Corros. Prot. Mater., Vol. 32, Nº 4 (2013)
100-104

DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM A BIOCORROSÃO NO SISTEMA ÓLEO E GÁS

Artigo submetido em 22 de Maio de 2013 e aceite em Outubro de 2013

T. Rodrigues, A. de Oliveira, D. Coutinho, L. Guerreiro, M. Galvão, P. Souza, S. Charret, V. de Oliveira e M. Lutterbach(*)

LABIO – Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação – Divisão de Corrosão e Degradação – Instituto Nacional de Tecnologia. Av. Venezuela, 82, Sala 616. CEP: 20081-312, Centro. Rio de Janeiro, Brasil, e-mails: thais.rodrigues@int.gov.br; ana.chaves@int.gov.br; diogo.azevedo@int.gov.br; luana.guerreiro@int.gov.br; mariana.galvao@gmail.com; pamella.souza@int.gov.br; sylviane.charret@int.gov.br; viviane.oliveira@int.gov.br;
(*) A quem a correspondência deve ser dirigida, e-mail: marcia.lutterbach@int.gov.br

Resumo

O estudo da corrosão microbiologicamente induzida é importante no setor de óleo e gás devido aos danos provocados pelos microrganismos aos sistemas de produção, armazenamento, transporte e qualidade do produto final. Os microrganismos podem ser encontrados amplamente distribuídos na natureza e o seu crescimento e produtos metabólicos podem comprometer o rendimento de indústrias petroquímicas. Um fator importante para o desenvolvimento de microrganismos é a presença de água e nutrientes no meio. Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade microbiana em diferentes amostras das indústrias do setor de óleo e gás e relacioná-la com os processos de biocorrosão.

Palavras-chave: Diversidade Microbiana, Biocorrosão, Sistema Óleo e Gás

DIVERSITY OF MICROORGANISMS RELATED TO BIOCORROSION IN OIL AND GAS SYSTEMS

Abstract

The study of microbiologically induced corrosion is important to the oil and gas industry due to the damage caused by microorganisms to production, storage, and transportation systems and to the final product quality. Microorganisms can be found widely distributed in nature and their growth and metabolic products can compromise the performance of petrochemical industries. An important factor for the development of microorganisms is the presence of water and nutrients in the medium. This study aimed to analyze the microbial diversity in different samples of the oil and gas industries and to relate it to the biocorrosion process.

Keywords: Microbial Diversity, Biocorrosion, Oil and Gas Systems

1. INTRODUÇÃO

O estudo da corrosão de metais influenciada pela presença de microrganismos em ambientes industriais e naturais merece destaque, pois estes podem provocar diversos tipos de danos aos sistemas, como entupimento de filtros e válvulas, devido à formação de biofilmes; aumento nos custos de bombeamento; risco de contaminação de produtos e redução na vida útil dos equipamentos. Este tipo de corrosão é encontrado com frequência na indústria petrolífera, tanto na fase de extração, como nas fases de distribuição e armazenamento [1].

Os microrganismos estão amplamente distribuídos no ambiente e são frequentemente encontrados em solos e águas naturais. Em sistemas de óleo e gás, podem estar presentes em gotículas de água em suspensão, na interfase água/combustível e também aderidos às paredes dos tanques de armazenamento.

A causa principal da contaminação microbiana em combustíveis é a presença de água no meio. Esta água pode ser inserida através de: condensação da umidade do ar contido no interior dos tanques; decantação da água dissolvida no combustível ou penetração de água de chuva pelo local de abastecimento.

Diversos grupos microbianos, dentre eles bactérias precipitantes de ferro, redutoras de sulfato, fermentadoras e metanogênicas, além de fungos, têm sido isolados nestes ambientes [2]. Alguns destes microrganismos podem ter a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos, levando à degradação do combustível [3]. Esta biodegradação envolve consórcios microbianos, ou seja, grupos heterogêneos de microrganismos. Além das espécies capazes de degradar o combustível, outras espécies podem crescer utilizando os produtos metabólicos das primeiras.

Hormoconis resinae e *Pseudomonas aeruginosa* são os contaminantes microbianos mais frequentemente encontrados em sistemas de água/combustível. Estes estão relacionados com a formação de *biofouling* e biocorrosão em ligas de ferro e alumínio.

A atividade metabólica dos microrganismos em sistemas de óleo e gás pode causar uma biocorrosão rápida e grave [4]. Produtos metabólicos corrosivos derivados da degradação microbiológica de um combustível, como sulfuretos, ácidos orgânicos e inorgânicos (incluindo ácido sulfúrico e sulfuroso) levam à degradação de revestimentos protetores de tanques, destroem ou inativam inibidores de corrosão e levam à corrosão localizada de tanques e equipamentos de injeção. O crescimento microbiano e a formação de tubérculos também estimulam a corrosão eletroquímica através de arejamento diferencial.

Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar a diversidade de microrganismos presentes no sistema de óleo e gás a fim de ampliar o conhecimento sobre os grupos microbianos causadores de biocorrosão, facilitando ações que permitam manter a integridade do sistema frente ao ataque microbiológico.

2. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

2.1 Amostragem

Amostras de querosene de aviação, biodiesel, petróleo e água do mar foram analisadas no laboratório de acordo com a necessidade de pesquisa. Estas foram coletadas sob responsabilidade do solicitante e analisadas num prazo de 48 horas. A partir destas amostras, os microrganismos cultiváveis foram isolados para identificação.

2.2 Identificação microbiana

2.2.1 Bactérias

Algumas estirpes de bactérias foram isoladas em cultura pura a partir de amostras de petróleo, água de produção e tanques de armazenamento de combustíveis.

As estirpes isoladas foram observadas ao microscópio ótico para avaliação da morfologia celular e determinação das características morfotintoriais. Para isto, as células foram coradas pelo método de coloração de GRAM. As características macroscópicas também foram observadas a partir das colônias microbianas que cresceram em agar.

As estirpes bacterianas isoladas foram preservadas em triplicados por congelamento em 5 % de DMSO a -80 ºC, após crescimento em meio de cultivo.

VOLTAR AO INÍCIO

Corros. Prot. Mater., Vol. 32, Nº 4 (2013)
100-104

A identificação bacteriana foi realizada por meio de biologia molecular. As estirpes foram identificadas através da análise do gene rRNA 16S, seguindo as etapas [5]:

1. Extração de DNA – o DNA bacteriano foi extraído através de kits comerciais.

2. Amplificação de DNA – a replicação de sequencia de nucleotídeos do gene rRNA 16S foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o "primer" universal Sadir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3', *forward*) e S17 (5' GTTACCTTGTTACGACTT-3 ', *reverse*).

3. Sequenciamento do gene de RNA 16S e identificação filogenética das estirpes – as sequências obtidas foram comparadas com as já disponíveis na base de dados GenBank utilizando o programa BLAST [6] para identificação da espécie.

As etapas seguidas desde o isolamento até a identificação das bactérias estão ilustradas no esquema da Figura 1.

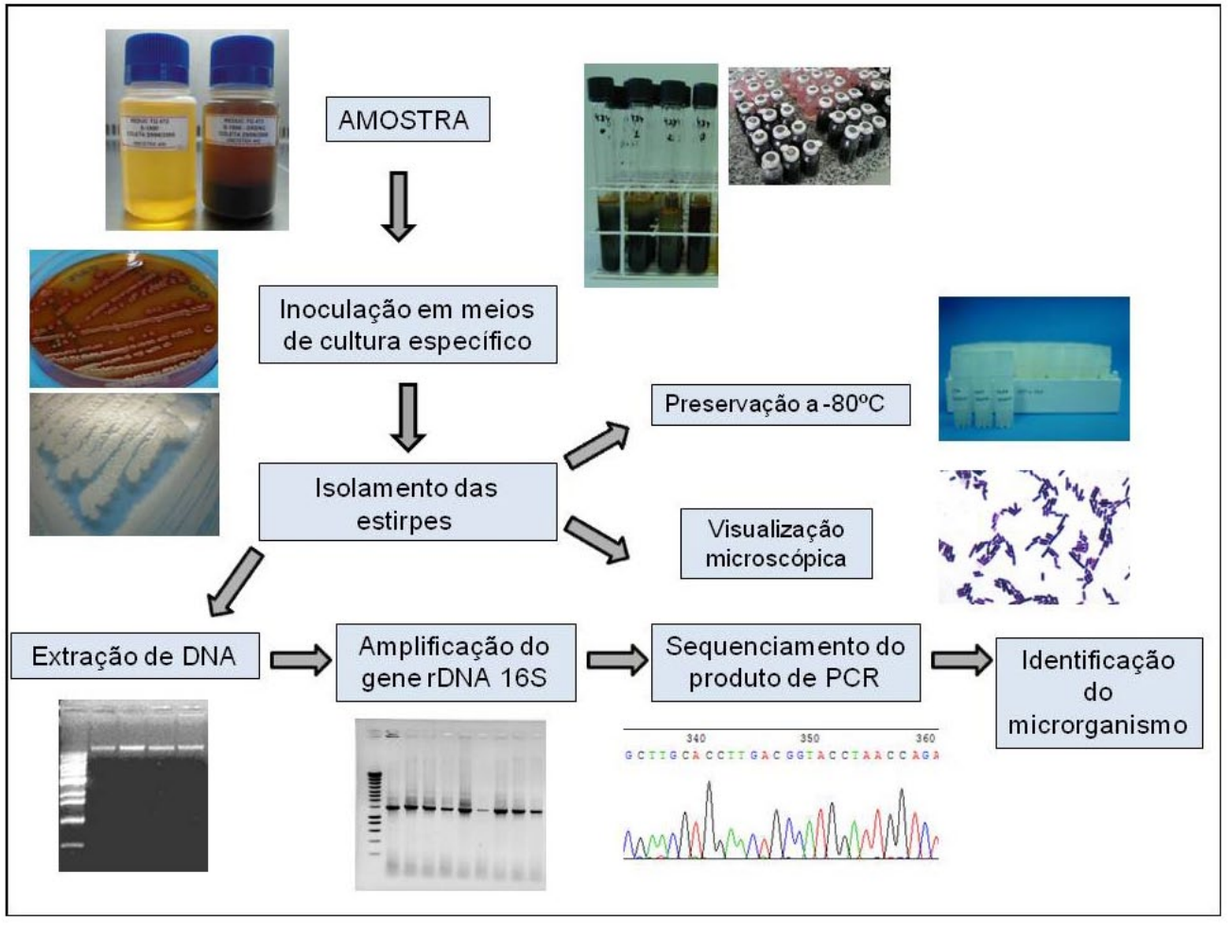


Fig. 1 - Metodologia para isolamento e identificação de estirpes bacterianas.

2.2.2 Fungos

Para detectar a presença de fungos, as amostras estudadas foram inoculadas em agar Sabouraud adicionado de cloranfenicol e posteriormente isoladas em agar extrato de malte, Czapek ou agar batata. Todas as placas foram incubadas a 25 ºC por 14 dias.

Após o isolamento das estirpes foi realizada uma identificação taxonômica mediante a observação das morfologias macroscópicas e microscópicas [7]. As estirpes fúngicas foram preservadas em óleo mineral. Para isto, as estirpes isoladas foram crescidas em agar batata e incubadas a 25 ºC. Após esporulação, a cultura foi coberta por uma camada de 3 mL de óleo mineral estéril e armazenada à temperatura ambiente.

A identificação filogenética foi realizada por biologia molecular através das seguintes etapas:

1. Lise celular por choque térmico – a lise celular foi realizada através de 3 ciclos de congelamento em nitrogênio e descongelamento em banho-maria a 60 ºC.

2. Extração de DNA – o DNA foi extraído através da utilização de kits comerciais.

3. Amplificação de DNA – o gene que codifica a região ITS foi amplificado utilizando o conjunto de "primers" ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', *forward*) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', *reverse*) [8].

4. Sequenciamento do DNA e identificação das espécies – os produtos de PCR foram purificados e sequenciados. As sequencias obtidas foram comparadas com as já disponíveis na base de dados GenBank utilizando o programa BLAST [6] para identificação da espécie.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Microrganismos isolados de querosene de aviação - QAV

Diversos microrganismos podem ser encontrados em tanques de aviões, e elevadas concentrações destes microrganismos indicam baixa qualidade do combustível. Neste caso, a qualidade do combustível é extremamente importante uma vez que problemas de contaminação microbiana podem acelerar a corrosão no tanque através de entupimento dos filtros e falhas nas bombas de combustível, comprometendo a segurança do voo [9, 10].

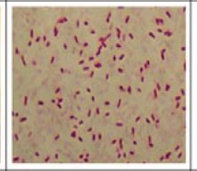
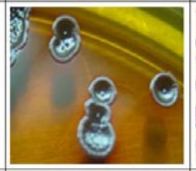
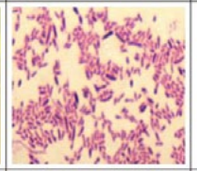
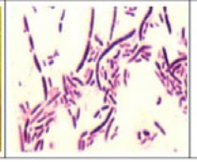
Na amostra de QAV analisada, foram encontradas 3 espécies

VOLTAR AO INÍCIO

Corros. Prot. Mater., Vol. 32, Nº 4 (2013)
100-104

do gênero *Pseudomonas,* suas características macroscópicas e microscópicas estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Espécies da bactéria *Pseudomonas* encontradas em querosene de aviação.

Amostra	Característica Macroscópica	Microscopia ótica	Identificação
QAV			*Pseudomonas aeruginosa*
QAV			*Pseudomonas monteei*
QAV			*Pseudomonas stutzeri*

Este microrganismo também já foi encontrado em solo contaminado com derivados de petróleo e é comum ser citado na literatura pela capacidade de degradar hidrocarbonetos [11]. O gênero *Pseudomonas* é conhecido pela produção de exopolissacarídeo, uma matriz polimérica que favorece a formação do biofilme, importante para o processo corrosivo. Além disso, essas bactérias são capazes de precipitar o ferro formando tubérculos de óxido de ferro que se depositam sobre as superfícies metálicas.

A pesquisa por fungos mostrou a presença de *Hormoconis resinae* na amostra de QAV estudada. O crescimento do fungo em agar está representado na Figura 2 e sua característica microscópica na Figura 3.



Fig. 2 - *Hormoconis resinae* em agar .

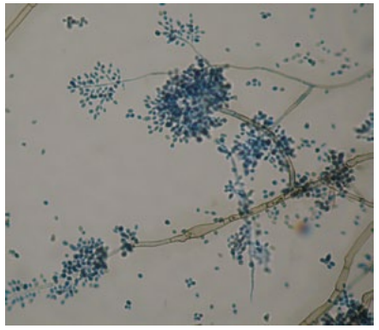


Fig. 3 - Característica microscópica de *Hormoconis resinae.*

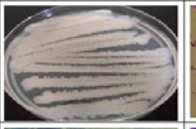
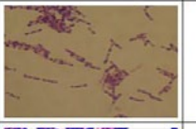
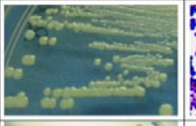
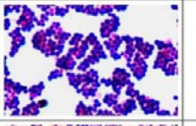
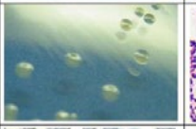
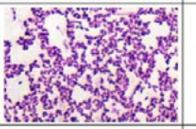
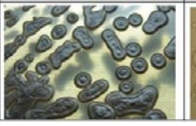
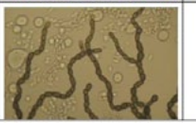
A presença do fungo filamentoso *Hormoconis resinae* em QAV é considerada grave e potencialmente causadora de sérios problemas, pois este fungo produz uma grande quantidade de biomassa e adere fortemente à parede do tanque, dificultando a sua remoção mesmo com a drenagem da água presente no fundo de tanque.

3.2 Microrganismos isolados de biodiesel

Algumas estirpes bacterianas foram isoladas a partir de diferentes amostras de biodiesel: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus pasteuri* e *Cupriavidus pauculus* (Tabela 2). Estes microrganismos são diferentes dos normalmente isolados de diesel. Há evidências de que o biodiesel seja mais propenso à contaminação microbiológica do que o diesel de origem fóssil [12].

O fungo *Aureobasidium pullulans* também foi isolado de amostras de biodiesel. Este fungo é conhecido pela sua produção de polissacarídeo (pululana), o que leva ao comprometimento da qualidade do combustível, pois além de aumentar a viscosidade do produto, pode causar entupimento do sistema.

Tabela 2 - Características morfológicas dos microrganismos isolados de amostras de biodiesel.

Amostra	Característica Macroscópica	Microscopia ótica	Identificação
Biodiesel			*Bacillus cereus*
Biodiesel de algodão			*Staphylococcus pasteurii*
Biodiesel de soja			*Cupriavidus pauculus*
Biodiesel			*Aureobasidium pullulans*

3.3 Microrganismos isolados de petróleo

O crescimento de microrganismos na cadeia de produção de petróleo pode causar problemas de degradação do combustível, além de problemas relacionados com a corrosão microbiologicamente induzida de tanques e dutos.

Diversas espécies de microrganismos foram relatadas como responsáveis pela deterioração de hidrocarbonetos e derivados sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Eles utilizam estes compostos como fonte de carbono e energia. Os principais gêneros de bactérias capazes de degradar compostos do petróleo são *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*,

Corros. Prot. Mater., Vol. 32, Nº 4 (2013)
100-104

Stenotrophomonas, *Streptomyce* e *Vibrio* [13]. Porém nenhum destes gêneros foi encontrado na amostra analisada. Após o isolamento dos microrganismos de uma amostra de petróleo, foi possível identificar três estirpes de bactérias. *Enterobacter asburiae*; *Rhodobacter capsulatus* e *Ochrobactrum tritici*. Como exemplo, apresentamos as características fenotípicas da espécie *Rhodobacter capsulatus* na Figura 4.

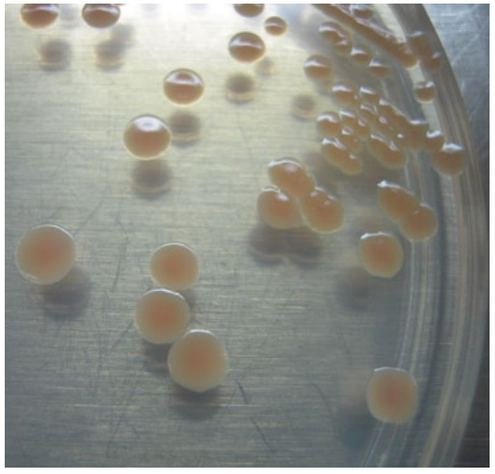


Fig. 4 - Caracterícticas fenotípicas de *Rhodobacter capsulatus* isolado a partir de uma amostra de petróleo.

Além de espécies de bactérias, foi isolada da fase óleo de um tanque de armazenamento de petróleo uma espécie do fungo *Penicillium,* o *Penicillium citrinum*. A Figura 5 ilustra as características morfológicas deste fungo.

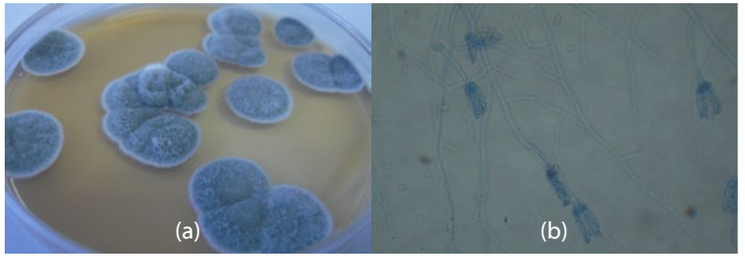


Fig. 5 - Características macroscópicas (a) e microscópicas (b) da espécie *Penicillium citrinum*.

3.4 Microrganismos isolados de água do mar

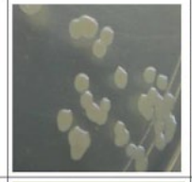
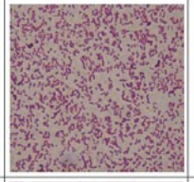
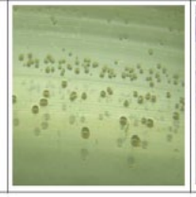
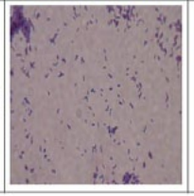
A água é um elemento fundamental para manutenção da vida em diversos ambientes. Sendo assim, a diversidade de microrganismos encontrada em processos que envolvam a água é bem grande.

A água do mar utilizada para injeção em poços de petróleo para recuperação do óleo fornece condições favoráveis para o crescimento microbiano, pois possuem altas concentrações de cloretos e hidrocarbonetos que podem ser utilizados como fonte de nutrientes [14].

Em plataformas de petróleo *offshore* os maiores problemas de biocorrosão estão relacionados com as incrustações, perfurações, problemas no armazenamento e transporte do produto e sistema de injeção de água [4].

Amostras de água de produção foram analisadas e diferentes espécies microbianos foram isolados. Observou-se a presença de *Pseudomonas stutizeri*, *Salinicola salarius*, *Bacillus cereus*, *Marinobacterium sediminicola,* 3 espécies do gênero *Vibrio, Vibrio sinaloensis*, *Vibrio corallilyticus* e *Vibrio neptunensis*, além dos fungos *Aspergillus versicolor* e *Penicillium citrinum*.

Tabela 3 - Características morfológicas de duas bactérias isoladas de água de produção.

Amostra	Característica Macroscópica	Microscopia ótica	Identificação
Água de produção			*Salinicola salarius*
Água de produção			*Marinobacterium sediminicola*

Penicillium citrinum é conhecido pela sua capacidade de degradar substâncias consideradas tóxicas como pesticidas, inibidores de corrosão e plastificantes [15].

As características morfológicas das bactérias *Salinicola salarius* e *Marinobacterium sediminicola* e do fungo *Aspergillus versicolor,* estão ilustradas na Tabela 3 e Figura 6, respectivamente.

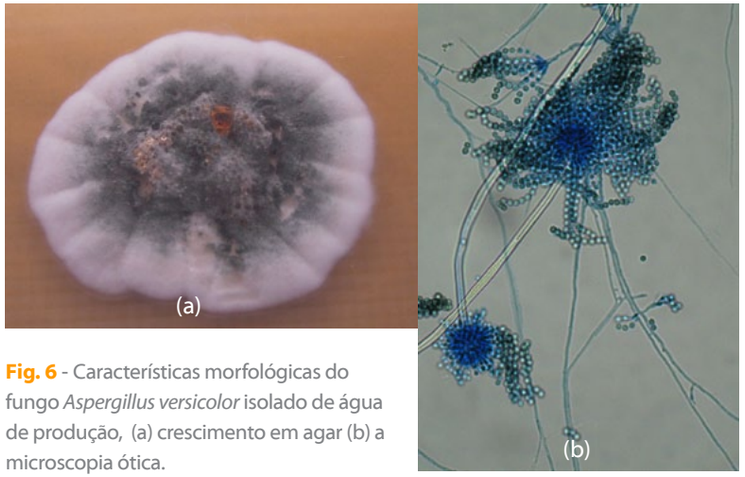


Fig. 6 - Características morfológicas do fungo *Aspergillus versicolor* isolado de água de produção, (a) crescimento em agar (b) a microscopia ótica.

4. CONCLUSÕES

O gênero *Pseudomonas* já foi relatado em diversas amostras de processos corrosivos e foi isolado a partir de amostras de QAV, petróleo e água de produção. Essas bactérias são extremamente versáteis, o que as torna capazes de sobreviver numa grande variedade de ambientes. Este gênero já foi citado na literatura como capaz de degradar hidrocarbonetos e estão frequentemente associados a problemas de biocorrosão em sistemas de água e combustível [1, 11].

A espécie *Bacillus cereus* é um microrganismo amplamente distribuído na natureza. Este microrganismo é importante nas indústrias do sistema de óleo e gás devido à sua capacidade de formar biofilmes em estruturas metálicas. Além disto, são microrganismos formadores de esporos, o que confere resistência adicional a processos de limpeza e agentes antimicrobianos [16]. A presença deste microrganismo pode comprometer sistemas de produção, transporte, armazenamento e

VOLTAR AO INÍCIO

Corros. Prot. Mater., Vol. 32, Nº 4 (2013)
100-104

qualidade final de produtos. Neste trabalho foi possível observar a presença de *B. cereus* em biodiesel e água de produção.

Dentre os fungos isolados, foi identificado o *Penicillium citrinum,* presente em petróleo e água de produção. Os fungos possuem capacidade de sobreviver a condições adversas do meio ambiente devido a formação de esporos, que são estruturas de resistência. A presença de fungos pode contribuir para o aumento da espessura dos biofilmes.

Todos os microrganismos isolados, caracterizados e identificados neste trabalho encontram-se mantidos em banco de culturas do laborátorio. Esses microrganismos também são utilizados para estudos de resistência de materiais, eficiência de biocidas, degradação de combustíveis, entre outros.

No entanto, a diversidade microbiana de ambientes naturais é enorme e o cultivo de microrganismos em laboratório não reflete as reais condições do ambiente, pois apenas uma minoria das bactérias é capaz de crescer em meios de cultivo. Sendo assim, estes resultados refletem uma pequena parcela da diversidade real destes ambientes, podendo ser utilizado como estudo preliminar no conhecimento da diversidade microbiana destes locais. Para uma análise mais completa, técnicas de biologia molecular como clonagem gênica e pirosequenciamento podem ser aplicadas para o entendimento da comunidade microbiana, incluindo os microrganismos não cultiváveis.

No geral, os processos de biocorrosão são associados não somente aos microrganismos, mas também aos seus produtos metabólicos e à presença de água, mesmo que em pequena quantidade. Por isso é importante conhecer a diversidade de microrganismos presentes nestes ambientes e tomar medidas preventivas contra o ataque microbiano.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à PETROBRAS pelo suporte financeiro a pesquisas no LABIO - laboratório de Biocorrosão e Biodegradação.

REFERÊNCIAS

[1] H. A. Videla (Casos relevantes de biocorrosão), *in* Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais, (Edgard Blücher, ed.), São Paulo, Brasil (2003).
[2] D. B. Souza, G. C. B. Brito, F. C. W. Vasconcelos and L. C. Braga, *Revista de Estudos Ambientais*, 12, 38-46 (2010).
[3] R. M. C. Wetler, C. E. Rezende and A. D. Gravitol, *Revista Virtual de Química*, *3*, 78-87 (2011).
[4] R. Javaherdashti (Examples of Some Systems Vulnerable to MIC), *in* Microbiologically Influenced Corrosion, (Springer, ed.), Perth, Austrália (2008).
[5] M. T. S. Lutterbach and M. M. Galvão (Fuel for the Future. Biodiesel: A Case study), *in* Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Field Systems, (C. Whitby e T. L. Skovhus, ed.), New York, USA (2010).
[6] BLAST – Basic Local Alignment Search Tool. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Acesso em 07/12/2012.
[7] H. L. Barnett and B. B. Hunter. Illustred Genera of Imperfect Fungi, (Burgess Publihing CO, ed.), California, USA (1980).
[8] T. J. White, T. D. Bruns, S. Lee and J. Taylor (Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics), *in* PCR protocols, a guide to methods and applications, (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky e T. J. White ed.), San Diego, California, USA (1990).
[9] S. S. Yang, C. Y. Chen, Y. Sung and Y. T. Lin, *Chinese Journal of Microbiology and Immunology,* 25, 223–231 (1992).
[10] M. D. Ferrari, E. Neirotti and C. Albornoz, *Rev. Argent. Microbiol.,* 30, 105–114 (1998).
[11] E. B. Gomes (Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de SUAPE-PE), dissertação apresentada para a obtanção do grau de Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil (2004).
[12] M. T. S. Lutterbach, L. S. Contador, V. Oliveira, M. M. Galvão, A. L. C. Oliveira, D. G. Ferreira e G. S. Pimenta (Diversidade microbiana em amostras de biodiesel), *in Procedimentos do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Porto de Galinhas, PE, Brasil (2009).
[13] R. M. C. Wetler (Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul), dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, Bahia, Brasil (2006).
[14] Q. Li, C. Kang and C. Zhang, *Process Biochem.*, 40, 873-877 (2005).
[15] E. Zboińska, I. Maliszewska, B. Lejczak and P. Kafarski, *Lett. Appl. Microbiol.,* 15, 269-272 (1992).
[16] A. C. R. Rossi (Estudo de biofilmes e células plantônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios), dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil (2008).

VOLTAR AO INÍCIO