tabela 1 – Amostras de etanol analisadas pelo LABIO

Amostra	Origem/característica	Coleta
Etanol de milho	Em Meio API	–
Etanol	A ser distribuído nos postos de combustível	1/12/2007
Etanol	Importado corado	–
Álcool PA Sigma-Aldrich	Ensaio controle	–
Etanol	Usina	9/11/2007
Etanol	Posto de gasolina	–
Etanol	Vagão - início da descarga	20/03/2011
Etanol	Vagão - final da descarga	20/03/2011
Etanol	Parque de bombas - início da operação	20/03/2011
Etanol	Parque de bombas - meio da operação	20/03/2011
Etanol	Parque de bombas - final da operação	20/03/2011
Etanol	Parque de bombas - Raspagem da linha - Final da operação	20/03/2011
Etanol	Linha - Refinaria	1/12/2010
Etanol de milho	Importado	1/12/2007
Etanol	Linha Terminal/Refinaria - início da operação	20/03/2011
Etanol	Linha Terminal/Refinaria - meio da operação	20/03/2011
Etanol	Linha Terminal/Refinaria - final da operação	20/03/2011

No laboratório as amostras de etanol foram inoculadas em diferentes meios de cultura a fim de quantificar os principais grupos de microrganismos cultiváveis envolvidos em processos de biorrosão (Tabela 2).

Tabela 2 – Meios de cultura usados na quantificação dos microrganismos

Meio de cultura	Microrganismo	Temperatura/tempo de incubação
Caldo nutriente	Bactérias aeróbicas	30°C/ 48 horas
Citrato Férrico Amoniacal	Bactérias precipitantes de ferro	30°C/ 14 dias
Meio Fluido ao Tioglicolato	Bactérias anaeróbicas	30°C/ 28 dias
Postgate E	Bactérias redutoras de sulfato (BRS)	30°C/ 28 dias

Além da inoculação direta no meio de cultura, 50 mL de cada amostra de etanol foram filtrados em membranas estéreis de PTFE (Millipore) com o intuito de concentrar o número de microrganismos presentes na amostra. Após a filtração, a membrana foi cortada em quatro com auxílio de bisturi estéril e inoculada nos meios de cultura acima descritos.

Com o objetivo de averiguar se a bactéria *Acetobacter aceti*, encontrada pelos pesquisadores do NIST em amostra de etanol também está presente nas amostras de etanol analisadas pelo LABIO, uma segunda membrana foi inoculada diretamente sobre uma placa de Petri contendo Agar Manitol, que é o meio específico para o isolamento da bactéria *A. aceti*.

O cultivo de microrganismos em laboratório não reflete as reais condições do ambiente, apenas uma minoria das bactérias é capaz de crescer em meios de cultivo, em amostras ambientais essa fração cultivável pode corresponder a menos de 1% do total de bactérias presentes (5, 6, 7). Técnicas que utilizam apenas o cultivo subestimam a complexidade das comunidades microbianas. Para contornar as desvantagens do cultivo, técnicas moleculares que dispensam o cultivo de microrganismos têm sido empregadas para caracterizar comunidades bacterianas, geralmente baseadas na sequência do gene codificador de rRNA 16S. O desenvolvimento e aplicação de métodos biomoleculares vêm permitindo grandes avanços no estudo da ecologia microbiana.

Com o objetivo de se estudar a diversidade de microrganismos não-cultiváveis presentes em amostra de etanol, uma amostra de etanol de milho foi escolhida. Uma alíquota de 50 mL dessa amostra foi filtrada em membrana PTFE com auxílio de uma bomba de vácuo. A membrana com os microrganismos retidos foi utilizada então para a extração do DNA genômico da comunidade utilizando um protocolo de lise enzimática das células seguida de purificação com fenol/clorofórmio e posterior precipitação do DNA com etanol (8).

O DNA extraído foi amplificado através do PCR do gene 16S rRNA utilizando-se primers universais para a região. O produto de PCR de cerca de 1.500 pb foi clonado no vetor pCR[®]2.1 (Invitrogen). Os clones foram sequenciados para identificação da diversidade de bactérias presentes na amostra (Figura 1).

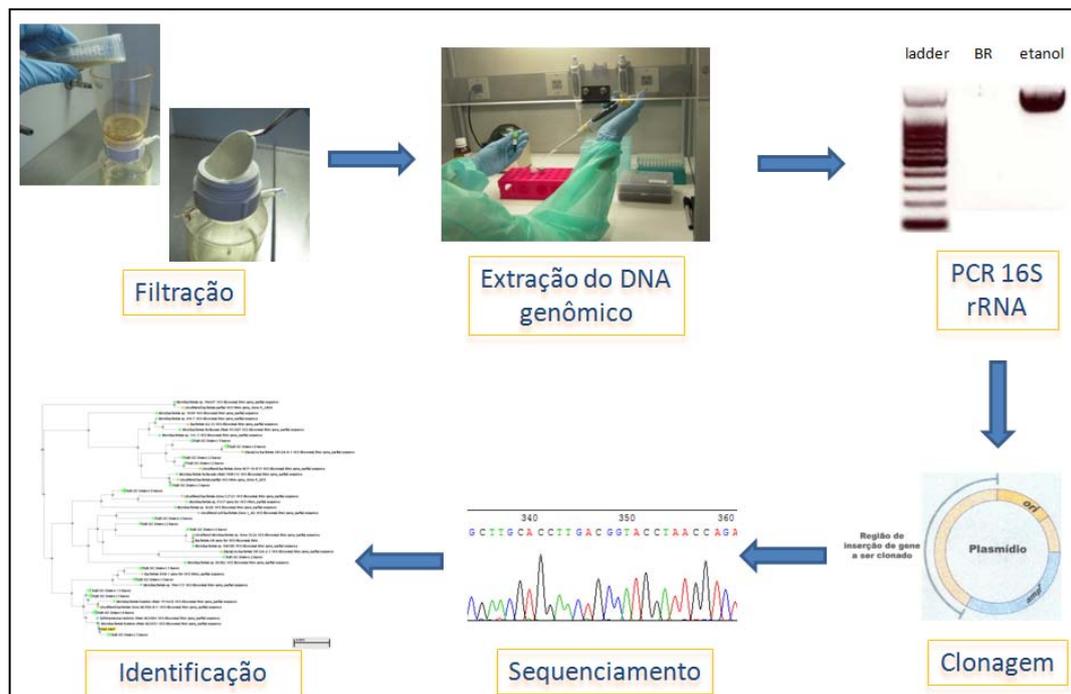


Figura 1 – Metodologia de análise da diversidade de microrganismos não-cultiváveis em amostra de etanol

A bactéria *Acetobacter aceti* foi adquirida de uma coleção de culturas para que fosse estudada a sua influência na corrosão de metais na presença de etanol. Para tanto, a bactéria foi inoculada em caldo MRS acrescido de 2% de etanol conforme instruções fornecidas pelo Instituto da qual ela foi adquirida. Concentrações crescentes de etanol foram adicionadas ao caldo a fim de adaptar a bactéria ao meio rico em etanol.

Resultados e discussão

Um total de 17 amostras de etanol foram analisadas ao longo de 5 anos pelo Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO). Essas amostras foram coletadas de diferentes pontos como usinas, terminais, vagões e postos de combustíveis com o objetivo de verificar a origem da contaminação do combustível.

Não foi observado crescimento de microrganismos em nenhuma das amostras analisadas. Em apenas uma amostra de etanol de milho foi possível isolar uma bactéria aeróbica. Essa bactéria foi identificada como *Staphylococcus epidermidis* através de sequenciamento genético. *S. epidermidis* é uma bactéria que faz parte da microbiota endógena humana (9). Desta forma, esse microrganismo não foi caracterizado como pertencente à amostra de etanol analisada e sim a uma contaminação antropogênica ocorrida provavelmente durante a coleta da amostra.

O fato de não ter sido observada a presença de microrganismos cultiváveis viáveis nas amostras de etanol não é surpreendente. Sabe-se que microrganismos que estão em um meio oligotrófico, ou seja, com baixa concentração de nutrientes, meios considerados agressivos e não favoráveis ao crescimento, quando são inoculados em meios de cultura ricos podem não crescer devido ao estresse imposto pela mudança de meio (10).

Uma vez que não foi possível detectar a presença de microrganismos cultiváveis nas amostras analisadas, optou-se pelo estudo da diversidade microbiana através do uso de técnicas moleculares. A técnica da clonagem foi empregada pois permite uma análise completa dos microrganismos presentes na mostra, inclusive dos não cultiváveis.

O resultado de identificação dos microrganismos encontrados na amostra analisada encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Microrganismos identificados através da clonagem da amostra de etanol

Clone	Similaridade	Identificação	Características
5	97%	<i>Pseudomonas putida</i>	Produtora de exopolissacarídeo
10 e 49	98%	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Capaz de degradar diversos compostos tóxicos como alguns encontrados em pesticidas
19	98%	<i>Burkholderia sp.</i>	Encontrada em néctar de flores
24	97%	<i>Sphingobium olei</i>	Microrganismo isolado de solo contaminado com óleo
29	98%	<i>Acinetobacter sp.</i>	Microrganismo relacionado à biodegradação e remoção de compostos tóxicos orgânicos e inorgânicos
43	98%	<i>Alcaligenes sp.</i>	Microrganismo capaz de crescer utilizando compostos como o fenol. Resistente a Hg ²⁺
50	99%	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bactéria comumente encontrada em solo, água e plantas. É uma bactéria de interesse na agricultura
58	98%	<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria amplamente encontrada em água potável em países subdesenvolvidos devido à cloração pobre
70	99%	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Espécie resistente à radiação

Dentre os microrganismos encontrados na amostra de etanol podemos citar a bactéria *Pseudomonas putida*. Essa bactéria é ubíqua, presente em uma grande variedade de ambientes e capaz de precipitar ferro, o que a torna uma ferrobactéria. Segundo Beech & Gaylarde (11),

esta bactéria é considerada uma das precursoras do processo de corrosão, uma vez que é uma importante produtora de exopolissacarídeo (EPS). O EPS é a substância de maior concentração no biofilme, principal estrutura no processo de biocorrosão responsável pela adesão e também utilizada como nutriente por outros microrganismos (12). O EPS pode criar condições nutricionais e físicas para o desenvolvimento das BRS sésseis. Além disso, ele protege as células do fluxo e dificulta a difusão de biocidas o que pode ajudar na formação do biofilme. A presença de EPS em amostras de etanol pode ainda aumentar a viscosidade do combustível o que pode levar ao entupimento de válvulas e filtros além da perda de qualidade do mesmo.

Bactérias do gênero *Burkholderia* já foram encontradas em amostras de outros combustíveis (13). Bactérias desse gênero possuem uma grande versatilidade metabólica sendo capazes de degradar compostos tóxicos como aqueles encontrados em pesticidas. Muitas espécies de *Burkholderia* são capazes de degradar derivados do petróleo o que as torna de grande interesse em estudos biorremediação.

A bactéria *Sphingobium olei* foi isolada pela primeira vez de uma amostra de solo contaminado com óleo (14). Ainda são poucos os estudos com essa bactéria e não se sabe ainda a sua participação e função no etanol dada a sua relativa recente descoberta.

Bactérias do gênero *Alcaligenes* já foram isoladas de ambientes contaminados com óleo (15). Assim como o gênero *Burkholderia* e *Sphingobium*, as bactérias *Alcaligenes* são capazes de tolerar grandes quantidades de substâncias tóxicas o que as tornam candidatas a sobreviver em um ambiente hostil como é o etanol combustível.

A bactéria *Serratia marscences* já foi isolada de produto de corrosão retirado do interior de um duto metálico usado para o transporte de produtos derivados do petróleo (16). Essa bactéria foi capaz de crescer utilizando o diesel como fonte de carbono. A sua influência na corrosão do aço API 5LX foi investigada pelos autores.

O gênero *Acinetobacter* já foi encontrado em amostras de etanol combustível (17). Em um dos poucos estudos publicados sobre a diversidade microbiana de etanol, pesquisadores encontraram bactérias desse gênero em amostras coletadas do fundo de tanques de armazenamento de etanol. Algumas espécies desse gênero são capazes de utilizar o etanol como única fonte de carbono e são capazes de tolerar altas concentrações de solventes (18, 19).

Todos os microrganismos encontrados na amostra de etanol apresentam grande diversidade metabólica, sendo capazes de crescer e tolerar ambientes considerados inóspitos para muitos microrganismos. A maioria das bactérias identificadas nesta fase do projeto são reconhecidas pela capacidade de tolerar compostos químicos agressivos como solventes e pesticidas.

A bactéria *Acetobacter aceti*, detectada por pesquisadores em amostras de etanol (4), não foi observada em nenhuma das amostras analisadas pelo LABIO. Por esse motivo, uma cepa deste microrganismo foi adquirida pelo Laboratório de uma coleção de culturas a fim de que estudos sobre a influência dessa bactéria na corrosão de materiais expostos ao etanol pudessem ser realizados. Com o intuito de adaptar a bactéria a um ambiente rico em etanol para que os ensaios de corrosão e consumo do etanol fossem realizados, a cepa foi inoculada em caldo MRS com 2% de etanol. Após a observação do crescimento, uma alíquota do caldo foi inoculada em meio com 4% de etanol. No entanto, 4% foi a concentração máxima de etanol em que foi observado o crescimento da *A. aceti*. Deste modo, não foi possível continuar a adaptação da cepa uma vez que ela não apresentava crescimento em concentrações superiores de etanol.

Conclusões

- Não foi possível detectar a presença de microrganismos cultiváveis em nenhuma das 17 amostras de etanol estudadas. Deste modo, serão testados meios de cultura alternativos para o isolamento de microrganismos cultiváveis.
- A bactéria *Acetobacter acetii* capaz de converter etanol em ácido acético não foi detectada nas amostras analisadas.
- Com a utilização de técnicas de biologia molecular, foram identificados microrganismos capazes de utilizar o etanol como fonte de carbono na amostra de etanol de milho estudada. Também foram encontrados microrganismos relacionados à casos de biocorrosão e tolerantes a substâncias tóxicas.
- A metodologia de PCR do 16S rRNA seguida de clonagem foi eficiente para análise da diversidade de microrganismos em amostra de etanol. Esta metodologia será utilizada para o estudo da diversidade de etanol de outras origens a fim de se comparar os microrganismos presentes nas duas amostras.

Referências bibliográficas

- (1) WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.
- (2) MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 351-370, 2011.
- (3) VIDELA, H. **Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de materiais**, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2003, 148 p.
- (4) MARIANO, K. D. Ethanol-loving bacteria worsen pipeline cracks. **EcoSeed**, 2011.
- (5) TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.
- (6) AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of microbial cells without cultivation. **Microbial Rev**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- (7) OSBURNE, M. S.; GRIOSSMAN, T. H.; AUGUST, P. R.; MACNEIL, I. A. Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. **ASM News**, v. 66, p. 411-417, 2000.
- (8) LUTTERBACH, M. T. S.; GALVÃO, M. M. **Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Field Systems - Fuel for the Future**. Biodiesel: A Case study. London: Springer, 2010, 279 p.
- (9) ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; KRÄNZLER, H.; BATZILLA, C.; KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28S, p. S14–S20, 2006.
- (10) BADE, K.; MANZ, W.; SZEZYK, U. Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, p.215-223, 2000.
- (11) BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C. Recent Advances in the Study of Biocorrosion, an Overview. **Revista de Microbiologia**, v. 30 p. 177-190, 1999.

-
- (12) VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International Microbiology**, v. 8, p. 169-180, 2005.
 - (13) MOHANTY, G.; MUKHERJI, S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 240–250, 2008.
 - (14) YOUNG, C. C.; HO, M-J.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F.-T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Sphingobium olei* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2613–2617, 2007.
 - (15) PEPI, M.; MINACCI, A.; DI CELLO, F.; BALDI, F.; FANI, R. Long-term analysis of diesel fuel consumption in a co-culture of *Acinetobacter venetianus*, *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes faecalis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, p. 3–9, 2003.
 - (16) RAJASEKAR, A.; BABU, T. G.; PANDIAN, S. T. K.; MARUTHAMUTHU, S.; PALANISWAMY, N.; RAJENDRAN, A. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 34, p.589–598, 2007.
 - (17) JAIN, L.; WILLIAMSON, C.; BHOLA, S. M.; BHOLA, R.; SPEAR, J. R.; MISHRA, B.; OLSON, D. L.; KANE, R. Microbiological and Electrochemical Evaluation of Corrosion and Microbiologically Influenced Corrosion of Steel in Ethanol Fuel Environments. **Corrosion 2012 Conference & Expo**. Paper 10070, 2010.
 - (18) ABBOTT; BERNARD, J.; LASKIN, A. I.; MCCOY, C. J. Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on Ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 25, n. 5 p. 787-792, 1973.
 - (19) CHEN, H. L.; YAO, J., WANG, L.; WANG, F.; BRAMANTI, E., MASKOW, T.; ZARAY, G. Evaluation of Solvent Tolerance of Microorganisms by Microcalorimetry. **Chemosphere**, v. 74, n. 10, p. 1407-1411, 2009.