

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES FORMADOS EM
SUPERFÍCIES METÁLICAS E BIOCORROSÃO**

CURITIBA

2010

PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI

CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES FORMADOS EM SUPERFÍCIES METÁLICAS E BIOCORROSÃO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração: Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas do Campus Centro Politécnico, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA

2010

PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI

CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES FORMADOS EM SUPERFÍCIES METÁLICAS E BIOCORROSÃO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração: Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas do Campus Centro Politécnico, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Co-Orientadores: Prof^a. Dr^a. Patricia do Rocio Dalzoto
Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI

CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES FORMADOS EM SUPERFÍCIES METÁLICAS E BIOCORROSÃO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Departamento de Patologia Básica, UFPR

Prof^a. Dr^a. Vanessa Kava-Cordeiro

Departamento de Genética, UFPR

Prof. Dr. Carlos Mario Garcia

Departamento de Materiais, LACTEC

DEDICATÓRIA

Dedico,

*A quem tudo pertence: "Deus" que sempre esteve do meu lado ... e
aos meus familiares; em especial meus pais: Paulo Cesar e Wania;
minha esposa, Neva e
meus irmãos, Victor Hugo e Jéssica,
que sempre estiveram ao meu lado e me incentivaram
a continuar acreditando em meus sonhos
me apoiando, incentivando e caminhando lado a lado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas mestres prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel, prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente e prof^a Dr^a Patricia do Rocio Dalzoto. Pela longa jornada de trabalho conjunto, conselhos e ensinamentos da prof^a Ida e Vânia e mais recentemente e não menos importante o acompanhamento da prof^a Patricia em todos os projetos que estive envolvido.

Sou grato à oportunidade oferecida pelo prof^o Dr Carlos Mario Garcia, pesquisador do LACTEC, que tanto me auxiliou nesta nova empreitada me levando junto para visitas técnicas e possibilitando que este projeto pudesse se aproximar o máximo a uma pesquisa aplicada e ao prof^o Dr Marcos Antonio Coelho Berton, pesquisador também do LACTEC, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

A todos meus colegas de laboratório: Angela, Mariana, Sabina, Eduardo, Samarina, Juliana Reis, Raiana, Carlos e Rafael que sempre me apoiaram e auxiliaram durante meu período de práticas em laboratório e juntos nos momentos de lazer.

Agradeço especialmente ao amigo e estudante de iniciação científica Diogo Robl, que tanto contribuiu para este projeto trabalhando lado a lado para a execução das análises.

Obrigado a todos os meus amigos de mestrado por sempre estarem ao meu lado durante todo o processo que se passou: Juliana Duarte (Loira), Franciele, Andre, Marta, Raquel, Saloe, Fabiane e Patricia Paraguaia. Um abraço especial aos meus grandes amigos Giuseppe e Ana que sempre estiveram ao meu lado durante a graduação e durante o mestrado, direta e indiretamente.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento durante meu processo de formação acadêmica Prof (as): Juliana Moura, Debora, Carlos Dalk, Andrea, Vanessa e todos que com o seu tempo disponível souberam me receber e orientar de alguma forma, com uma técnica específica ou palavra.

Aos meus familiares, em especial meus Pais, Paulo Cesar e Wania, irmãos, Victor Hugo e Jéssica, e minha esposa Neva. A todos vocês que apostam em meu potencial e estiveram a todo instante me dizendo palavras de incentivo e estímulo,

que foram extremamente importante para que eu chegasse neste ponto de minha vida.

Agradeço ao aporte financeiro dispensado pelo LACTEC para que este projeto se desenvolvesse e ao financiamento do CNPq através de minha bolsa auxílio, que recebi através de meu esforço e merecimento devido à minha dedicação e perseverança.

A grande força universal...

A Deus

RESUMO

A corrosão microbiológica ou biocorrosão em superfícies metálicas está associada a várias espécies microbianas e seus produtos metabólicos. A colonização destas superfícies por microrganismos é denominada biofilme. A corrosão causada por biofilmes pode levar à danificação de equipamentos e destruição de ligas metálicas e outros materiais minerais. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e identificação de microrganismos presentes em corpos-de-prova metálicos (CP's) instalados em estações de corrosão em duas Usinas Hidrelétricas (Usina hidrelétrica de Balbina – “Presidente Figueiredo/AM” e Usina hidrelétrica de Salto Pilão – “Ibirama/SC”). Os CP's foram imersos em caixas acrílicas, onde circulava água do reservatório das usinas. Os microrganismos foram isolados em meios seletivos e posteriormente identificados por meio de macromorfologia, micromorfologia (microscopia ótica e eletrônica de varredura), provas bioquímicas e quando apropriado, por oligonucleotídeos específicos e sequenciamento de DNA. Foram isoladas Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e bactérias oxidantes do ferro em CP's com tubérculo de corrosão. Outras bactérias associadas à formação de biofilme também foram encontradas, como *Pseudomonas* sp, Enterobactérias e *Bacillus* sp, principalmente em aço carbono. Os principais gêneros de fungos isolados foram *Aspergillus* sp, *Paecilomyces* sp e *Penicillium* sp. O aço carbono foi o metal mais afetado pela biocorrosão e também apresentou maior diversidade de microrganismos. Foi verificado que com a utilização de técnicas de metagenômica é possível acelerar o processo de identificação das Bactérias redutoras de sulfato envolvidas com o “biofouling” e biocorrosão.

Palavra-chave: Microbiologia, biofilme, biocorrosão

ABSTRACT

The microbiological corrosion or biocorrosion on metal surfaces is associated with various microbial species and their metabolic products. Colonization of these areas by microorganisms is known as biofilm. The corrosion caused by biofilms can lead to damage to equipment and destruction of metal alloys and other minerals. The main objective of this work was the isolation and identification of microorganisms present in body-of-proof metal (BP) installed at stations of corrosion in hydroelectric dams. The BP's were immersed in acrylic boxes, which carries water from the reservoir of hydro-power plants. These bodies proof were examined periodically. The microorganisms were isolated in selective media and subsequently identified by macro-morfology, micro-morphology (optical microscope and scanning electron), biochemical evidence and molecular biology. Were isolated sulfate-reducing bacteria (BRS) and the iron oxidizing bacteria in BP's with tuber of corrosion. Other bacteria associated with the formation of biofilms were also found, such as *Pseudomonas* sp, Enterobacteria and *Bacillus* sp, especially in carbon steel. The major genera of fungi isolated were *Aspergillus* sp, *Paecilomyces* sp and *Penicillium* sp. The carbon steel is the metal most affected by biocorrosion and also showed greater diversity of microorganisms. It was found that the use of techniques of metagenomics is possible to accelerate the process of identification of microorganisms involved with the "biofouling" and biocorrosion.

Keyword: Microbiology, biofilm, biocorrosion

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Corrosão Abiótica (Eletroquímica), sem a influência de microrganismos.	15
FIGURA 2 – Formação de biofilme em superfície metálica.	17
FIGURA 3 – Ciclo do enxofre com atuação de Bactérias oxidantes e redutoras de sulfato.	20
FIGURA 4 – Reação de oxidação influenciada por bactérias oxidantes do enxofre.	22
FIGURA 5 – Reações envolvidas com as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) no processo de corrosão influenciada por microrganismos.	23
FIGURA 6 – Representação esquemática do processos eletroquímicos e biológicos envolvidos na corrosão influenciada por bactérias oxidantes do ferro.	25
FIGURA 7 – Representação em corte da construção civil de uma Central Geradora Hidrelétrica.	34
FIGURA 8 - UHE Balbina , município de Presidente Figueiredo/AM – Rio Uatumã.	38
FIGURA 9 – Visão interna da UHE – Balbina mostrando os Estatores 1 a 5 (a), Guindaste de serviço que se utiliza atualmente para a manutenção dos equipamentos (b) e transformadores de voltagem, visão externa (c).	38
FIGURA 10 – Barragem UHE-Salto Pilão, acesso do túnel de captação de água para as turbinas.	39
FIGURA 11 – Esquema de visualização do complexo UHE Balbina para representação da localização dos pontos de coleta do experimento.	39
FIGURA 12 - Pontos de coleta de água do rio Itajaí-Açu, construção da Usina Hidrelétrica de Salto Pilão, Ibirama – SC.	40
FIGURA 13 – Três ligas metálicas utilizadas como corpos de prova (Cp's).	41
FIGURA 14 – Material utilizado para a confecção dos pontos de coleta.	44
FIGURA 15 – Vista do pé da barragem onde encontra-se instalado os corpos de prova do ponto de coleta “A” segundo figura 11.	44
FIGURA 16 – Detalhamento dos materiais para confecção de tubos com ausência de O ₂ .	50

FIGURA 17 – Posições dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) no gene 16S em relação a numeração da <i>E. coli</i> (DALY, SHARP e McCARTHY 2000).	52
FIGURA 18 – Área dos trocadores de calor em que se encontra o ponto B de coleta conforme Figura 11.	56
FIGURA 19 – Radiador do Estator na unidade 2.	56
FIGURA 20 – Corpos de prova coletados para preparar o inóculo e realizar isolamento dos microrganismos.	57
FIGURA 21 – Microscopia eletrônica de varredura de tubérculos de corrosão obtido de corpos de prova de aço carbono coletados na UHE-Balbina.	58
FIGURA 22 – Cultivo em meio líquido seletivo para Bactérias redutoras de sulfato (BRS).	59
FIGURA 23 - Amplificação de uma região do gene de rRNA 16S de BRS.	60
FIGURA 24 - Micromorfologia de Ferrobactérias (coloração de GRAM) UHE-Balbina, Manaus-AM.	60
FIGURA 25 - Fotos de indentificação bacteriana (GRAM) amostras coletadas UHE-Balbina.	62
FIGURA 26 – Macromorfologia dos fungos isolados em meio BDA após 15 dias em BOD a 28°C.	63
FIGURA 27 – Microscopia óptica (1000X), lâminas preparadas através de microcultivo de isolados fúngicos.	64
FIGURA 28 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) isolados fúngicos.	64
FIGURA 29 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de tubérculo de corrosão obtidos de corpos de prova de aço carbono na UHE-Salto Pilão.	67
FIGURA 30 – Cultivo seletivo de BRS utilizando meio de cultivo específicos e metodologia para cultivo de anaeróbicos obrigatórios.	68
FIGURA 31 - Micromorfologia de Ferrobactérias (Coloração de GRAM) UHE-Salto Pilão, Ibirama-SC.	72
FIGURA 32. Micromorfologia dos fungos isolados dos CP's (Microscopia ótica 400X)	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Operação no Brasil.	31
QUADRO 2 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Construção no Brasil.	31
QUADRO 3 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica Outorgadas que ainda não foram construídas no Brasil.	32
QUADRO 4 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica do Brasil por região.	33
QUADRO 5 – Materiais utilizados para a confecção dos corpos de prova que foram instalados na UHE-Salto Pilão.	42
QUADRO 6 – Cronograma de execução das coletas de corpos de prova e água para análise físico-química e microbiológica UHE-Balbina.	43
QUADRO 7. Sequências de oligonucleotídeos indicadores específicos para amplificação de regiões do DNAr 16S recomendadas para identificação de grupos de BRS (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000).	52
TABELA 1. Fungos isolados dos corpos de prova metálicos expostos às águas do reservatório da UHE-Balbina em Manaus (AM) – Brasil.	65
TABELA 2. Identificação de grupos de BRS (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000) encontrados nas coletas 1 e 2 - UHE-Salto Pilão.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- Adenosina Tri-fosfato
BRS	- Bactérias Redutoras de Sulfato
CGH	- Central Geradora Hidrelétrica
CIM	- Corrosão Influenciada por Microrganismos
CO₂	- Gás carbônico
CP	- Corpo de prova metálico
DNA	- ácido Desoxirribonucleico
DNAr	- DNA ribossomal
EOL	- Central Geradora Eolielétrica
Fe(OH)₃	- Hidróxido de ferro
Fe²⁺	- Íon ferroso
Fe³⁺	- Íon férrico
GW	- unidade de energia <i>gigawatts</i> , equivalente 10 ⁹ W (watt)
H₂S	- ácido sulfídrico
H₂SO₄	- ácido sulfúrico
ITS1	- Regiões inter-espacedora eucariotos (18S – 5,8S)
ITS2	- Regiões inter-espacedora eucariotos (5,8S – 28S)
kW	- unidade de energia <i>kilowatts</i> , equivalente 10 ³ W (watt)
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)
MPE	- Material polimérico extracelular
mRNA	- ácido ribonucleico mensageiro
MW	- unidade de energia <i>megawatts</i> , equivalente 10 ⁶ W (watt)
NH₃	- Amônia
O₂	- Oxigênio

PCH	- Pequenas Centrais Hidrelétricas
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
pH	- Potencial de hidrogeniônico
Primer	- Oligonucleotídeos iniciadores
QS	- Sensor de <i>quorum</i> (<i>Quorum sensing</i>)
RNAr	- ácido ribonucleico ribossômico
S	- Enxofre elementar
SOL	- Central Geradora Solar Fotovoltáica
UHE	- Usina Hidrelétrica de Energia
UTE	- Usina Termelétrica de Energia
UTN	- Usina Termonuclear

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	- 10 -
2	OBJETIVOS	- 12 -
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	- 13 -
3.1	Corrosão Influenciada por Microrganismos (CIM).....	- 13 -
3.2	Biofilme	- 14 -
3.3	Caracterização das águas superficiais do território brasileiro.....	- 16 -
3.4	Fisiologia microbiana	- 18 -
3.5	Microrganismos envolvidos com a biocorrosão	- 19 -
3.5.1	Bactérias Oxidantes do Enxofre	- 20 -
3.5.2	Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).....	- 21 -
3.5.3	Bactérias Oxidantes do Ferro.....	- 22 -
3.5.4	<i>Bacillus</i> , Enterobactérias e <i>Pseudomonas</i>	- 24 -
3.5.5	Fungos.....	- 26 -
3.6	Técnicas moleculares	- 26 -
3.7	Centrais Geradoras de Energia Elétrica - Brasil	- 29 -
3.7.1	Composição de Centrais Geradoras Hidrelétricas	- 33 -
4	MATERIAIS E MÉTODOS	- 36 -
4.1	Área experimental.....	- 36 -
4.2	Amostragem	- 40 -
4.3	Delineamento experimental.....	- 42 -
4.3.1	Usina Hidrelétrica de Balbina	- 42 -
4.3.2	Usina Hidrelétrica de Salto Pilão	- 44 -
4.4	Meios de cultivo, Soluções e Reagentes	- 44 -
4.4.1	Meios de Cultivo	- 44 -
4.4.2	Soluções e Reagentes	- 45 -
4.5	Metodologia de análise dos corpos de prova.....	- 47 -
4.5.1	Isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas	- 47 -

4.5.2	Presença / Ausência de bactéria oxidante de ferro	- 47 -
4.5.3	Presença / Ausência de bactérias redutoras de sulfato.....	- 48 -
4.5.4	Isolamento de Fungos.....	- 49 -
4.5.5	Identificação de microrganismos	- 49 -
5	RESULTADOS	- 53 -
5.1	UHE - Balbina.....	- 53 -
5.1.1	Biofilme.....	- 56 -
5.1.2	Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).....	- 58 -
5.1.3	Bactérias Oxidante do Ferro.....	- 59 -
5.1.4	Bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas.....	- 60 -
5.1.5	Fungos.....	- 61 -
5.2	UHE – Salto Pilão	- 65 -
5.2.1	Biofilme.....	- 66 -
5.2.2	Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).....	- 67 -
5.2.3	Bactérias Oxidante do Ferro.....	- 71 -
5.2.4	Bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas.....	- 72 -
5.2.5	Fungos.....	- 73 -
6	DISCUSSÃO.....	- 75 -
7	CONCLUSÕES.....	- 83 -
8	TRABALHOS FUTUROS.....	- 85 -
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 84 -
	ANEXO A.....	- 92 -

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta, sob o ponto de vista climatológico, condições altamente favoráveis ao desenvolvimento de biofilmes sobre as superfícies de materiais imersos em águas naturais, não necessariamente de origem marinha. Estes biofilmes podem originar as condições necessárias para o desenvolvimento de microrganismos capazes de produzir substâncias que causam corrosão nos metais e degradação das estruturas de concreto e madeira. A forma de corrosão gerada é, geralmente, do tipo localizada, altamente perigosa, já que sua detecção é difícil e muitas vezes só acontece quando ocorre a falha mecânica da estrutura.

No entanto, não existem muitos estudos sobre o tema no País, sendo que apenas nas últimas duas décadas se começou a dar a devida importância aos problemas causados pela biocorrosão e o *biofouling*. Estes processos vêm sendo melhor compreendidos devido à interação de disciplinas tão díspares como a Microbiologia, a Eletroquímica, o Estudo das superfícies e a Ciência dos materiais.

A matriz energética brasileira compreende: hidrelétricas, termoelétricas (gás, petróleo, biomassa, nuclear e carvão mineral) e centrais geradoras eólica e solar. Porém, dentre todas estas fontes, 76% da produção de energia brasileira é oriunda de hidrelétricas, com apenas 766 Centrais Geradoras (Hidrelétricas) do total de 2022 (Centrais Geradoras) já instaladas (ANEEL, 2009). Um dos grandes problemas enfrentados por Centrais Geradoras Hidrelétricas é a formação de biofilmes sobre a superfície de metais submersos e em contato com a água do reservatório, principalmente as peças fabricadas com aço carbono.

Diversos setores são afetados pela corrosão influenciada por microrganismos (CIM): indústrias em geral, tubulações e vedações de tanques de combustível (BEECH; GAYLARDE, 1999). A CIM é o processo eletroquímico de dissolução metálica iniciada ou acelerada por microrganismos, principalmente bactérias redutoras de sulfato (BRS).

O isolamento e a identificação de microrganismos envolvidos na biocorrosão de metais constituem importantes ferramentas para o entendimento do processo. De acordo com “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (1974), existem poucos registros do isolamento de microrganismos relacionados à biocorrosão (bactérias oxidantes do ferro, bactérias sulfato redutoras e bactérias oxidantes do enxofre), devido a dificuldade em se isolar e manter este tipo de cultura. Estes normalmente são identificados *in situ* ou associados a outros microrganismos, podendo ser identificados através de microscopia, com diferentes métodos de coloração (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000). Estratégias para o isolamento de alguns microrganismos de interesse envolvem variações de fonte de carbono e nitrogênio, além de vários aceptores de elétrons (APHA; AWWA; WPCF, 1999).

Uma opção para a detecção destes microrganismos é o emprego de ferramentas de biologia molecular (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000), como a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para sequências de Bactérias Redutoras de Sulfato. Com a aplicação desta metodologia pode-se identificar microrganismos presentes em amostras de biofilme sem a necessidade de seu isolamento, já que a obtenção de culturas puras destes organismos é extremamente laboriosa, devido ao grau de exigência nutricional e fisiológica. Grupos de bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem ser encontrados a partir da purificação de DNA total de uma amostra ambiental e posterior amplificação com oligonucleotídeos complementares específicos a porções das sequências do DNAr 16S (DEVEREUX, et al., 1992).

Desta forma ressalta-se a importância no desenvolvimento de metodologia para isolar e identificar microrganismos associados à corrosão, bem como padronizar metodologias para isolamento de bactérias redutoras de sulfato, de modo a propiciar a detecção mais rápida destes microrganismos. Os resultados obtidos visam fornecer subsídios ao desenvolvimento de estratégias para minimizar os danos causados pelo *biofouling* e biocorrosão em diferentes materiais.

2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo principal a caracterização dos biofilmes formados sobre as superfícies dos metais, em corpos de prova instalados em diversos pontos de coleta (Usina Hidrelétrica de Balbina – Presidente Figueiredo/AM e Usina Hidrelétrica de Salto Pilão – Ibirama/SC) e retirados em diferentes períodos do ano.

E como objetivos específicos:

- a. Caracterização de biofilme formado sobre corpos de prova (Cp's) através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV),
- b. Padronização de metodologias para detectar e isolar os microrganismos relacionados à corrosão de amostras de corrosão extraídos dos (Cp's),
- c. Identificação de bactérias por: morfologia (microscopia ótica e MEV), provas bioquímicas e Reações de amplificação por oligonucleotídeos específicos (*primers*),
- d. Identificação de fungos por macromorfologia, micromorfologia (microscopia ótica e MEV), sequenciamento de região ITS do DNA ribossomal
- e. Investigar os microrganismos que atuam no processo de corrosão influenciada por microrganismos (CIM) na UHE-Balbina, Presidente Figueiredo (AM),
- f. Prever a corrosão influenciada por microrganismos (CIM) da Usina Hidrelétrica de Salto Pilão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As perdas econômicas geradas pela corrosão influenciada por microrganismos (CIM) nos revestimentos metálicos de tubulações não são oficialmente dimensionadas. Entretanto, dados oriundos de companhias individuais ou setores da indústria fornecem uma visão aproximada do problema (BEECH; GAYLARDE, 1999).

Diversos setores são afetados pela biocorrosão: indústrias em geral (naval, petroquímica, de bioprocessos, química, refinarias, etc.), tubulações enterradas, vedações de tanques de combustíveis em aviões e navios, usinas de geração de energia (termoelétricas, hidrelétricas, nucleares, etc.).

O isolamento e a identificação de microrganismos envolvidos na biocorrosão de metais constituem importantes ferramentas para o entendimento do processo. Com a compreensão das relações existentes entre estes microrganismos e seu metabolismo dentro do biofilme, estratégias poderão ser determinadas para reduzir seus efeitos, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas nos setores industriais e de produção de energia.

3.1 Corrosão Influenciada por Microrganismos (CIM)

A corrosão ocorre de forma natural em superfícies metálicas mergulhadas, ou não, em líquidos e sob a influência de oxigênio (FIGURA 1). Os metais são normalmente encontrados na sua forma oxidada, com exceção dos metais nobres. A corrosão é um fenômeno eletroquímico de dissolução do metal em contato com outro meio (ar, água, etc.) (COETSER; CLOETE, 2005; DINH et al., 2004).

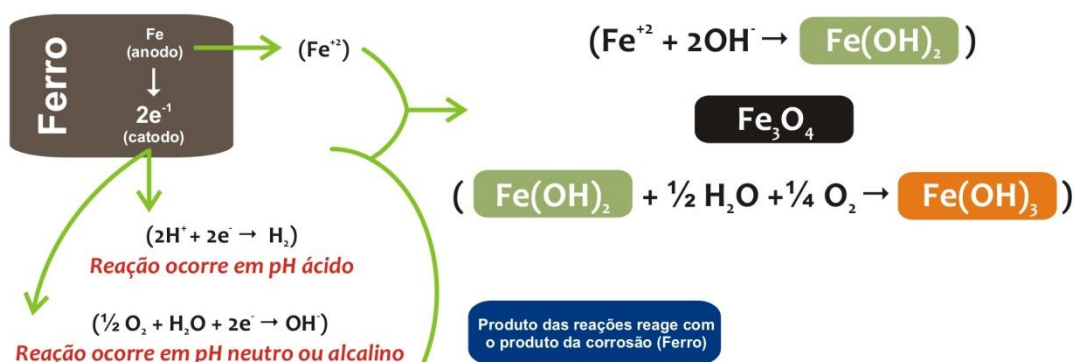


FIGURA 1 – Corrosão Abiótica (Eletroquímica), sem a influência de microrganismos.

Fonte: Autor

A corrosão microbológica, ou biocorrosão, é o processo eletroquímico de dissolução metálica iniciada ou acelerada por microrganismos. Denomina-se genericamente *fouling*, ou acumulação, a formação de depósitos sobre a superfície de equipamentos. Esses depósitos têm como efeito negativo uma importante diminuição da eficiência e da vida útil do equipamento. A palavra *biofouling*, refere-se ao acúmulo indesejável de depósitos biológicos sobre uma superfície, esse depósito podendo conter microrganismos e/ou macrorganismos (HEITZ; FLEMING; SAND, 1996).

3.2 Biofilme

Em geral, o *biofouling* resulta do acúmulo de biofilmes. Um biofilme é constituído por células imobilizadas sobre um substrato, incluídas em uma matriz orgânica de polímeros extracelulares produzida por microrganismos e genericamente denominada material polimérico extracelular (MPE). O comportamento das bactérias sésseis é diferente daquele apresentado por bactérias de vida livre e das cultivadas em meios seletivos de isolamento. O metabolismo bacteriano é diferenciado devido à presença de outros microrganismos e da nova condição adotada (fixação em superfície). Um exemplo de modificação do metabolismo é a produção de metabólitos poliméricos (MPE), secretados por estes microrganismos (COETSER e CLOETE 2005). O *biofouling* pode ocorrer tanto em

fluxos turbulentos como em águas paradas, sobre diversos tipos de superfícies, metálicas ou não, lisas ou em fissuras (crevices) (VIDELA, 2003).

Sobre um metal em contato com águas, ocorrem processos biológicos, que produzem o *biofouling*, e processos inorgânicos, cujo resultado é a corrosão. Ambos os fenômenos modificam de forma intensa o comportamento da interfase metal/solução. Os processos biológicos (*biofouling*) e os processos inorgânicos (corrosão) ocorrem de forma simultânea, mas seguem direções opostas. O *biofouling* é um processo de acumulação que se dirige do seio do líquido para a superfície metálica, já a corrosão transcorre no sentido oposto, da superfície metálica (que se dissolve) para o seio do fluido. Como consequência de ambos os processos, forma-se uma nova interfase metal/solução, onde ocorre o desenvolvimento da corrosão microbiológica (VIDELA, 2003).

Uma das teorias que explica a formação de biofilmes é a descrita por Marshall, Stout e Mitchell (1971), a qual ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície através de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzida pela bactéria, denominado glicocálix, que suporta a formação de biofilmes (FIGURA 2). O glicocálix favorece o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e a parte externa, membrana externa, das Gram-negativas (PARIZZI, 1998).

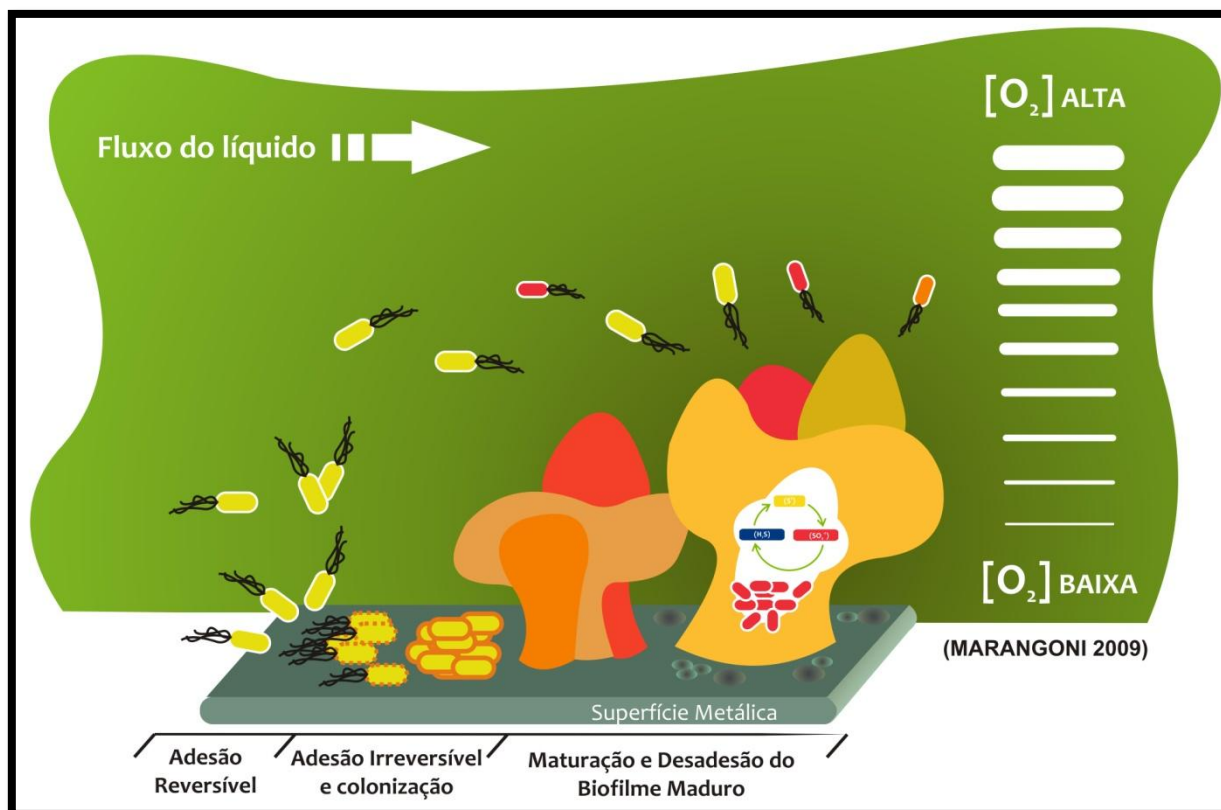


FIGURA 2 – Formação de biofilme em superfície metálica.

Fonte: Autor

Vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não só da fisiologia do microrganismo, mas também da natureza do substrato (SURMAN; MORTON; KEEVIL, 1996). Segundo Wicken (1985), citado por Costa (1999), as células bacterianas, possuem carga negativa; nas Gram-positivas a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix, enquanto nas Gram-negativas é oriunda dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto com os polímeros do glicocálix.

3.3 Caracterização das águas superficiais do território brasileiro

Em relação às características das águas, estas dependem do tipo de afluentes, do material geológico que constitui a base do reservatório, da proximidade do reservatório de zonas industriais, habitadas ou de produção agrícola e das

condições climáticas. Em zonas tropicais e subtropicais ou, em geral, de grande vegetação, graves problemas podem surgir durante os anos iniciais de vida do reservatório de usinas Hidrelétricas. O principal problema é representado pelos processos de degradação do material orgânico, que gera altas concentrações de H₂S (ácido sulfídrico), devido ao processo de submersão que esta vegetação é submetida quando está se formando o reservatório. Estes tipos de fenômenos fazem com que as águas dos reservatórios alterem sua composição, por exemplo aumento na concentração de ácidos fúvicos, crescente emissão de metano e/ou aumento na concentração de ácido sulfídrico. Somada às variações periódicas anuais e dependendo da região climática onde se encontra situada a usina Hidrelétrica, o processo de degradação é agravado (MACIEL, 1982).

Nos climas com grandes oscilações, a temperatura da água da superfície (região do epilímnio), no verão, está acima da temperatura da zona mais profunda do reservatório (região do hipolímnio), e, no inverno, está abaixo da mesma. Ocorrem duas épocas do ano em que, por existir baixo gradiente de temperatura, existem pequenas diferenças de densidade com a profundidade. Dessa forma se produz uma homogeneização destas águas no reservatório. Em climas tropicais ou subtropicais, dado que a temperatura do epilímnio quase nunca chega a ser menor que a temperatura do hipolímnio, no máximo se aproxima desta no inverno, a homogeneização da água pode chegar a se produzir só uma vez ao ano. Em muitos casos, nestas zonas, existe grande tendência para que a água do reservatório permaneça continuamente estratificada. Isto se traduz na existência de um epilímnio oxigenado com alta temperatura e baixa densidade e um hipolímnio com temperaturas menores, alta densidade, baixo conteúdo de oxigênio e com gases tipo H₂S, NH₃ e CO₂, produzidos pela degradação do material orgânico (MACIEL, 1982).

Nas zonas tropicais e subtropicais, esta estratificação chega a ser de tal ordem, principalmente na primeira década de funcionamento do reservatório (dependendo do grau de desmatamento prévio na região do mesmo), que a concentração de H₂S atinge muitas vezes níveis inaceitáveis. Tudo isto faz com que, nestas regiões, em casos de grande estratificação, encontre-se um epilímnio com potenciais redox oxidantes e um hipolímnio com potenciais redox redutores. Além

disso, possuem alto conteúdo de H₂S principalmente nos primeiros anos do reservatório, gerando-se, em ambos os casos, condições corrosivas (MACIEL, 1982).

3.4 Fisiologia microbiana

“Como destacaram Ehrlich (1981) e Rossi (1990), a descoberta da bactéria *Gallionella ferruginea* como agente responsável por depósitos ocre de ferro em pântanos, feita por C. S. Ehrenberg em 1838, pode ser considerada marco inicial dessa área da ciência (MELO; AZEVEDO, 1997 *apud* Ehrlich, 1981 e Rossi, 1990)”

Muitas bactérias relacionadas ao processo de corrosão fazem parte do ciclo do enxofre na natureza (FIGURA 3). Este ciclo é composto por microrganismos com diversidade metabólica, capazes de metabolizar compostos de enxofre por duas formas: Quimioautotrófica e Quimioheterotrófica.

Os quimioautotróficos utilizam os elétrons de compostos orgânicos reduzidos como fonte de energia, utilizando CO₂ como sua principal fonte de carbono. As fontes inorgânicas de energia incluem sulfeto de hidrogênio (H₂S) para *Beggiatoa*; enxofre elementar (S) para *Thiobacillus thiooxidans*; íons ferro (Fe²⁺) para *Thiobacillus ferrooxidans*. A energia derivada da oxidação destes compostos inorgânicos é eventualmente armazenada em ATP, que é produzido pela fosforilação oxidativa (COETSER; CLOETE, 2005).

Os quimioheterotróficos utilizam especificamente elétrons a partir de átomos de hidrogênio de compostos orgânicos como fonte de energia. Esta categoria de microrganismos pode utilizar vários compostos como aceptores finais da cadeia respiratória: nitrato, nitrito, sulfato, Fe³⁺, enxofre, exceto oxigênio (respiração anaeróbica) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). Alguns podem utilizar fumarato e piruvato, por exemplo, e, originalmente, foram classificados em dois gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfomaculum*, pertencentes ao grupo das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).

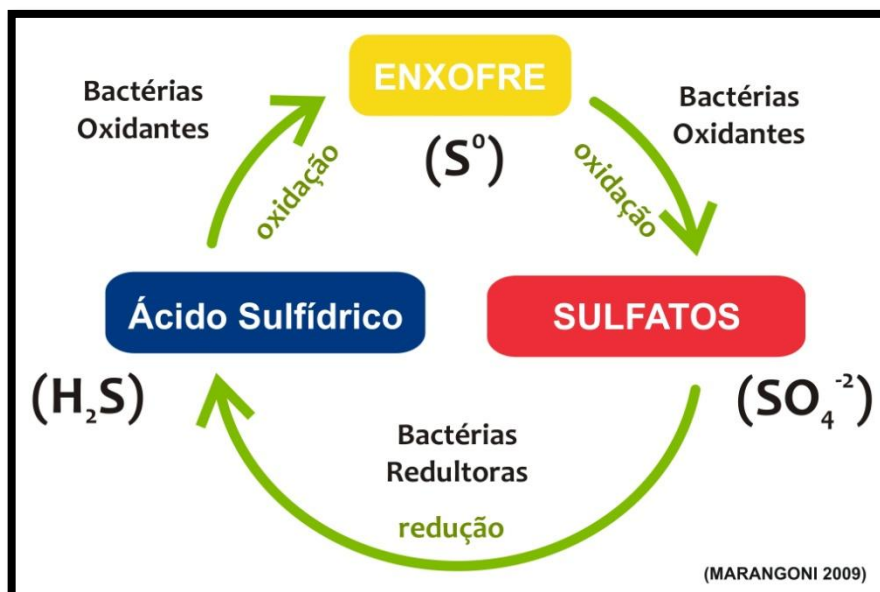


FIGURA 3 – Ciclo do enxofre com atuação de Bactérias oxidantes e redutoras de sulfato.

Fonte: Autor

3.5 Microrganismos envolvidos com a biocorrosão

A detecção de microrganismos associados à corrosão normalmente está condicionada ao seu isolamento, culturas puras e identificação. Porém, no caso de “Bactérias redutoras de sulfato (BRS)”, “Bactérias oxidantes do ferro” e “Bactérias oxidantes do enxofre”, estas exigem condições especiais para seu isolamento, dificultando sua identificação (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000). As BRS são um exemplo claro desta limitação, já que são anaeróbicas estritas e exigem ausência total de oxigênio.

Com a utilização de técnicas de biologia molecular pode-se acelerar o processo de detecção destes microrganismos. Utilizando-se o DNA total extraído de amostras de corrosão (tubérculos), coletados das superfícies metálicas, tanto de corpos de provas (CP's) quanto de equipamentos, e iniciadores específicos, através de PCR (*Polimerase chain reaction*) amplifica-se o fragmento alvo que irá detectar a presença do microrganismo na amostra. Esta técnica permite determinar qual tipo de bactéria está envolvida na corrosão que está danificando os equipamentos. E muito importante, em um menor tempo para se obter resultados (DEVEREUX et al., 1992).

3.5.1 Bactérias Oxidantes do Enxofre

Bactérias do Gênero *Thiobacillus* sp são capazes de oxidar enxofre produzindo ácido sulfúrico. Diversas reações de oxidação provocadas por estas bactérias estão relacionadas a processos de biocorrosão que utilizam enzimas específicas, ligadas a um sistema de transporte de elétrons, em que o oxigênio atua como receptor final. Estes microrganismos podem gerar grandes quantidades de ácido sulfúrico (H_2SO_4) como resíduo de seu metabolismo. Este irá compor a gama de materiais que estão agredindo o metal e expondo cada vez mais íons Fe^{2+} (íon ferroso) para outras classes de microrganismos, por exemplo bactérias oxidantes do ferro (COETSER; CLOETE, 2005).

Reações de oxidação parcial de sulfeto, enxofre elementar e oxi-ânions de enxofre são frequentes em associações microbianas, em que participam também as bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato, de reconhecida corrosividade. *Thiobacillus ferroxidans* está relacionado com as bactérias oxidantes de ferro por sua capacidade de oxidar compostos inorgânicos de íons ferrosos e também por obter energia da oxidação do tiosulfato (VIDELA, 2003).

Estes microrganismos são capazes de crescer na presença e ausência do oxigênio, utilizam o CO_2 como fonte de carbono e podem crescer em anaerobiose, utilizando nitratos como receptores de elétrons. Acidificam o meio através da oxidação de sulfetos ou enxofre e produzem ácido sulfúrico. Essa elevada acidez confere grande agressividade à superfície onde se encontra instalado o biofilme (FIGURA 4).

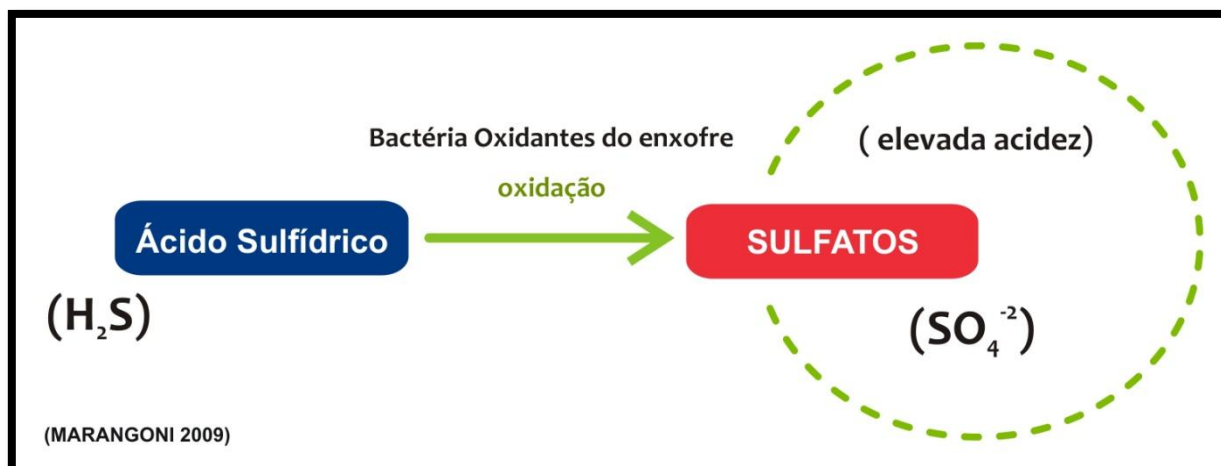


FIGURA 4 – Reação de oxidação influenciada por bactérias oxidantes do enxofre.

Fonte: Autor

3.5.2 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Diversos modelos foram estabelecidos para explicar os mecanismos que as BRS utilizam para acelerar a corrosão de superfícies metálicas: despolarização catódica por hidrogenase (BRYANT et al., 1991), despolarização anódica (SALVAREZZA; De MELE; VIDELA, 1984; DAUMAS; MASSIANI; CROUSIER, 1988; CROLET, 1992), sulfetos (LITTLE; WAGNER; LEWANDOWSKI, 1998), componentes fosforosos voláteis (IVERSON; OLSON, 1983), sulfetos induzindo stress e rompimento por corrosão (EDYVEAN et al., 1998), hidrogênio induzindo rompimento (EDYVEAN et al., 1998) e exopolímeros com ferro ligado (BEECH; CHEUNG, 1995; BEECH; GAYLARDE, 1999; BEECH et al., 1996, 1998).

Além destes mecanismos, existe a atividade redutora de sulfato. Os sulfetos produzidos são corrosivos, no entanto, alguns derivados químicos dos sulfetos não possuem o mesmo grau de corrosividade (MCNEIL; LITTLE, 1990; THOMAS; EDYVEAN; BROOK, 1988), demonstrando a importância dos bioprocessos e a irrelevância de experimentos que não levam em consideração o fator microbiológico.

A hidrogenase de *Desulfovibrio vulgaris* é regulada pelo íon ferroso (Fe^{2+}), disponibilizando outro mecanismo para a corrosão, demonstrado por Cheung e Beech (1996). No entanto, o mecanismo de influência dos íons ferro na corrosão

influenciada por bactérias redutoras de sulfato (BRS) é um mecanismo complexo (VIDELA, 2002) (FIGURA 5).

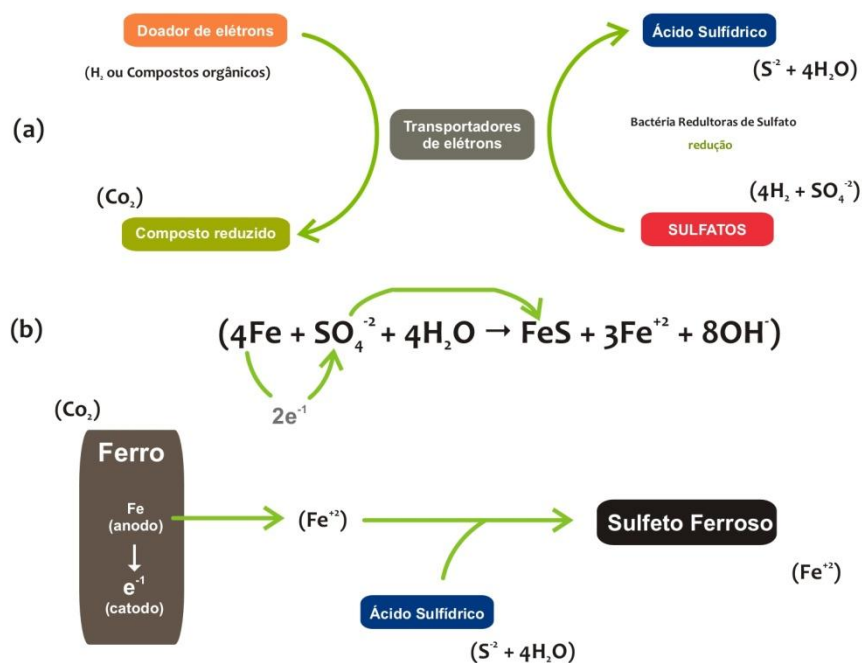


FIGURA 5 – Reações envolvidas com as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) no processo de corrosão influenciada por microrganismos. Esquema de reação utilizando hidrogenase para redução de sulfato por bactérias redutoras de sulfato (a) e reação de formação sulfeto ferroso que é utilizada para identificação indireta da presença do grupo BRS em meio seletivo (b).

Fonte: Autor

3.5.3 Bactérias Oxidantes do Ferro

Essas bactérias de grande diversidade estrutural apresentam a capacidade de oxidar o íon forma ferroso a férrico. Além da influência sobre a corrosão através dos metabólitos gerados, são capazes de produzir flóculos e depósitos de *fouling* inorgânico e biológico nos sistemas de águas industriais, contribuindo para falha mecânica em diversos equipamentos industriais (COETSER; CLOETE, 2005). Os gêneros das ferrobactérias mais comuns que causam problemas quando presentes na água são: *Sphaerotillus*, *Leptothrix*, *Crenothrix* e *Gallionella*. Os três primeiros gêneros se caracterizam pelo arranjo filamentososo de suas células, que são

envolvidas por uma bainha helicoidal perpendicular ao eixo da célula, daí receberem também a denominação de bactérias com bainha. As bactérias do gênero *Gallionella* são unicelulares, retiformes ou encurvadas e segregam um filamento longo (apêndice), em forma de fitas entrelaçadas, a partir do hidróxido férrico depositado na célula, dissolvem-se em ácidos fortes e quando desprendem-se, aumentam a quantidade de sólidos em suspensão, como na água de refrigeração (VIDELA, 2003).

A presença de ferrobactérias em águas de abastecimento de tanques e reservatórios pode ocasionar aspecto, sabor e odor desagradáveis (decorrentes da decomposição bacteriana). Estas bactérias também estão associadas com a formação de tubérculos e corrosão de superfícies metálicas (BEECH et al., 1998).

Em águas superficiais poluídas, as bactérias do gênero *Sphaerothilus* sp, em especial *S. natans*, formam tufos de filamentos que, além de apresentar odor e aspecto desagradável, causam problemas em filtros e canaletas. Estes filamentos formam flocos imensos de bactérias. Em tanques, com a presença excessiva do organismo, ocorre a formação de uma espécie de lodo flutuante, conhecido como *bulking*. Tal fenômeno é decorrente da má aeração, sobrecarga de nutrientes orgânicos e voláteis, aliados a própria característica (composição férrica) do solo (CARAVELLI; GIANNUZZI; ZARITZKY, 2008).

São essas bactérias (*Gallionella* sp, por exemplo) que na presença de oxigênio, oxidam o íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}) liberando energia e depositando o hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) marrom-alaranjado (VIDELA, 2003) (FIGURA 6).

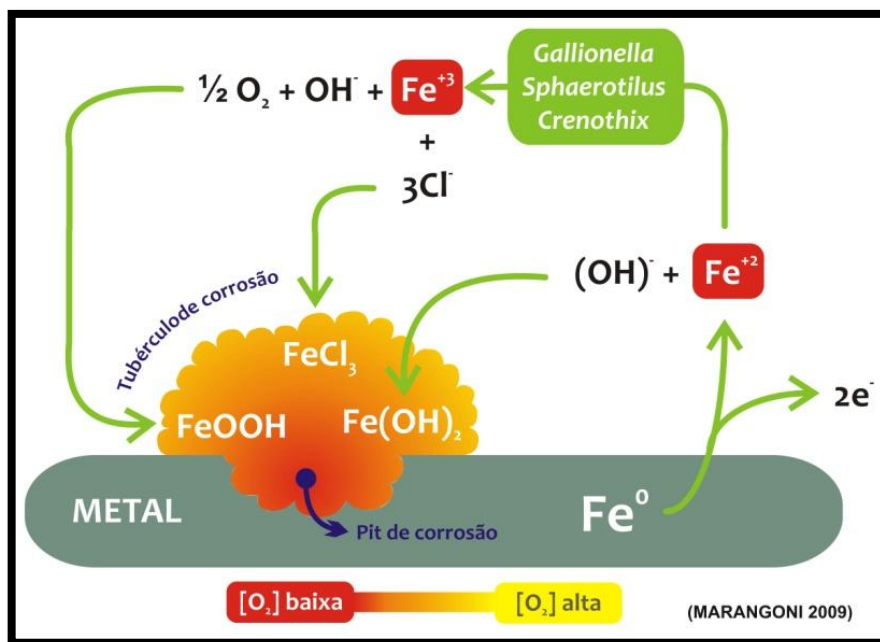


FIGURA 6 – Representação esquemática do processos eletroquímicos e biológicos envolvidos na corrosão influenciada por bactérias oxidantes do ferro.

Fonte: Autor

3.5.4 *Bacillus*, Enterobactérias e *Pseudomonas*

Na formação de biofilmes, as bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas possuem a característica de serem colonizadoras iniciais, sendo responsáveis pela alteração da superfície e criação de um ambiente favorável à adesão de outros microrganismos em fases posteriores, através da excreção de material polimérico extracelular (Exopolímero – MPE).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão estão: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp e *Enterococcus faecium* (CRIADO; SUÁREZ; FERRERÓS, 1994; ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998; LERICHE; CARPENTIER, 1995). Microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* também podem estar envolvidos nestes processos (SURMAN;

MORTON; KEEVIL, 1996; LERICHE; CARPENTIER, 1995; SMITH; FRATÂMICO, 1995).

Estas bactérias podem não causar problemas quando estão livres, mas a formação de um biofilme as aproxima e permite que a secreção de um sinal molecular potencialize os efeitos do metabolismo destas, podendo influenciar na corrosão de superfícies metálicas. *Pseudomonas aeruginosa* é um exemplo de microrganismo que tem sua virulência aumentada quando está associado a um biofilme e este fator está diretamente ligado a sinais moleculares conhecidos como *Quorum sensing* (QS) (RAMPONI et al., 2007).

3.5.4.1 Bacillus

As espécies de *Bacillus* são de natureza ubíqua e colonizam o solo, a água e o pó do ar. Além disso, podem ser parte da microbiota intestinal normal do homem e de outros animais (KONEMAN et al., 2001).

A maioria das espécies desse gênero são saprófitas. Entretanto, algumas espécies são oportunistas ou patógenos obrigatórios de humanos e outros animais. Os principais habitats são solos de todos os tipos (pH de ácido a alcalino, temperatura de quente a fria, e fértil a desértico), colunas de águas e fundos depósitos de água doce ou salgada (MURRAY et al., 2003).

3.5.4.2 Enterobactérias

Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae estão amplamente dispersas na natureza e podem ser encontradas em solo, água, plantas e no trato digestório de humanos e outros animais (KONEMAN et al., 2001).

Algumas espécies ocupam nichos ecológicos limitados, como *Salmonella typhi*, presente somente em humanos. Outras, como *Klebsiella pneumoniae*, estão bem distribuídas no ambiente, contribuindo para processos bioquímicos e geoquímicos. Além disso, esse grupo possui importância clínica devido ao fato de

ser responsável por um grande número de infecções em humanos (MURRAY et al., 2003).

3.5.4.3 *Pseudomonas*

Pseudomonas sp é uma bactéria Gram-negativa mundialmente distribuída, com preferência por ambientes úmidos. São encontradas na água, no solo e em plantas, incluindo vegetais e frutas (algumas espécies são muito conhecidas por serem fitopatógenos). Microrganismos desse grupo possuem a habilidade de sobreviver em ambientes aquosos, particularmente *P. aeruginosa*, que pode ser encontrada em piscinas e em tubulações (MURRAY et al., 2003)

3.5.5 Fungos

Os fungos são microrganismos eucariotos, capazes de crescer sobre todos os substratos e ambientes, desde rochas (WARSCHEIDT; BRAAMS, 2000), superfícies metálicas, e até sobre e no interior de diversas espécies de plantas. Muitos são capazes de metabolizar compostos orgânicos como madeira, tinta, papel e polímeros de borracha (GÖRS et al., 2007), produzindo solventes orgânicos como ácidos e álcoois que favorecem a biocorrosão.

3.6 Técnicas moleculares

A utilização da biologia molecular como ferramenta para a investigação da ocorrência e distribuição de microrganismos no ambiente apresenta uma vantagem em relação à microbiologia convencional. As técnicas empregadas podem apresentar um perfil detalhado da comunidade onde estão inseridos os microrganismos de interesse, ao invés de apenas fornecer dados sobre uma pequena fração do biofilme (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000).

A análise fenotípica baseia-se na caracterização morfológica e/ou bioquímica e identifica o microrganismo até gênero e podendo ocorrer identificação até espécie em alguns casos. As técnicas moleculares, por outro lado, auxiliam na diferenciação dos grupos de microrganismos, fornecendo informações diretas do DNA do indivíduo. Dessa forma, a biologia molecular vem sendo utilizada para diferenciação

de indivíduos e caracterização filogenética dos microrganismos de interesse (STRINGARI, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações, tanto em pesquisa básica como aplicada. Por meio da PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas (MULLIS; FALOONA, 1987). A PCR é um método “*in vitro*” para amplificação de material genético. Isto ocorre porque através de uma pequena quantidade de ácido nucleico obtém-se uma grande quantidade de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos (SAIKI et al., 1988; MULLIS; FALOONA, 1987).

A PCR é uma ferramenta composta basicamente de dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às sequências das fitas opostas do DNA alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado. Possui grande sensibilidade devido à possibilidade de se amplificar quantidades mínimas de ácido nucleico, os oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) auxiliam a iniciação da replicação das cópias do fragmento alvo, com a extremidade 3'-OH das sondas hibridizadas uma em direção oposta a outra e posicionadas para moldar a síntese de DNA através do DNA molde (LANE et al., 1985).

A partir do conceito básico de PCR, são vários os desdobramentos possíveis da metodologia quando associadas a outras ferramentas moleculares, como: detecção de genes em um DNA genômico, sequenciamento, quantificação de sequências específicas, análise de expressão gênica pela amplificação a partir de mRNA; análise da estrutura de genomas; análise de interações DNA-proteína; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo; diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias; identificação de anormalidades cromossômicas; mutações somáticas específicas e terapia gênica (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; NEIVA, 2007)

As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e atributos como consistência, tempo de obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a escolha de uma técnica adequada. Os ácidos ribonucleicos ribossômicos (RNAr) são considerados os biopolímeros mais indicados para estudo de diversidade, pois seus genes são

universalmente distribuídos e apresentam elevado grau de conservação. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985; NEIVA, 2007)

A ribotipagem pode ser utilizada tanto para fungos quanto para bactérias, mas cada uma possui um alvo específico para detecção de variabilidade genética. Nos fungos são analisadas as regiões inter-espçadoras "ITS1" e "ITS2", que estão situadas entre os genes 18S, 5S e 28S. Em bactérias as regiões conservadas são os genes 16S e 23S, portanto para análise de variabilidade amplifica-se a região intergênica 16-23S, que é variável (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

Para identificar microrganismos e suas relações filogenéticas pode-se associar as tecnologias de PCR e sequenciamento de ácidos nucleicos. Dessa forma pode-se realizar a identificação de fungos e bactérias de forma mais rápida e, principalmente, microrganismos não cultiváveis ou de metabolismo extremamente exigente, como exemplo bactérias redutoras de sulfato (DEVEREUX; HINES; STAHL, 1996).

Existem várias metodologias para se detectar a variabilidade genética presente em amostras, algumas quantitativas e outras qualitativas. A utilização de *primers* específicos, sondas marcadas com fluorescência, enzimas de restrição, análise de plasmídeos, têm possibilitado a evolução destas metodologias. Para quantificar um determinado microrganismo pode ser utilizada a PCR em tempo real (*Real-time PCR*), já sua identificação pode ser realizada via Nested-PCR ou Ribotipagem, utilizando as regiões intergênicas de bactérias (16S-23S) ou regiões inter-espçadoras em fungos (ITS1 e ITS2) (DEVEREUX et al., 1992; DALY; SHARP; McCARTHY, 2000; NEIVA, 2007).

A utilização do sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S (ITS) baseia-se na existência de sequências altamente conservadas nos genes DNAr da subunidade menor dos ribossomos (RNAr 16S) de todas as bactérias e sequências intersticiais variáveis nessas moléculas que são espécie-específicas. A molécula de RNAr 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação. A amplificação, pelo PCR, de sequências de DNA

complementares a sequências variáveis do DNAr 16S de um microrganismo desconhecido e sua comparação com sequências variáveis do RNAr 16S de espécies conhecidas, fornece informação suficiente ou para identificá-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou colocá-lo em uma nova espécie (NEIVA, 2007).

No caso da análise de diversidade intraespecífica, em que existe elevado grau de semelhança genética entre os indivíduos, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S DNAr. Esta região apresenta maior variabilidade, tanto em sua composição de bases quanto em seu tamanho, quando comparada com a 16S ou 23S DNAr (REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006).

3.7 Centrais Geradoras de Energia Elétrica - Brasil

Centrais Geradoras Hidrelétricas produzem energia elétrica através do aproveitamento do potencial hidráulico existente em um rio. O Brasil possui o terceiro maior potencial elétrico do mundo através de Hidrelétricas, ficando atrás apenas do Canadá e dos Estados Unidos da América (ANEEL, 2009).

A energia elétrica é gerada na Central Geradora Hidrelétrica e lançada na rede de energia, que possui as cargas (pontos de consumo) e os geradores (pontos de produção). Os grupos geradores podem ser: Central Geradora Hidrelétrica (CGH), Central Geradora Eolielétrica (EOL), Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH), Central Geradora Solar Fotovoltáica (SOL), Usina Hidrelétrica de Energia (UHE), Usina Termelétrica de Energia (UTE) e Usina Termonuclear (UTN).

Atualmente o Brasil possui no total 2022 empreendimentos em operação, gerando 103 GW de potência (QUADRO 1). A previsão para os próximos anos é de um adicional de 37 GW na capacidade de geração do país, através de 143 empreendimentos atualmente em construção (QUADRO 2) e mais 442 outorgados (QUADRO 3).

QUADRO 1 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Operação no Brasil

TIPO	QUANTIDADE	POTÊNCIA OUTORGADA (kW)*	POTÊNCIA FISCALIZADA (kW)†	%‡
CGH	276	154.026	153.425	0,15%
EOL	26	362.130	359.580	0,35%
PCH	330	2.534.198	2.465.519	2,40%
SOL	1	20	20	0,00%
UHE	160	74.732.627	74.901.031	72,85%
UTE	1.227	25.558.646	22.925.477	22,30%
UTN	2	2.007.000	2.007.000	1,95%
TOTAL	2.022	105.348.647	102.812.052	

FONTE: ANEEL (2009)

*A Potência Outorgada é igual a considerada no ato de Outorga

†A Potência Fiscalizada é igual a considerada a partir da operação comercial da primeira unidade geradora

‡Os valores de porcentagem são referentes a Potência Fiscalizada.

QUADRO 2 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Construção no Brasil

TIPO	QUANTIDADE	POTÊNCIA OUTORGADA (kW)*	%†
CGH	1	848	0,01%
EOL	14	391.700	3,07%
PCH	70	1.131.215	8,87%
UHE	23	7.781.400	61,04%
UTE	35	3.442.438	27,00%
Total	143	12.747.601	

FONTE: ANEEL (2009)

*A Potência Outorgada é igual a considerada no ato de Outorga

†Os valores de porcentagem são referentes a Potência Fiscalizada.

QUADRO 3 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica Outorgadas que ainda não foram construídas no Brasil.

TIPO	QUANTIDADE	POTÊNCIA OUTORGADA (kW)*	%†
CGH	73	49.613	0,20%
CGU	1	50	0,00%
EOL	50	2.388.173	9,76%
PCH	152	2.255.843	9,22%
UHE	13	8.790.000	35,91%
UTE	153	10.990.921	44,91%
Total	442	24.474.600	

FONTE: ANEEL (2009)

*A Potência Outorgada é igual a considerada no ato de Outorga

†Os valores de porcentagem são referentes a Potência Fiscalizada.

A matriz energética brasileira compreende: hidrelétricas, termoelétricas (gás, petróleo, biomassa, nuclear e carvão mineral) e centrais geradoras eólica e solar, mas, de todas estas fontes, 76% da produção brasileira é oriunda de hidrelétricas com apenas 766 Centrais Geradoras do total de 2022 Centrais já instaladas (ANEEL, 2009).

O Quadro 4 exemplifica a capacidade de produção (MW) das principais Hidrelétricas do Brasil (ANEEL, 2009).

QUADRO 4 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica do Brasil por região

NOME DA USINA	LOCALIZAÇÃO	CAPACIDADE DE PRODUÇÃO (MW)*
Região Norte		
Tucuruí I e II	Rio Tocantins	8.370
Balbina	Rio Uatumã	250
Cana Brava	Rio Tocantins	450
Região Nordeste		
Paulo Afonso	Rio São Francisco	2.460
Sobradinho	Rio São Francisco	1.050
Moxotó	Rio São Francisco	439
Itaparica	Rio São Francisco	1.500
Xingó	Rio São Francisco	3.162
Região Sudeste		
São Simão	Rio Paranaíba	1.715
Água Vermelha	Rio Grande	1.396
Três Irmãos	Rio Tiête	808
Ilha Solteira	Rio Paraná	3.444
Porto Primavera	Rio Paraná	1.540
Jaguara	Rio Grande	426
Três Marias	Rio São Francisco	388
Cachoeira Dourada	Rio Paranaíba	658
Estreito	Rio Grande	1.050
Itumbiara	Rio Paranaíba	2.080
Região Sul		
Foz do Areia	Rio Iguaçu	1.676
Itaipu	Rio Paraná	12.600
Parigot de Souza	Rio Capivari	247
Itaúba	Rio Jacuí	625
Salto Osório	Rio Iguaçu	1.050
Machadinho	Rio Pelotas	1.140
Salto Santiago	Rio Iguaçu	1.420
Região Centro-Oeste		
Ilha Solteira	Rio Paraná	3.230
Itumbiara	Rio Paranaíba	2.080
Jupia	Rio Paraná	1.551

FONTE: ANEEL (2009)

*Os valores são referentes a Potência Fiscalizada.

3.7.1 Composição de Centrais Geradoras Hidrelétricas

As Centrais Geradoras Hidrelétricas são compostas basicamente pelo reservatório e casa de força, além destas duas estruturas existe a subestação elevadora e linhas de transmissão (FIGURA 7).

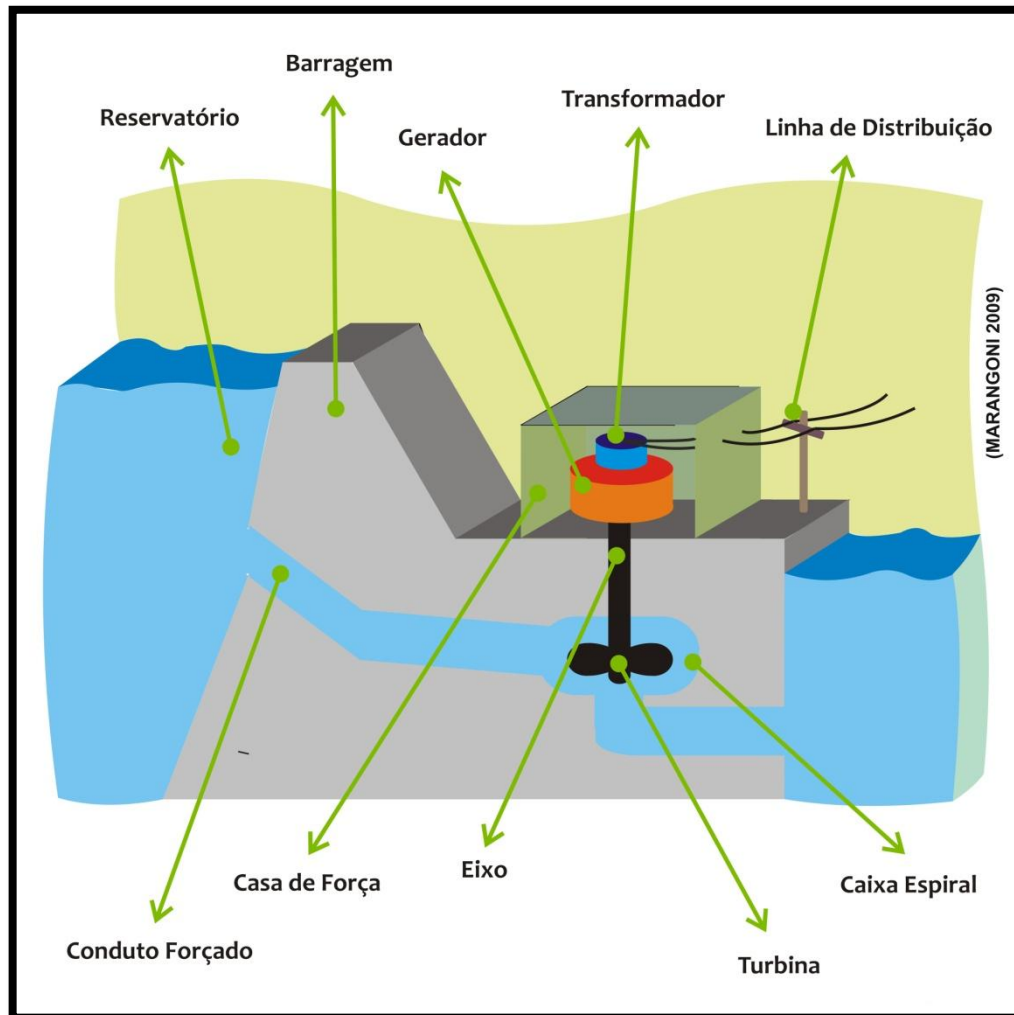


FIGURA 7 – Representação em corte da construção civil de uma Central Geradora Hidrelétrica.

Fonte: Autor

O **Reservatório** possui um volume útil que tem por objetivo regularizar a vazão do rio em uma determinada seção, dessa forma pode-se compensar períodos de estiagem, mantendo-se o volume necessário para a produção instalada. Quando a vazão do afluente é maior, aumenta-se a capacidade de se produzir uma

maior quantidade de energia elétrica, respeitando a capacidade máxima de produção (ANEEL, 2009).

A **Casa de Força** é o local onde se encontram instalados os equipamentos da Central Geradora. As turbinas instaladas neste local, recebem através das adutoras (conduto forçado) o fluxo de água do reservatório e convertem a energia potencial hidráulica do rio em energia elétrica através do movimento das turbinas. O eixo do gerador é movimentado pelas pás da turbina e movimentam imãs dentro do gerador, que irão gerar energia elétrica através do campo eletromagnético gerado dentro do fio bobinado no gerador (Estator) (QUITELA, 2007).

As turbinas dividem-se entre 4 tipos principais: Pelton, Francis, Kaplan e Bulbo. Cada uma delas é adaptada a determinada altura de queda, e a potência é produto da queda e da vazão volumétrica. O princípio de todas é semelhante, a água é levada à turbina através das adutoras (conduto forçado), dentro dela são movimentadas palhetas e, dependendo do tipo de turbina, existem sistemas móveis para aumentar ou diminuir potência. A água depois da passagem pela turbina é conduzida para o leito do rio a jusante da central hidrelétrica (QUITELA, 2007). São compostas pelas seguintes seções: *Caixa espiral, Pré-distribuidor, Distribuidor, Tubo de sucção, Rotor e Eixo*.

- **Caixa Espiral:** é uma tubulação de forma toroidal que envolve a região do rotor, fabricada com chapas de aço, é uma peça impossível de ser removida pois é integrada à estrutura civil da Usina. Está conectada ao conduto forçado (Adutora) e à secção de saída (Pré-distribuidor).
- **Pré-distribuidor:** a função desta secção é direcionar a água para o distribuidor reduzindo a turbulência da saída da água. Fabricado também com placas de aço carbono é soldado à caixa espiral.
- **Distribuidor:** sistema que pode funcionar manual ou automaticamente. Regula a vazão da água e, conseqüentemente, controla a potência da turbina.
- **Tubo de sucção:** normalmente com um diâmetro maior que o conduto forçado (adutora) para diminuir a turbulência da saída da água, esta secção devolve a água ao leito do rio (jusante).

- **Rotor e Eixo:** ocorre a conversão da energia potencial do rio em potência de eixo para movimentar o sistema de geração de energia no gerador.

São quatro os tipos principais de turbinas existentes:

- **Turbinas Pelton:** quedas de 350m até 1100m, trabalha com velocidades maiores que os outros modelos. Esta turbina possui 6 bocais e estes podem ser acionados independentemente e assim possui boa performance de funcionamento em diversas condições de operação (QUITELA, 2007).
- **Turbinas Francis:** operam em quedas entre 40m e 400m. A maioria das turbinas em Usinas brasileiras utilizam este tipo de turbina e com quedas de 100m a 150m (QUITELA, 2007).
- **Turbinas Kaplan:** são indicadas para quedas menores, 20m a 50m. Suas pás são móveis e assemelham-se a um propulsor de navio (QUITELA, 2007).
- **Turbinas Bulbo:** estas turbinas operam em quedas menores que 20m. São similares às turbinas Kaplan,mas atuam de forma horizontal e antes da água entrar em contato com as pás ela passa por um Bulbo devido a baixa queda para acelerar o fluxo de água (QUITELA, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área experimental

Os experimentos foram realizados na Usina Hidrelétrica de Balbina (UHE-Balbina) em Presidente Figueiredo, Amazonas (Figuras 8 e 9) e na construção da Usina Hidrelétrica de Salto Pilão (UHE-Salto Pilão) em Ibirama, Santa Catarina (FIGURA 10).

Na UHE-Balbina os pontos de coleta foram: captação de água do reservatório próximo ao conduto forçado da máquina 5 (próximo à margem direita do reservatório da UHE – Balbina, Área “A” conforme FIGURA 11) onde a captação de água ocorre a 10 m de profundidade; e captação de água do reservatório no conduto forçado da máquina 2 (próxima a margem esquerda do reservatório da UHE – Balbina, Área “C” conforme FIGURA 11) à profundidade de 10-15 m. Além desses pontos existem as tubulações de resfriamento de radiadores e trocadores de calor (Área “B” conforme FIGURA 11), onde a água é a mesma coletada no conduto forçado da máquina 2, mas com um tratamento prévio (cloração) para reduzir um grave problema com corrosão que existe nos equipamentos da estação de resfriamento dos equipamentos (trocadores de calor).



FIGURA 8 – UHE-Balbina, município de Presidente Figueiredo/AM – Rio Uatumã. Vista frontal da Usina Hidrelétrica de Balbina (a), Vista do lado esquerdo da UHE Balbina (b) e vertedouro do reservatório (c).

Fonte: Autor



FIGURA 9 – Visão interna da UHE – Balbina. Estatores 1 a 5 (a), Guindaste de serviço que se utiliza atualmente para a manutenção dos equipamentos (b) e transformadores de voltagem, visão externa (c).

Fonte: Autor



FIGURA 10 – Barragem UHE-Salto Pilão, acesso do túnel de captação de água para as turbinas.

Fonte: Crystian007 – Panoramio - <http://www.panoramio.com/photo/25252412>

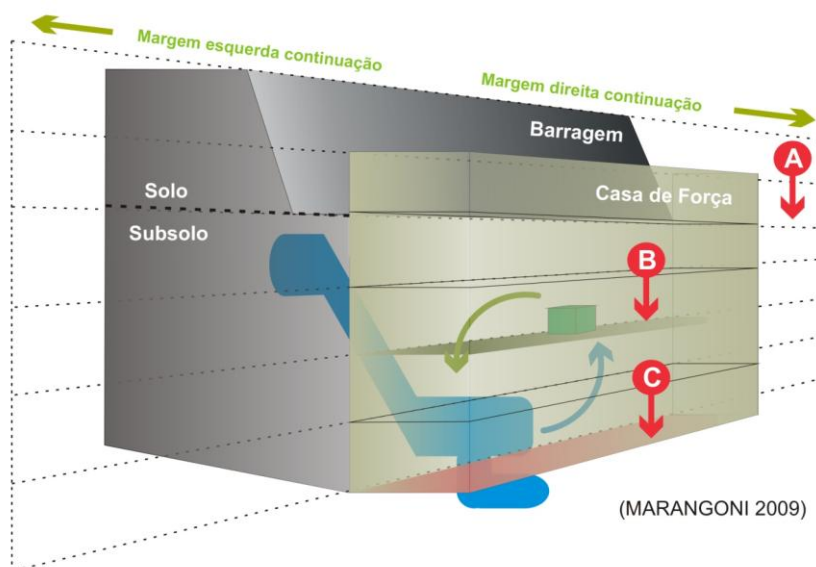


FIGURA 11 – Esquema de visualização do complexo UHE Balbina para representação da localização dos pontos de coleta do experimento. **Ponto A** – ponto de coleta próximo ao conduto forçado da máquina 5 (profundidade 10m), **Ponto B** - 3º nível em que se encontra a coleta de água “tratada com cloro” e utilizada no resfriamento dos equipamentos (desvio de água do conduto forçado da máquina 2) e **ponto C** – em que se encontra o ponto de coleta da água do conduto forçado da máquina 2 (profundidade 10-15m).

Fonte: Autor

Na UHE-Salto Pilão os corpos de prova (CP's) foram instalados em dois pontos de coleta: montante e jusante da UHE Salto Pilão no rio Itajaí-Açu. Em cada um desses pontos foram colocadas caixas acrílicas com CP's de sete tipos de metais, que foram coletados durante um período de três meses (sendo 1 mês para exposição inicial e 2 coletas – uma por mês). Em cada um dos pontos foram instaladas duas bombas para sucção da água do rio, uma superficial e outra profunda (aproximadamente 4m). A justificativa seria de uma possível variação na composição da água superficial (maior concentração de oxigênio e luz) e águas profundas que representam o fundo do reservatório, que no caso desta construção será de no máximo 5m de profundidade. Dessa forma, foi avaliado o potencial de se encontrar microrganismos que podem influenciar o processo de corrosão nas superfícies metálicas da Usina Hidrelétrica. A barragem nesta usina apenas retém a água para que ela desvie para o canal coletor construído na rocha da montanha próxima ao rio Itajaí-Açu, assim a água que estará sendo captada é a água superficial.



FIGURA 12 - Pontos de coleta de água do rio Itajaí-Açu, construção da Usina Hidrelétrica de Salto Pilão, Ibirama – SC. Estação de corrosão a jusante da UHE no Rio (a); Boia que mantém o ponto de sucção da água para as caixas acrílicas no ponto a jusante da UHE no Rio – b1 e localização da estação na margem do rio – b2 (b); Estação de corrosão a montante da UHE no Rio (c); Boia que mantém o ponto de sucção de água para as caixas acrílicas no ponto a montante da UHE no Rio – d1 e ensecadeira para a construção da barragem a montante da UHE no Rio – d2 (d).

Fonte: Autor

Nas áreas experimentais foram realizadas as instalações dos corpos de prova metálicos para retiradas periódicas e avaliação do biofilme formado nas superfícies e os tubérculos de corrosão.

Na UHE-Balbina foram realizadas 3 coletas e o tempo de exposição foi de 2 meses e meio. As coletas foram iniciadas no mês de Fevereiro de 2007, sendo que as coletas posteriores ocorreram nos meses: Maio e Agosto de 2007.

Já na UHE-Salto Pilão foram realizadas 2 coletas com periodo de exposição de 1 mês. As coletas ocorreram nos meses de Março e Abril de 2008.

4.2 Amostragem

Na UHE-Balbina os corpos de prova metálicos utilizados envolveram os seguintes materiais: aço carbono 1045, aço inox 304L e cobre (FIGURA 13). Também se avaliou a qualidade microbiológica da água.

Devido à distância entre Manaus (AM) e Curitiba (PR) as análises microbiológicas da água foram realizadas em Manaus, no laboratório particular “Microlab – Laboratório de Análises e Pesquisas, consultoria química – microbiológica e ambiental”, por indicação da FUCAPI (Fundação, Centro de Análise, Pesquisa e Inovação Tecnológica).

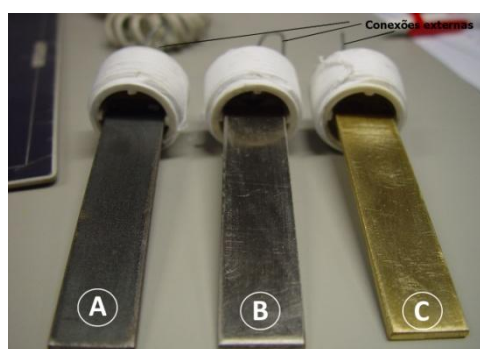


FIGURA 13 – Três ligas metálicas utilizadas como corpos de prova (Cp's). Aço carbono 1045 (A), Aço inox 304L (B) e liga de cobre (C).

Fonte: Autor

Os corpos de prova da UHE-Salto Pilão foram constituídos com os seguintes materiais listados no Quadro 5. Estes materiais representam as superfícies metálicas que ficarão expostas após a construção da Usina Hidrelétrica.

QUADRO 5 – Materiais utilizados para a confecção dos corpos de prova que foram instalados na UHE-Salto Pilão.

MATERIAL		PEÇAS FABRICADAS	IDENTIFICAÇÃO DOS CP'S
SAR 50B	Aço carbono	Conduto forçado.	D01 a D30
ASTM A743	Aço inox baixa resistência	Rotor.	S01 a S11
ASTM A276 410T	Aço inox	Roda, eixo.	E01 a E28
ASTM A53	Aço Carbono	Tubulação.	Y01 a Y28
AISI 304	Aço inox	Apoio da vedação das comportas, grade da tomada de água de drenagem, parafusos.	A01 a A31
ASTM A36	Aço carbono média resistência	Peças fixas (sem pintura).	R01 a R27
Liga de cobre Cu/Ni 90/10	Cobre	Trocador de calor do gerador.	C01 a C28

A análise microbiológica da água para a presença de coliformes fecais do rio Itajaí-Açu foi realizada no CEPPA, laboratório situado no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba-PR.

O projeto da UHE-Balbina, buscava verificar o problema da corrosão nos condutos forçados (representado pelo CP's de aço carbono) e nos trocadores de calor e radiadores (representados pelos CP's de cobre e aço inox). Os materiais utilizados na UHE-Balbina representam as superfícies que estão com problemas de corrosão influenciada por microrganismos (CIM).

O projeto da UHE-Salto Pilão, por sua vez, tinha como meta prever quais problemas surgiriam após a instalação da Usina Hidrelétrica. Assim, foi utilizada uma maior variedade de CP's para garantir que fossem analisados todos os metais que estão sendo utilizados na construção da Usina Hidrelétrica.

4.3 Delineamento experimental

4.3.1 Usina Hidrelétrica de Balbina

Foi coletada periodicamente uma amostra de cada corpo de prova: aço carbono 1045, aço inox 304L e cobre, conforme cronograma (QUADRO 6). Tem-se os grupos A, B, C e D, sendo que cada grupo envolve 3 corpos de prova (Aço Carbono, Aço Inox e Cobre) para cada ponto de coleta (Conforme Figura 11: Pé da Barragem “A”, 3º nível “B” e 5º nível “C”). Observa-se que são analisados corpos de prova com o seguinte perfil: Grupo A (Corpos de prova com 2,5 meses de exposição às águas do reservatório – instalados Fevereiro de 2007 e coletados Abril de 2007), Grupo B (Corpos de prova com 5 meses de exposição às águas do reservatório – instalados Fevereiro de 2007 e coletados Junho de 2007), Grupo C (Corpos de prova com 7,5 meses de exposição às águas do reservatório – instalados Fevereiro de 2007 e coletados Setembro de 2007).

Vista técnica	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Instalação Fev/07	Coleta Abr/07	Coleta Jun/07	Coleta Set/07
A	A		
B		B	
C			C

QUADRO 6 – Cronograma de execução das coletas de corpos de prova e água para análise físico-química e microbiológica UHE-Balbina.

Conforme Figura 14, observam-se os materiais utilizados para construção das estações de corrosão e o equipamento instalado em operação na UHE-Balbina (FIGURA 15).



FIGURA 14 – Material utilizado para a confecção dos pontos de coleta. Caixa de acrílico que comporta os corpos de prova e eletrodos de medição (a), instalação dos corpos de prova (b) e visão geral do material antes da instalação (c).

Fonte: Autor



FIGURA 15 – Vista do pé da barragem onde foram instalados os corpos de prova do ponto de coleta “A” segundo figura 11. Tubulação de tomada de água do reservatório que transporta água para a vila e tanques de criação – peixe boi, ariranha, tartaruga, peixes e fornece água para a caixa acrílica – antes da instalação da estação de corrosão (a), visão geral da área onde se encontra instalada a estrutura do ponto A – depois da instalação da estação de corrosão (b), caixas operando com os corpos de prova já instalados (c) e Prof Dr. Carlos Mario Garcia realizando as medidas eletroquímicas para avaliar a corrosão das ligas (d).

Fonte: Autor

4.3.2 Usina Hidrelétrica de Salto Pilão

As coletas da UHE-Salto Pilão ocorreram mensalmente, totalizando duas coletas (Março e Abril de 2008). Esta fase do projeto foi executada em quatro meses, sendo o primeiro mês (Janeiro de 2008) para a instalação das estações de corrosão, o segundo mês (Fevereiro de 2008) para a exposição das ligas metálicas a água coletada do rio Itajaí-Açu, que circulava no sistema, e no terceiro e quarto mês ocorreram as coletas.

4.4 Meios de cultivo, Soluções e Reagentes

Os meios de cultivo e soluções foram esterilizados: em autoclave, 121°C a 1 atm por 20 min, ou através de filtros Millipore 20µm (meios de cultura, soluções e reagentes sensíveis ao calor). Vidrarias foram autoclavadas por 40 min, frascos, ponteiras e tubos tipo *Eppendorf* foram autoclavados à pressão de 1 atm, por 15 min. Todo material contaminado foi esterilizado antes do descarte.

4.4.1 Meios de Cultivo

4.4.1.1 Meios de cultivo comerciais

Os meios de cultura comerciais utilizados foram: *Tryptic Soy Case*, marca Acumedia, que foi utilizado para o isolamento de bactérias anaeróbicas facultativas e aeróbicas; para o isolamento de fungos foi utilizado Ágar Batata Dextrose, marca Acumedia.

4.4.1.2 Meio seletivo Leathen Mcintyre-Braley

O meio de cultivo Leathen-Mcintyre-Braley foi preparado com: Sulfato de amônio 0,15 g/L, Nitrato de Cálcio 0,01 g/L, Fosfato de Potássio dibásico 0,05 g/L, Sulfato de Magnésio 0,5 g/L, Cloreto de Potássio 0,05 g/L, Água destilada qsp 1000 mL (APHA; AWWA; WPCF, 1999).

Após a esterilização adicionou-se 10 mL da solução de sulfato ferroso 10% esterilizada em filtro millipore. O pH foi ajustado a 3,5 com NaOH (2N) e alíquotas de 10 mL do meio foram distribuídos em tubos de ensaio esterilizados com tampa rosqueável.

4.4.1.3 Meio seletivo para Bactérias Redutoras de Sulfato

Segundo formulação sugerida pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WPCF, 1999), foram utilizados: Glicose 0,15 g/L, Lactato de sódio 3,5 g/L, Extrato de carne 1,0 g/L, Peptona 2,0 g/L, Sulfato de Sódio 1,5 g/L, Fosfato de potássio dibásico 0,5 g/L, Sulfato de magnésio 2,0 g/L, Cloreto de Cálcio 0,1 g/L, Água destilada qsp 1000 mL.

Segundo metodologia prepara-se duas soluções separadamente para que sejam adicionadas após esterilização do meio seletivo para BRS. Solução 1 (Ascorbato de sódio 1 g/ 100 mL) e solução 2 (Sulfato ferroso amoniacal 3,92 g/ 100 mL).

O pH deve estar em $7,5 \pm 0,3$ após a esterilização. Preparou-se o meio sem as soluções “1” e “2”, que foram dispensados em tubos com tampa rosqueável e esterilizados (FIGURA 16). Para se inocular, os tubos devem estar completamente cheios, então reservou-se meio extra esterilizado para preencher o volume total dos tubos de ensaio. No momento em que foram inoculadas as amostras neste material, preparou-se soluções “1” e “2”, que foram esterilizadas por filtração (membrana 0,45 micrometros) e adicionou-se 1 mL de cada solução para 100 mL do meio principal.

4.4.2 Soluções e Reagentes

4.4.2.1 Solução Salina

Solução 0,85% (p/v) de NaCl (8,5 g/L de NaCl dissolvidos em Água destilada).

4.4.2.2 DNA Polimerase (Marca Invitrogen)

A Taq DNA polimerase utilizada nas reações de amplificação foi a da marca Invitrogen, na concentração de 5 U/ μ L.

4.4.2.3 dNTP (Marca Invitrogen)

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100 mM), foram diluídos em água ultrapura a 2,5mM (solução única). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2 mM.

4.4.2.4 EDTA 0,5M

Utilizou-se para o preparo desta solução: EDTA 372,2 g/L e Água destilada qsp 1000 mL.

O EDTA foi pesado e acrescentou-se uma parte de água ultrapura autoclavada (aproximadamente 80% - 800mL). O pH corrigido inicialmente com NaOH em pellet (aproximadamente 20 g) e o ajuste final (pH 8,0) com NaOH (4N). Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.4.2.5 Gel de Agarose (0,8% p/v)

Utilizou-se para o preparo do Gel: Agarose 8 g/L em Tampão TBE 1X.

4.4.2.6 Gel de Agarose (1,6% p/v)

Utilizou-se para o preparo do Gel: Agarose 16 g/L em Tampão TBE 1X.

4.4.2.7 Oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os *primers* foram diluídos em tampão TE (solução 4 mM), usando o peso molecular do *primer* individual fornecido pelo fabricante. Os *primers* diluídos foram mantidos a -20°C.

4.4.2.8 Tampão da Amostra para eletroforese

O Tampão foi preparado com: Sacarose 400 g/L, Azul de bromofenol 2,5 g/L e Água destilada.

Os reagentes foram solubilizados e mantidos a 4°C.

4.4.2.9 Tampão CTAB

Utilizou-se: Tris-base 30,25 g/L, Na-EDTA 9,25 g/L, CTAB 25 g/L, Cloreto de sódio 102,5 g/L e Água ultra pura qsp 100 mL. O pH final foi ajustado para 7,5.

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100 mL com água Ultra pura autoclavada.

4.4.2.10 Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TBE 10X – pH 8,0)

Para o preparo do Tampão foram utilizados: Tris-base 108 g/L, Ácido Bórico 55

g/L, EDTA (0,5M) 40 mL/L e Água ultra pura qsp 1000 mL.

4.4.2.11 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCL (pH: 8,0)	20mM
EDTA	20mM

4.4.2.12 Solução de Brometo de Etídio

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água ultrapura, agitando-se por várias horas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2002). A solução foi estocada à temperatura de 8°C longe de fontes luminosas. Para revelação, foram diluídos 3 µL/L de brometo em de água ultra pura.

4.5 Metodologia de análise dos corpos de prova

Preparou-se o inóculo através da adição de 1 g de tubérculo de corrosão de cada corpo de prova (CP's) em 9 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) esterilizada. Para a obtenção deste material raspou-se os CP's com lâminas esterilizadas (cada um dos corpos de prova são tratados separadamente). Foram realizadas as diluições necessárias e com estas foi possível realizar os inóculos para: isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, isolamento de fungos, presença/ausência de Bactérias oxidantes do ferro e presença/ausência de Bactérias redutoras de sulfato.

4.5.1 Isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas

Realizou-se a homogeneização das amostras (inóculos já diluídos) em um agitador de tubos e inoculou-se 100 µL das amostras em placas de Petri com meio caldo de soja (*Tryptic soy case – Acumedia*). O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C em BOD, por 2-3 dias.

4.5.2 Presença / Ausência de bactéria oxidante de ferro

Foi inoculado 1 mL da solução de inóculo em tubos de ensaio com Meio seletivo *Leathen-Mcintyre-Braley* e incubado a 30°C por 15-20 dias.

Lâminas de Gram foram confeccionadas conforme Konemam et. al (2001) e comparadas com fotos existentes no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1999). Adicionou-se 2 gotas da solução de Ferrocianeto de Potássio 1% em cada tubo teste. A coloração azul intenso (Azul da Prússia) indica a presença de Fe^{2+} insolúvel e, somada ao resultado da coloração de Gram, confirma a presença de Bactéria oxidante de ferro.

4.5.3 Presença / Ausência de bactérias redutoras de sulfato

As amostras foram inoculadas em um meio específico para bactérias sulfato-redutoras (APHA; AWWA; WPCF, 1999). Foi utilizada uma técnica para produção de tubos com o meio de cultura (FIGURA 16), esterilizados e com ausência de oxigênio. Este meio foi transferido aos tubos de ensaio que possuem tampa rosqueável de baquelite e rolha de borracha, que asseguram a vedação do sistema, garantindo o isolamento e, assim, manutenção do meio isento de oxigênio, característica necessária para o isolamento das Bactérias Sulfato Redutoras (BRS), que são anaeróbicas estritas. Para a confecção destes tubos foi realizado o seguinte procedimento:

Foi autoclavado o tubo de ensaio com o meio de cultura e separadamente as rolhas de borracha e agulha metálica. A esterilização foi realizada durante 15 min, 121°C a 1 atm em autoclave vertical. Foi adicionado ao tubo com meio de cultivo autoclavado o inóculo e preenchido até a capacidade máxima do tubo com o mesmo meio de cultura, que havia sido autoclavado separadamente para este propósito. Para completa vedação deste sistema, utilizou-se a rolha de borracha que foi inserida no tubo onde tomou-se o cuidado para que não ficasse nenhuma bolha de ar no interior do tubo. A agulha de metal autoclavada auxilia este processo de inserção da rolha (FIGURA 16), adaptado de Rodríguez-Cavallini e Cruz, 1999.

A presença de Bactérias redutoras de sulfato é assinalada pela formação de depósito de **sulfeto ferroso**, de coloração preta, após 20-30 dias de incubação em estufa de anaerobiose com recirculação de gás carbono a temperatura de 30°C.

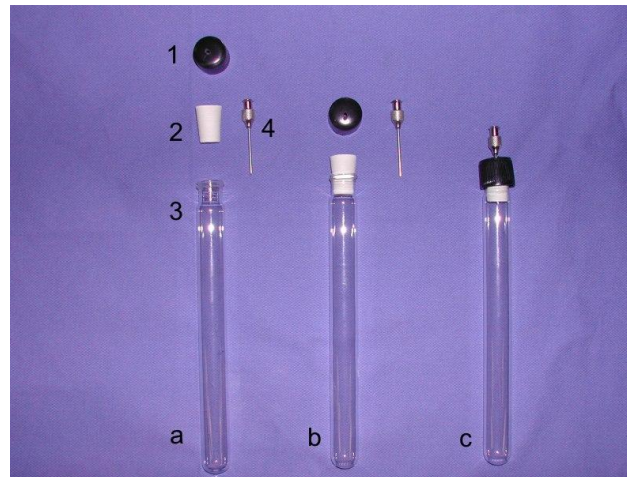


FIGURA 16 – Detalhamento dos materiais para confecção de tubos com ausência de O₂. Materiais: tampa rosqueável e autoclavável de baquelite com orifício central (1), rolha de borracha para o tamanho de tubo de ensaio utilizado (2), tubo de ensaio de vidro com rosca (3) e agulha hipodérmica de metal, autoclavável (4). Materiais utilizados (a), vedação do tubo com a rolha de borracha branca (este tubo deve estar completo com o inóculo e meio não permitindo que sobrem espaços para o oxigênio) (b), tampa com rosca para segurar a rolha de borracha durante o período de incubação e agulha de metal para permitir a inserção da rolha de borracha no tubo que está completo criando um caminho de fuga para o material sem a entrada de oxigênio e auxiliando a entrada da rolha (c).

Fonte: Autor

4.5.4 Isolamento de Fungos

Utilizando-se o mesmo inóculo, obtido dos corpos de prova, inoculou-se 100 µL em placa de Petri com meio de cultura (BDA – Acumedia). O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a temperatura de 25°C em BOD, por 4-7 dias.

4.5.5 Identificação de microrganismos

4.5.5.1 Biofilme

Para a caracterização do biofilme formado sobre os corpos de prova realizou-se microscopia eletrônica de varredura – MEV (BOZZOLA; RUSSELL, 1999). Foram utilizados os equipamentos CPD-030 *Critical Point Dryer* para o ponto crítico e SCD030 – Balzers Union FL 9496 Balzers para metalização

(Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR) e para a observação o microscópio eletrônico de varredura marca PHILLIPS modelo XL30 (Departamento de Tecnologia de Materiais – LACTEC).

4.5.5.2 Bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas

Para a classificação das bactérias Gram-positivas e negativas foi realizado coloração de Gram (KONEMAN et al., 2001). Para bactérias Gram-positivas utilizou-se provas bioquímicas e características morfológicas para a classificação taxonômica do gênero *Bacillus* sp (BUCHANAN; GIBBONS, 1974). Os grupos taxonômicos *Pseudomonas* sp e Enterobactérias (Gram-negativas) foram determinados através de bioquímica e características morfológicas, segundo Koneman et al., (2001).

4.5.5.3 Identificação de BRS por amplificação com oligonucleotídeos específicos

A identificação de bactérias anaeróbicas, como *Desulfovibrio*, é difícil e demorada por meio dos métodos convencionais. Os microrganismos acidófilos, que aceleram a oxidação do ferro, apresentam uma grande diversidade, porém seu isolamento e identificação também são dificultados por limitações técnicas. Na tentativa de minimizar estas dificuldades, a metagenômica surgiu como uma estratégia para acessar a diversidade microbiana de amostras ambientais de maneira rápida e eficiente.

O DNA total do biofilme formado nos corpos de prova foi extraído por meio do *kit Power Soil DNA (MoBio Labs)*. Foram utilizados os CP's expostos nas caixas acrílicas que estavam instaladas nas usinas hidrelétricas. O DNA purificado a partir da amostra é representativo de todos os microrganismos presentes nesta amostra. Por meio de sua amplificação com oligonucleotídeos iniciadores específicos (QUADRO 7) para genes que codificam RNAs ribossômicos, como o 16S rRNA (FIGURA 17), é possível a detecção de grupos de BRS (DEVEREUX et al., 1992).

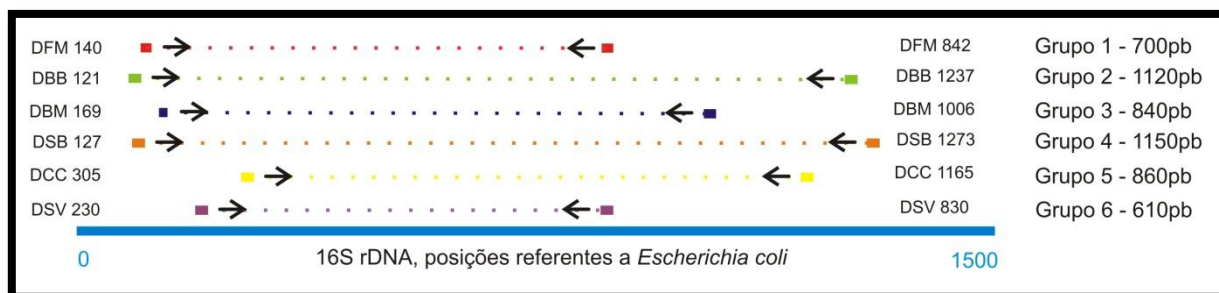


FIGURA 17 – Posições dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) no gene 16S em relação a numeração da *E. coli* (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000). Cada um dos *primers* possui um nome que é composto por um código de três letras e números, onde estes números indicam a posição de anelamento do *primer* no gene.

Fonte: Autor

QUADRO 7. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de regiões do DNAr 16S recomendadas para identificação de grupos de BRS (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000)

<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos 5' – 3'*	Especificidade	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho fragmento (bp)	Gêneros
DFM140	TAG MCY GGG ATA ACR SYK G	Grupo 1	58	700	<i>Desulfotomaculum</i> sp
DFM842	ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC				
DBB121	CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG	Grupo 2	66	1120	<i>Desulfobulbus</i> sp
DBB1237	GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC				
DBM169	CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG	Grupo 3	64	840	<i>Desulfobacterium</i> sp
DBM1006	ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG				
DBM127	GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G	Grupo 4	60	1150	<i>Desulfobacter</i> sp
DSB1273	CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T				
DCC305	GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA	Grupo 5	65	860	<i>Desulfovibrio</i> sp <i>Desulfosarcina</i> sp <i>Desulfococcus</i> sp <i>Desulfonema</i> sp
DCC1165	GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC				
DSV230	GRG YCY GCG TYY CAT TAG C	Grupo 6	61	610	<i>Desulfovibrio</i> sp
DSV838	SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC				

*Ambiguidades: R(G ou A); Y (C ou T); K (G ou T), M (A ou C); W (A ou T).

4.5.5.4 Fungos

A identificação dos fungos foi realizada por meio da observação de estruturas de reprodução, utilizando a técnica do microcultivo, com lâminas de 7 a 14 dias de cada morfogrupo (KERN; BLEVINS, 1999). As lâminas foram fixadas, coradas em lactofenol com 0,05% de azul de algodão e lactofenol de Amann e analisadas ao microscópio óptico (aumento 400X).

Além disso, para confirmação de espécie, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura – MEV (BOZZOLA; RUSSELL, 1999). Foram utilizados os equipamentos CPD-030 *Critical Point Dryer* para o ponto crítico e SCD030 – Balzers Union FL 9496 Balzers para metalização (Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR) e para a observação ao microscópio eletrônico de varredura marca PHILLIPS modelo XL30 (Departamento de Tecnologia de Materiais – LACTEC).

A classificação dos fungos foi realizada através de observações das preparações microscópicas com utilização de literatura especializada. (HOOG et al., 2004; KLICH; PITT, 1998; BARNETT; HUNTER, 1987; LARONE, 1987; HAZEN et al., 1973; MENEZES; OLIVEIRA, 1993; KERN, 1988; HERRERA; ULLOA, 1990).

Realizou-se extração do DNA dos isolados através do cultivo em BDA das linhagens por 7 dias a 28°C. O micélio foi coletado e macerado. O DNA genômico foi extraído segundo metodologia descrita por Vicente, 2000.

As sequências contíguas ITS-1 (Região espaçadora intergênica), 5,8S e ITS-2 foram sequenciadas utilizando um conjunto de *primers* ITS-1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS-4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (WHITE; BRUNS; TAYLOR, 1990). Foi realizada PCR em 10 µL de reação, que continha: 0,5 µL de tampão para PCR (10x *Applied Biosystems*), 0,5 µL do primer (50 pmol), 0,5 µL do *Big Dye* (*Applied Biosystems*), 1 µL do produto de PCR e água ultrapura qsp 10 µL. Realizou-se 35 ciclos, onde 96°C por 10s (desnaturação), 50°C por 5s (anelamento), 60°C por 4min (extensão) e 60s para o alongamento. O Sequenciamento foi realizado no equipamento *ABI 3130 automatic sequencer* (*Perkin-Elmer*, Massachusetts, USA).

As sequências foram editadas utilizando-se o programa Bioedit 7.0 (HALL, 1999). As regiões ITS foram alinhadas utilizando a máxima similaridade por meio do editor de sequência CLUSTAL-W 1.7 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As análises das sequências foram realizadas utilizando o software BLASTn disponível no banco de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information website* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5 RESULTADOS

Devido à diversidade dos ambientes e condições técnicas disponíveis para a realização dos experimentos será dividido em duas partes o capítulo dos resultados auxiliando o entendimento dos dados obtidos com as análises dos corpos de prova de cada uma das usinas hidrelétricas, UHE-Balbina e UHE-Salto Pilão.

5.1 UHE - Balbina

Existem vários problemas levantados pelos técnicos e engenheiros de operação e manutenção dos equipamentos da Usina Hidrelétrica de Balbina sobre a corrosão e entupimento dos equipamentos de resfriamento.

Os trocadores de calor (FIGURA 18) apresentam um grande acúmulo de resíduos de corrosão além de matéria orgânica proveniente do reservatório, existe, também, o acúmulo de lama nos radiadores, principalmente da unidade 5, que possui sérios problemas devido à falhas de projeto da construção da tubulação de captação de água (Conduto Forçado) que move a turbina nesta unidade e posteriormente fornece a água para o resfriamento dos equipamentos desta unidade.

Este acúmulo de lama e material orgânico no interior dos tubos de troca térmica influencia a troca térmica e diminui a eficiência do trocador de calor no radiador, ocorrendo assim um superaquecimento do Estator que desarma o sistema a partir de uma determinada temperatura e corta a geração de energia, pouco se pode fazer devido à impossibilidade de se alterar a posição das tubulações de captação.

As interrupções geram grandes prejuízos para a UHE Balbina, pois são oriundas da desativação do sistema de geração de energia em uma unidade específica sem programação. Esta usina possui algumas paradas programadas para manutenção dos equipamentos (6 a 8 meses), mas em algumas unidades, ocorrem paradas inesperadas em questão de 2 – 3 meses, por exemplo a máquina

5, o que torna-se um grande problema devido aos excessivos gastos referentes ao pessoal da manutenção.

Na Figura 18 observa-se o nível em que se encontram os trocadores de calor, com acumulação de resíduos. Visando minimizar esta incrustação foi iniciada a aplicação de cloro em um período de 20 a 30 minutos durante o dia para desinfecção dos trocadores, esta operação reduziu significativamente os intervalos entre uma manutenção e outra. Este procedimento vem sendo realizado, porém não se mostrou definitivamente eficiente, o que levou a Eletronorte a realizar a avaliação da corrosão nos equipamentos.

O radiador presente na unidade 2 (FIGURA 19) apresenta acúmulo de lama, assim como nos demais radiadores das outras unidades, que interfere significativamente na eficiência da troca térmica do radiador que tem a função de resfriar o estator. A limpeza dos tubos de troca térmica, que podem ser visualizados na Figura 18d em detalhe, é realizada inserindo-se um “vergalhão” de aço (metal utilizado na construção civil para estruturação do concreto). Esta técnica tem se mostrado eficiente, minimizando o problema por alguns meses, porém com o tempo provoca danos na parede dos tubos devido à força aplicada na remoção do material acumulado e o atrito do aço nas paredes. Além deste inconveniente, existe uma certa “vitrificação” da lama nas paredes dos tubos dos radiadores e a cada nova manutenção, segundo os responsáveis pelo equipamento, vem tornando mais complicada a limpeza e isso pode, além de danificar o equipamento, alterar a eficiência das trocas realizadas por esses radiadores, que ocasionará maiores quedas do sistema devido ao superaquecimento.

Atualmente, analisa-se a possibilidade de alterar o sistema de desinfecção, o qual utiliza cloro, elevando-se o pH com a adição de NaOH visando minimizar alguns problemas decorrentes da aplicação do cloro, onde alguns resíduos indesejáveis permanecem no efluente da usina. A adição constante de NaOH no sistema de desinfecção da água de resfriamento se mostra eficiente em vários trabalhos envolvendo a prevenção da formação de acúmulos nos trocadores de calor de seres vivos (bivalves, algas, microrganismos, etc.).



FIGURA 18 – Área dos trocadores de calor em que se encontra o ponto B de coleta conforme esquema 1. Vista geral do complexo de filtros e trocadores de calor para a unidade 2, que realiza o resfriamento do óleo lubrificante dos equipamentos da referida unidade (a), abertura do trocador de calor “Alfa Laval” de placas para manutenção e limpeza (b), visão geral do situação em que se encontra uma das placas do trocador de calor (c) e nível de acúmulo de material orgânico que se encontram as placas, observar diferença entre a parte onde passa apenas o óleo a ser resfriado (metal intacto) e parte onde passa a água do reservatório (metal com *biofouling*) (d).

Fonte: Professor Carlos Mario Garcia

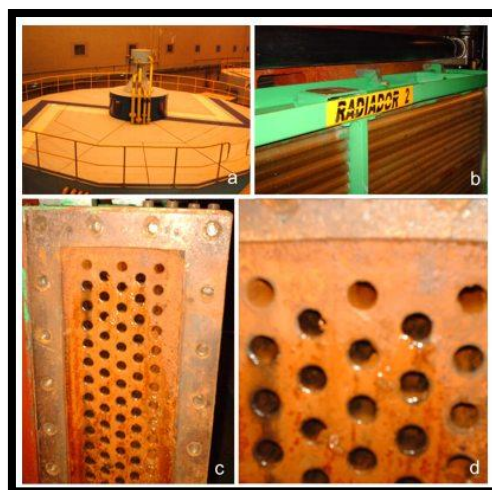


FIGURA 19 – Radiador do Estator na unidade 2. Visão superior do Estator (a), parte externa de um dos quatro radiadores do Estator da unidade 2 (b), visão geral de uma das laterais abertas do radiador, em que se pode observar acúmulo de lama nos tubos de troca térmica (c) e close para visualizar com detalhes o estado em que se encontram os radiadores (d).

Fonte: Autor

Os resultados dos parâmetros físico-químicos e bacteriológicos da UHE-Balbina se revelaram em conformidade com os padrões estabelecidos pelo Art. 15 da Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005. Este laudo foi elaborado no dia 28 de fevereiro de 2007 em Manaus por: Dr. Jurandir Chaves de Vasconcelos, Microbiologista – M. Sc. Ph. D CRF AM/RR 166 e Tatiane de A. Vasconcelos, Química – Especialista em Impacto Ambiental – M. Sc. CRQ – Nº 14100747.

5.1.1 Biofilme

Observa-se a seguir uma amostragem dos materiais (FIGURA 20) que foram coletados nas caixas acrílicas (pontos de coleta da UHE-Balbina). Neste caso, tem-se um material instalado há aproximadamente 7,5 meses no sistema (Grupo C, conforme cronograma Quadro 6).

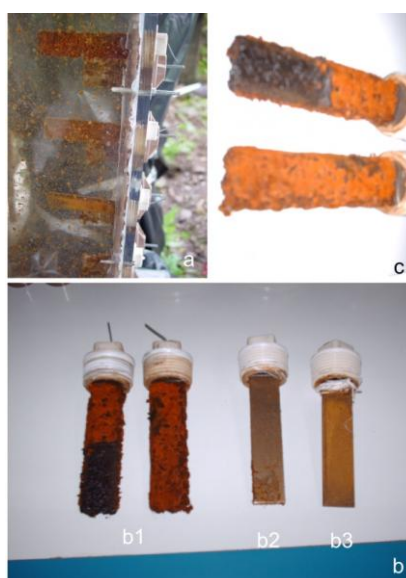


FIGURA 20 – Corpos de prova coletados para preparar o inóculo e realizar isolamento dos microrganismos. Visualização do corpo de prova instalado e submetido a ataque pela água do reservatório (a), visualização das amostras coletadas, onde: “b1 – aço carbono”, “b2 – aço inox” e “b3 – cobre” (b) e ligas de aço carbono visualizadas com maior detalhe para evidenciar a formação de uma estrutura interna ao tubérculo (depósito de óxido férrico) favorável ao crescimento alguns microrganismos (c).

Fonte: Autor

Os corpos de prova de aço carbono foram os que apresentaram uma maior formação de tubérculos de corrosão, ou seja, depósitos de óxido de ferro em biofilmes e formação de “pits” de corrosão.

Os CP's da UHE-Balbina de aço inox 304L e cobre não apresentaram alterações visíveis quanto à deterioração do metal, mas foi possível observar deposição de matéria orgânica na superfície.

Portanto, para a caracterização da associação dos fungos em biofilmes de corrosão foram selecionados os CP's de aço carbono e observados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (FIGURA 21).

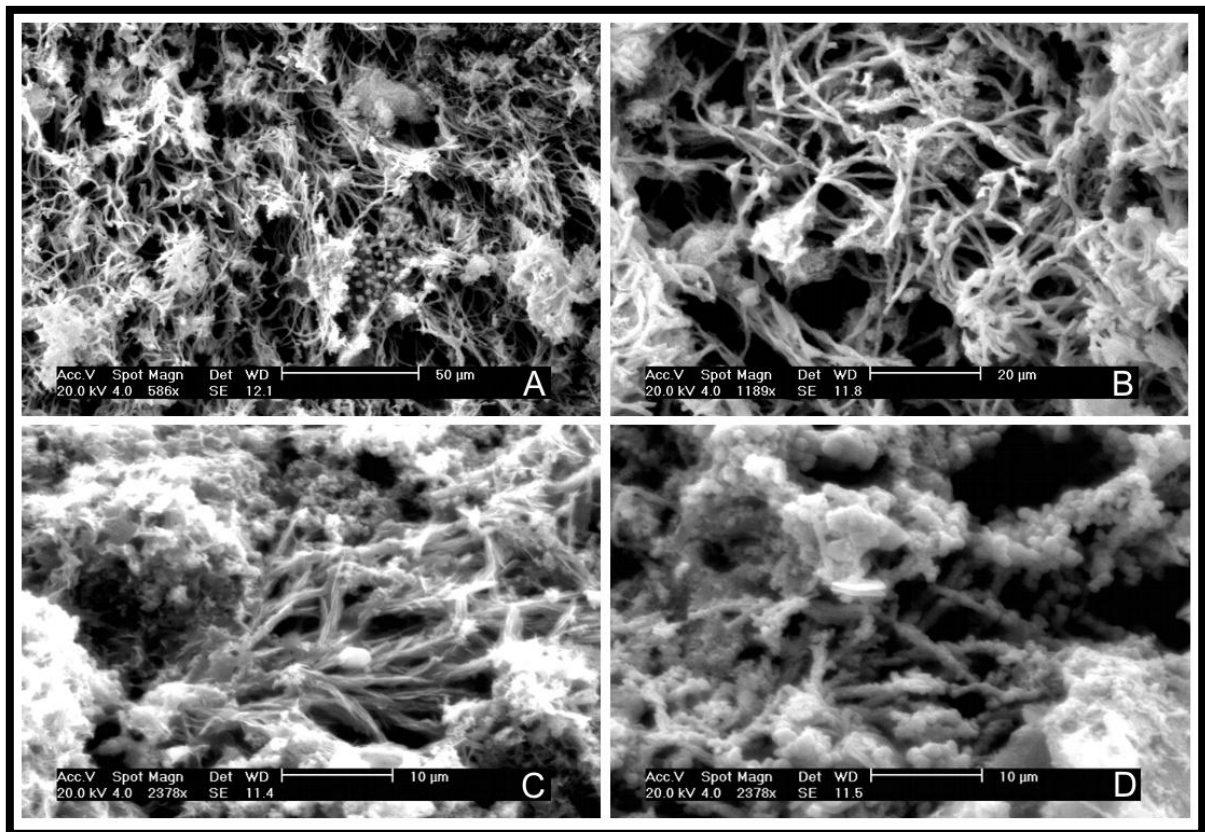


FIGURA 21 – Microscopia eletrônica de varredura de tubérculos de corrosão obtidos de corpos de prova de aço carbono coletados na UHE-Balbina. A – micélio presentes em biofilme (586x), B – micélio presente em biofilme (1189x), C e D – material depositado sobre micélio aderido à superfície metálica em tubérculo de corrosão extraído de CP(2378x).

Fonte: Autor

5.1.2 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Nos corpos de prova de Cobre e Aço Inox não foi detectada a presença de BRS em nenhuma das coletas realizadas. Fato semelhante ocorreu com os CP's de aço carbono com 2 meses e meio de exposição. Entretanto, a partir do quinto mês de exposição foi detectada a presença de BRS, através da formação de sulfeto ferroso, que confere coloração negra ao tubo (FIGURA 22)



FIGURA 22 – Cultivo em meio líquido seletivo para Bactérias redutoras de sulfato (BRS). Os tubos de ensaio possuem as marcações AC, LT e AI que representam respectivamente: Aço carbono, Cobre (liga de cobre) e Aço inox. O tempo de incubação para detecção de BRS varia de 20 a 50 dias. A figura exemplifica a evolução de cada uma das amostras de Cp's da UHE-Balbina inoculados da primeira coleta.

Fonte: Autor

Utilizando-se a amplificação do DNA total purificado do biofilme presente nos CP's, foram detectados três grupos de BRS somente no CP de aço carbono do ponto de coleta A (FIGURA 11): o GRUPO 2 que é representado por *Desulfobulbus* SP, o GRUPO 5 que compreende os gêneros *Desulfovibrio* sp, *Desulfosarcina* sp, *Desulfococcus* sp e *Desulfonema* sp; e o GRUPO 6, representado por *Desulfovibrio* sp (TABELA 2) (FIGURA 23).

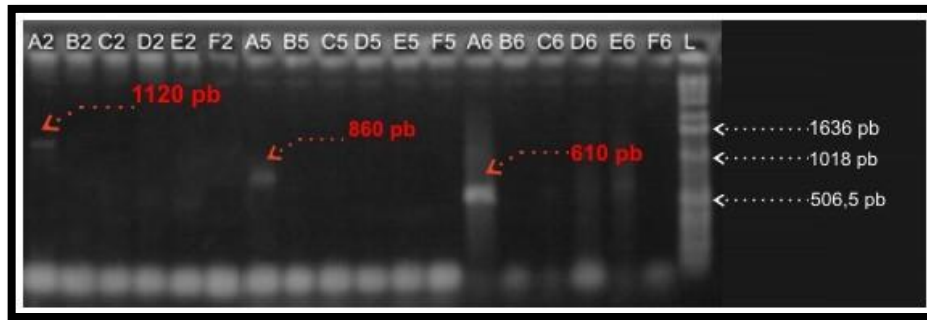


FIGURA 23 - Amplificação de uma região do gene rRNA 16S de BRS. Em A2 banda de aproximadamente 1120 pb correspondente a *Desulfobulbus* sp, no qual foi usado os *primers* DBB121 e DBB1237. Em A5 banda de aproximadamente 860 pb correspondente ao GRUPO 5, *primers* DCC305 e DCC1165 . Em A6 banda de aproximadamente 610 pb correspondente ao *Desulfovibrio* , *primers* DSV230 e DSV838 . Marcador de peso molecular (L): DNA ladder 1Kb (Invitrogen). As letras correspondem: “A” - aço carbono ponto A, “B” – aço carbono ponto B, “C”- aço carbono ponto C, “D” – aço inox ponto A, “E” – cobre ponto A e “F” – reação controle negativo; e os números correspondem aos respectivos grupos de *primers* do Quadro 7.

Fonte: Autor

5.1.3 Bactérias Oxidante do Ferro

A presença de bactérias oxidantes do ferro foi detectada apenas nos corpos de prova de Aço Carbono das estações de corrosão da UHE-Balbina (FIGURA 24). Já nos corpos de prova de Cobre e Aço Inox não foi detectada a presença de bactérias oxidantes de ferro em nenhuma das coletas realizadas.

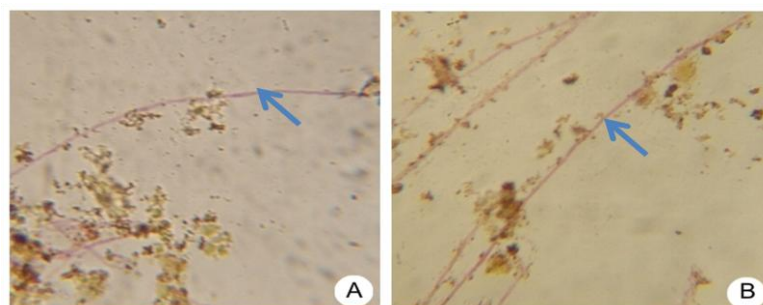


FIGURA 24 - Micromorfologia de Ferrobactérias (coloração de GRAM) UHE-Balbina, Manaus-AM. Obtidas a partir dos corpos de prova de Aço Carbono com cinco meses (A) e com sete meses e meio (B) de exposição à estação de corrosão da usina (Microscopia ótica 400x).

Fonte: Autor

5.1.4 Bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas

Foram isolados 16 cepas de *Pseudomonas* sp , uma cepa de *P. cepacia*, duas de *P. maltophila*, 1 de *P. aeruginosa* e duas de *P. fluorescens*, sendo os dois últimos gêneros sabidamente associados à biocorrosão (YUAN; PEHKONEM, 2007). Sete cepas bacterianas da família Enterobacteriaceae foram observadas a partir dos corpos de prova, como *Enterobacter aminogenus* e *Shigella dysenteriae*. Também, foram isolados 24 cepas de *Bacillus* sp., 6 de *B. brevis* , 9 de *B. fastidiosus*, 1 de *B. licheniformis* e 1 de *B. stearothermophilus*. Foi isolado 1 cepa de *Acinetobacter haemolyticus* que representa um dos grandes potenciais colonizadores de biofilme além de proporcionar resistência a antimicrobianos devido a transferência de resistência através de conjugação bacteriana (TOMARAS et al., 2003).

Além disso, foram isolados e identificados outros grupos microbianos como bactérias da família Vibrionaceae (5 cepas), *Staphylococcus* sp. (2 cepas), bacilos Gram positivos não esporulados (67 cepas) e bacilos gram positivos pleomórficos (1 cepa).

Dentre as bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas (FIGURA 25), 49% tiveram origem no metal de aço carbono, 28% no Cobre e 23% no Aço Inox, mostrando que o Aço carbono é realmente o mais atacado no processo de corrosão influenciada por microrganismos (CIM). A partir dos resultados obtidos sugere-se que houve um incremento na diversidade até o quinto mês, após esse período a diversidade de microrganismos permaneceu estável.

A grande maioria dos isolados foram obtidos de amostras do ponto de coleta próximo ao conduto forçado da máquina 5. Como, por exemplo, na segunda coleta em que 62,5% dos isolados bacterianos têm origem no ponto A (FIGURA 11).

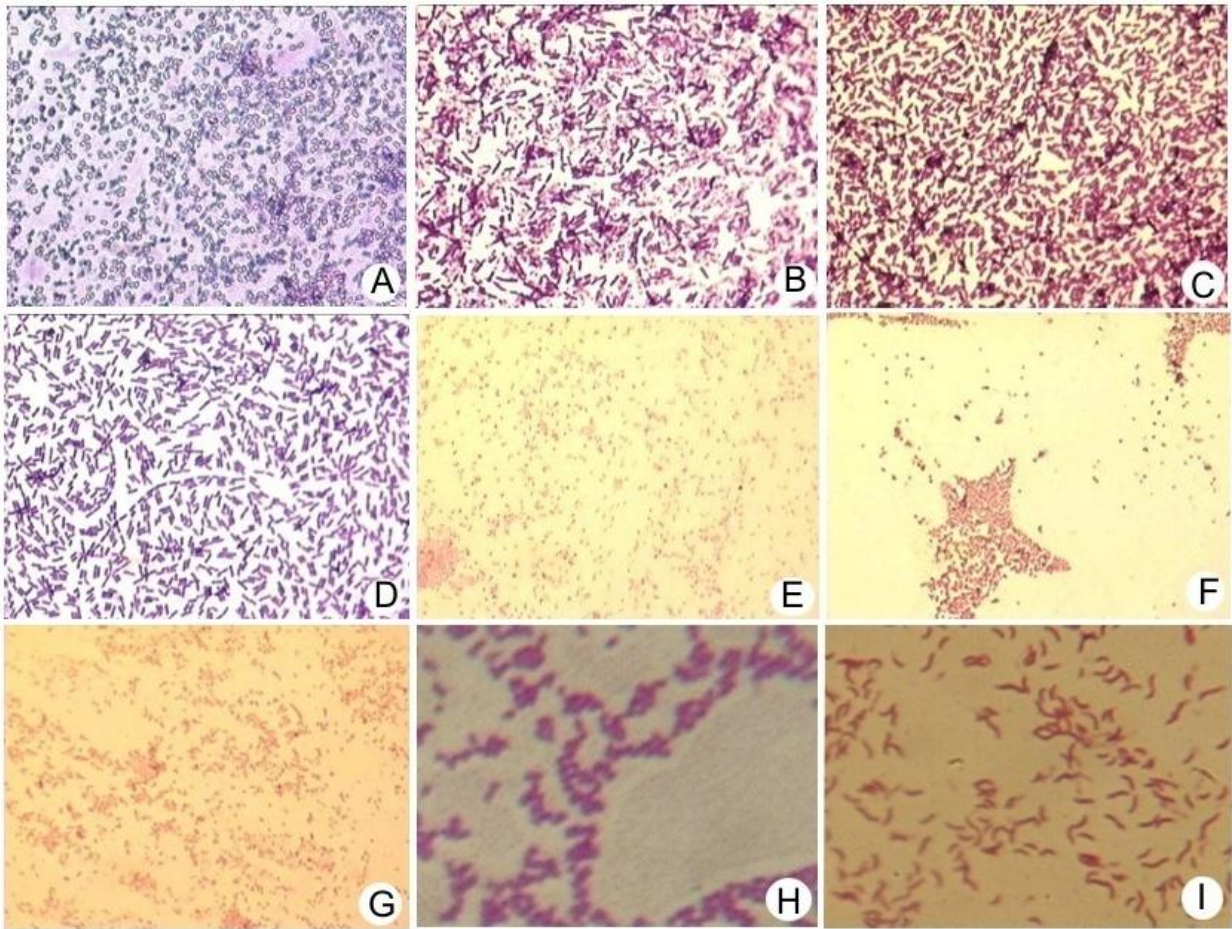


FIGURA 25 - Fotos de indentificação bacteriana (GRAM) amostras UHE-Balbina, Presidente Figueiredo/AM. *Bacillus* sp (A), *B. brevis* (B), Bacilos gram positivo não esporulados (C e D), *Pseudomonas* sp (E), *Shigella dysenteriae* (F), Vibronaceae (G), *Staphylococcus* sp (H) e Bacilo Gram positivo pleomórfico (I).

Fonte: Autor

5.1.5 Fungos

Foram obtidos 60 isolados de fungos dos corpos de prova, sendo que 78% destes, e a maior diversidade de espécies, têm origem do ponto de coleta próximo do conduto forçado da máquina 5 (Ponto A, FIGURA 11).

Os principais gêneros encontrados foram *Aspergillus* sp, *Paecilomyces* sp e *Penicillium* sp. Já os gêneros *Fusarium* sp, *Trichoderma* sp e *Arthrotrrys* sp, foram isolados com menor frequência.

Conforme Tabela 1 verifica-se a identificação através de sequenciamento de regiões inter-espaçadora ITS1 e ITS2 de alguns isolados obtidos de amostras de Cp's da UHE-Balbina.

Dentre as espécies obtidas, *Paecilomyces lilacinus* foi o que apresentou o maior número de isolados em todos os metais.

Abaixo seguem fotos demonstrando a morfologia colonial de fungos isolados (FIGURA 26), microscopia óptica (FIGURA 27) e microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 28), utilizadas para a identificação dos isolados dos CP's da UHE-Balbina.

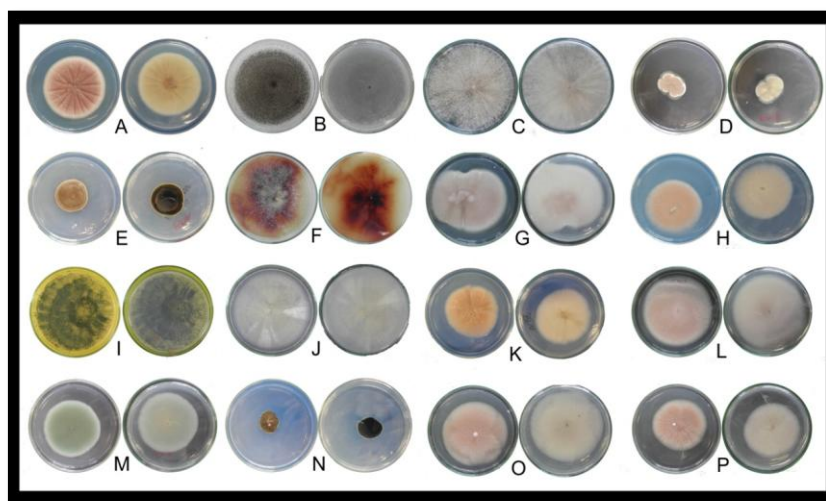


FIGURA 26 – Macromorfologia dos fungos isolados em meio BDA após 15 dias em BOD a 28°C. *Penicillium* sp (A, C, E, F, G, H, K e M), *Aspergillus* sp (B e P), *Arthrobotrys* sp (D), *Trichoderma* sp (I), *Acremonium* sp (J), *Paecilomyces* sp (L e O) e Fungo demáceo (N)

Fonte: Autor

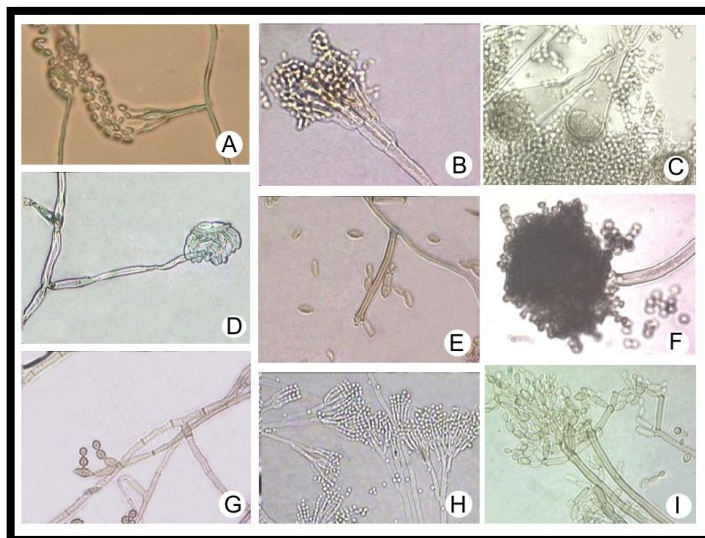


FIGURA 27– Microscopia óptica (1000X), lâminas preparadas através de microcultivo de isolados fúngicos. *Paecilomyces* sp (A), *Penicillium* sp (B e H), *Aspergillus* sp (C), *Fusarium* sp (D), *Exophiala* sp (E), *Aspergillus* sp (F), *Cladosporium* sp (G), *Cladophialophora* sp(I).

Fonte: Autor

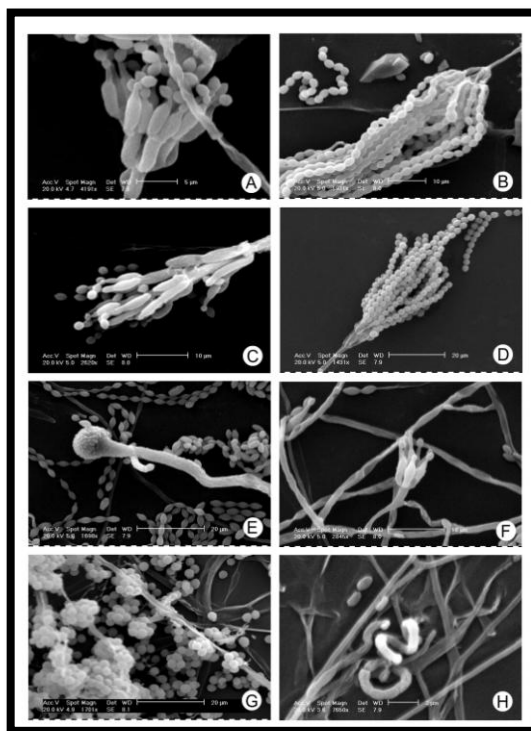


FIGURA 28 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de isolados fúngicos. *Penicillium* sp (A, B e D), *Paecilomyces* sp (C e F), *Aspergillus* sp (E), *Trichoderma* sp (G) e *Arthrotrys* sp (H).

Fonte: Autor

TABELA 2. Fungos isolados dos corpos de prova metálicos expostos às águas do reservatório da UHE-Balbina em Manaus (AM) – Brasil. Identificados por características morfológicas e comparação com regiões ITS-1, 5.8S DNAr e ITS-2 depositadas no banco de dados GenBank (NCBI).

Isolado*	Origem	ID morfológica	Organismo com maior similaridade	GenBank (acesso)	E-Value	Identidade %	GenBank (acesso isolados)**
ACBF 002-3	Aço carbono	<i>Penicillium</i> sp	<i>Penicillium dipodomyicola</i> strain NRRL 35582 18S	DQ339550	0.0	99%	GQ161752
ACBF 003-1	Aço carbono	<i>Paecilomyces nivea</i>	<i>Byssochlamys nivea</i> strain CBS 373.70	DQ322220	0.0	97%	GQ229084
ACBF 003-2	Aço carbono	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	AF034449	0.0	99%	GQ241341
ACBF 004-1	Aço carbono	<i>Trichoderma</i> sp	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain CCF3813	FJ430784	0.0	99%	GQ229070
ACBF 005-2	Aço carbono	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> strain MPVCT 158	EU440768	0.0	98%	GQ229071
AIBF 001-3	Aço inox	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	AB103380	0.0	99%	GQ229072
AIBF 002-1	Aço inox	<i>Trichoderma</i> sp	<i>Trichoderma viride</i> isolate NW537	EU622261	0.0	99%	GQ229073
AIBF 003-3	Aço inox	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain BCC 2012	EU828665	0.0	97%	GQ229074
AIBF 005-1	Aço inox	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> voucher NJM 0271	AY633746	0.0	99%	GQ229075
AIBF 007-2	Aço inox	<i>Paecilomyces nivea</i>	<i>Byssochlamys nivea</i> strain BCC 14366	AY753338	0.0	98%	GQ241340
AIF 013-1	Aço inox	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> contig An03c0110	AM270052	0.0	99%	GQ229076
LT3 003-2	Cobre	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> contig An03c0100	AM270051	0.0	99%	GQ229077
LTBF 001-2	Cobre	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus sydowii</i> strain VKM F-968	AM883158	0.0	99%	GQ229078
LTBF 003-3	Cobre	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain MCCF 58.06	EU306174	0.0	98%	
LTBF 006 B 1	Cobre	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain strain UWFP 674	AY213667	0.0	99%	GQ229079
LTBF 007 1	Cobre	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	AB103380	0.0	99%	GQ229080
LTBF 008 1	Cobre	<i>Paecilomyces spectabilis</i>	<i>Talaromyces spectabilis</i> strain CBS 121583	EU037060	0.0	99%	GQ229081
LTBF 011-1	Cobre	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> strain NHRC-FE080	AM883156	0.0	98%	GQ229082
LTF 006 A-1	Cobre	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain UWFP 674	AY213667	0.0	99%	GQ229083

*Todas as linhagens estão depositadas na micoteca do LabMicro – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – DPAT – UFPR.

**Todas as sequências de DNA obtidas dos isolados foram depositadas no GenBank.

ID morfológica: identificação baseada em características morfológicas; Organismo com maior similaridade: organismos com as sequências ITS-1, 5,8S DNAr e ITS-2 mais similares aos isolados deste trabalho; GenBank (acesso): número de referência das sequências depositadas no GenBank; Identidade: percentual de semelhança entre duas sequências de DNA; GenBank acesso dos isolados: número de referência das sequências nucleotídicas dos isolados que foram depositados.

5.2 UHE – Salto Pilão

A Usina Hidrelétrica de Salto Pilão possui uma diferença grande com relação ao reservatório, esta usina aproveita a geografia da Região e utiliza o desnível do relevo para aumentar o potencial hidráulico necessário ao funcionamento da usina para produção de energia elétrica. Diferentemente da UHE-Balbina que possui como cota máxima 50m, a UHE-Salto Pilão possui entre 4 e 5m de profundidade a barreira do reservatório, que funciona apenas como um bloqueio para direcionar a água do rio Itajaí-Açu para o túnel de acesso.

A região onde se encontra instalada a usina possui criações de suínos próximos ao rio, situação que justificaria os resultados obtidos com a análise microbiológica da água coletada no rio e analisadas no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA/UFPR.

Foi detectada contaminação com bactérias do grupo Coliforme nas amostras coletadas na superfície e no fundo da barragem, assim como a jusante da represa. Estas bactérias podem estar relacionadas com a formação de biofilmes e consequente biocorrosão dos metais. Estes microrganismos e outros pertencentes ao grupo das enterobactérias podem ser precursoras na colonização de superfícies, levando ao desenvolvimento de biofilmes e propiciando um ambiente favorável para a adesão de outras espécies bacterianas e fúngicas (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004).

O grupo Coliforme compreende bactérias da família Enterobacteriaceae, bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35 +- 0,5°C. São descritas aproximadamente 20 espécies, as quais podem ser encontradas no trato intestinal de humanos e outros animais endotérmicos. Os coliformes totais compreendem os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Escherichia coli*. Os coliformes fecais são representados principalmente pela *E. coli*, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, em 24h a 44,5+- 0,2°C, sendo também denominada coliforme termotolerante. Esta espécie bacteriana é o principal

indicador de contaminação fecal, uma vez que o seu habitat exclusivo é o intestino de animais endotérmicos. Embora estas bactérias raramente causem patologias nos seres humanos, outras bactérias que habitam o intestino podem sim, ser responsáveis por graves doenças, como *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, entre outras, daí sua importância como indicadores de contaminação fecal (KONEMAN et al., 2001).

5.2.1 Biofilme

As amostras coletadas nas estações de avaliação de corrosão na UHE-Salto Pilão apresentaram o mesmo padrão de corrosão que as amostras coletadas na UHE-Balbina (FIGURA 20). No caso dos CP's coletados nesta usina, havia uma maior diversidade nos tipos de materiais utilizados (QUADRO 5), mas da mesma forma que nos Cp's da UHE-Balbina, os metais mais agredidos foram as ligas de aço carbono, seguido das ligas de cobre e por último as ligas de aço inox. As últimas duas ligas metálicas não sofreram deformações (pits de corrosão) decorrentes da ação localizada da biocorrosão, mas havia a deposição de material, *biofouling*, devido a presença de matéria orgânica em circulação no sistema (FIGURA 29).

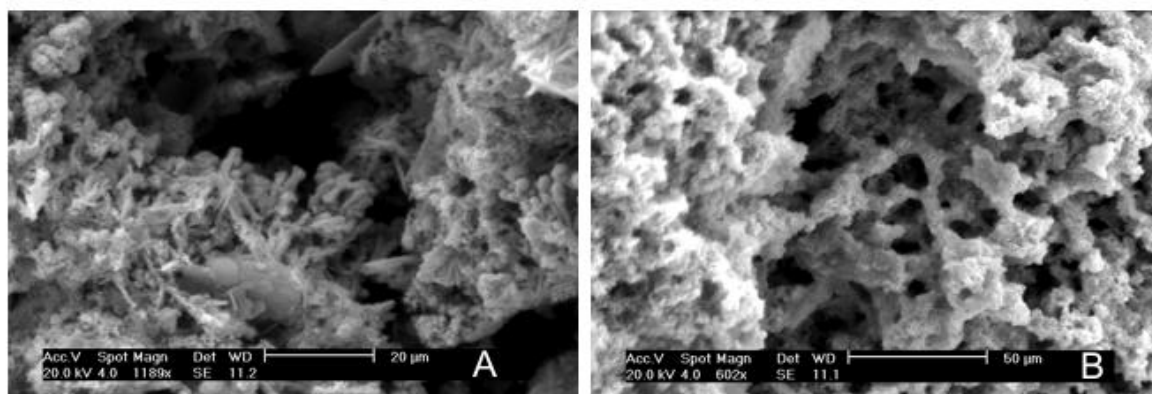


FIGURA 29 – Microscopia eletrônica de varredura de tubérculos de corrosão obtidos de corpos de prova de aço carbono coletados na UHE-Salto Pilão. A – Presença de estruturas filamentosas com material depositado sobre, possibilidade de serem depósitos de óxido de ferro (1189x), B – Observação de estrutura de fragmento de tubérculo de corrosão onde se encontram diversos canais entre o material depositado (602x).

Fonte: Autor

5.2.2 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

As amostras da UHE-Salto Pilão foram inoculadas em meio específico para bactérias redutoras de sulfato. Por meio da metodologia convencional foram detectadas bactérias redutoras de sulfato nas ligas metálicas: D29, R03, Y13, Y09, R18, Y04 e R12 (QUADRO 5). Todas apresentavam acentuados tubérculos de corrosão. As ligas D11 e D01 apresentaram tubérculos, mas foram negativas para BRS com a metodologia convencional (FIGURA 30). Análises moleculares corroboraram a presença de BRS nas ligas consideradas positivas nos testes de ausência/presença de bactérias redutoras de sulfato.

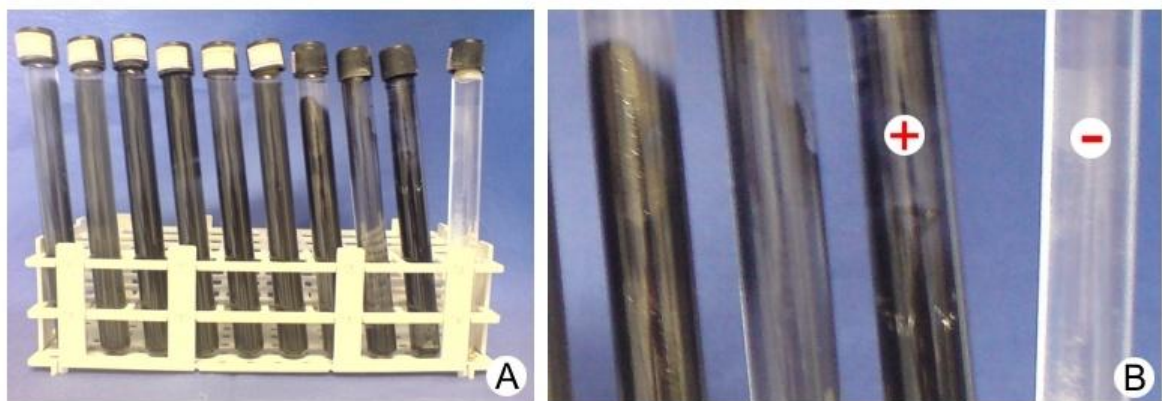


FIGURA 30 – Cultivo seletivo de BRS utilizando meio de cultivo específicos e metodologia para cultivo de anaeróbicos obrigatórios. Tubos com ausência de oxigênio para o isolamento de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) após 20-50 dias de incubação em estufa de anaerobiose com circulação de gás carbono a 30°C. A) A presença de BRS é visualizada pela formação de depósito de sulfeto ferroso de cor preta; B) Tubos positivos para BRS à esquerda e tubo negativo à direita.

Fonte: Autor

As ligas D29, D11 e D01 fazem parte do conduto forçado, enquanto R03, R12 e R18 compõem peças fixas sem pintura. As ligas Y13, Y09 e Y04 são componentes das tubulações.

Até recentemente, a diversidade dos microrganismos de amostras ambientais era avaliada apenas por caracterização fenotípica e genotípica de organismos

cultiváveis em laboratório. Entretanto, estes representam apenas uma parcela da diversidade de microrganismos existentes.

A identificação de bactérias anaeróbias, como *Desulfovibrio*, é difícil e demorada por meio dos métodos convencionais. Os microrganismos acidófilos, que aceleram a oxidação do ferro apresentam uma grande diversidade, porém seu isolamento e identificação também são dificultados por limitações técnicas.

Na tentativa de minimizar estas dificuldades, a metagenômica surgiu como uma estratégia para acessar a diversidade microbiana de amostras ambientais de maneira rápida e eficiente. O DNA purificado a partir da amostra é representativo de todos os microrganismos presentes nesta amostra. Por meio de sua amplificação com *primers* específicos para determinadas sequências de DNA, é possível identificar, dentre as inúmeras espécies presentes, apenas os microrganismos de interesse (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000).

A aplicação destes métodos permite o acesso à informação direta sobre a estrutura das comunidades presentes no biofilme. Genes que codificam RNA ribossômicos, como o 16S rRNA, foram usados para o desenho de *primers* que permitem a detecção de grupos de BRS (DEVEREUX et al., 1992) e aplicados para demonstrar a presença destas bactérias em diversos habitats, como biofilmes anaeróbios. Análises filogenéticas por meio de comparações entre sequências de rRNA 16S permitem classificar os gêneros de BRS em grupos distintos (DEVEREUX; HINES; STAHL, 1996), conforme descrito no Quadro 7.

O GRUPO 1, que compreende o gênero de BRS *Desulfotomaculum* sp, não foi encontrado na primeira coleta em nenhum dos metais na UHE-Salto Pilão. Este gênero contém espécies termófilas, capazes de viver em ambientes extremos. O GRUPO 3, composto por *Desulfobacterium* sp, também não foi encontrado em nenhum dos metais (TABELA 2).

O GRUPO 2, representado pelo gênero *Desulfobulbus* sp, foi observado nos metais INOX AISI304, Cu/Ni 90/10, AISI 410T e ASTM A743, na primeira coleta. Na

segunda coleta, também foi encontrado no metal ASTM A53, enquanto o GRUPO 4 foi isolado apenas do metal Cu/Ni 90/10, em ambas as coletas (TABELA 2).

O GRUPO 5 compreende os gêneros *Desulfovibrio* sp, *Desulfosarcina* sp, *Desulfococcus* sp e *Desulfonema* sp, e foi isolado dos metais INOX AISI304, AISI 410T e ASTM A743, na primeira coleta. Na segunda coleta, todos os metais apresentavam DNA de BRS do grupo 5.

O GRUPO 6, composto por *Desulfovibrio* sp, foi encontrado nos metais Cu/Ni 90/10, SAR 50BN, ASTM A36, ASTM A743 e ASTM A53 na primeira coleta. Na segunda coleta, além dos metais listados acima, ainda o AISI 410T.

TABELA 2. Identificação de grupos de BRS seguindo a metodologia de amplificação por *primers* específicos descrita por DALY; SHARP; McCARTHY, 2000. Coletas 1 e 2 - UHE-Salto Pilão.

GRUPOS	GÊNEROS	METAIS ONDE FORAM ENCONTRADOS	PEÇAS	COLETA 1	COLETA 2
1	<i>Desulfotomaculum</i> sp			-	-
2	<i>Desulfobulbus</i> sp	INOX AISI304	Apoio da vedação das comportas, grade da tomada de água de drenagem, parafusos	+	+
		Cu/Ni 90/10	Trocador de calor do gerador	+	-
		SAR 50BN	Conduto forçado	-	-
		AISI 410T	Roda, eixo	+	+
		ASTM A36	Peças fixas (sem pintura)	-	-
		ASTM A743	Rotor	+	-
		ASTM A53	Tubulação	-	+
3	<i>Desulfobacterium</i> sp			-	-
4	<i>Desulfobacter</i> sp	Cu/Ni 90/1	Trocador de calor do gerador	+	+
5	<i>Desulfovibrio</i> sp <i>Desulfosarcina</i> sp <i>Desulfococcus</i> sp <i>Desulfonema</i> sp	INOX AISI3040	Apoio da vedação das comportas, grade da tomada de água de drenagem, parafusos	+	+
		Cu/Ni 90/1	Trocador de calor do gerador	-	+
		SAR 50BN	Conduto forçado	-	+
		AISI 410T	Roda, eixo	-	+
		ASTM A36	Peças fixas (sem pintura)	-	+
		ASTM A743	Rotor	+	+
		ASTM A53	Tubulação	-	+
6	<i>Desulfovibrio</i> sp	INOX AISI3040	Apoio da vedação das comportas, grade da tomada de água de drenagem, parafusos	-	+
		Cu/Ni 90/10	Trocador de calor do gerador	-	+
		SAR 50BN	Conduto forçado	-	+
		AISI 410T	Roda, eixo	-	+
		ASTM A36	Peças fixas (sem pintura)	-	+
		ASTM A743	Rotor	+	+
		ASTM A53	Tubulação	+	+

Nota: (+) presença de Bactéria Redutora de Sulfato e (-) ausência de Bactéria Redutora de Sulfato

Embora os testes clássicos sejam funcionais, a abordagem molecular permite uma maior acurácia na análise, eliminando possíveis falhas metodológicas ocasionadas pela fisiologia do microrganismo. Ainda, por meio deste tipo de estratégia, o tempo entre a coleta e a identificação é reduzido consideravelmente, em comparação com o período despendido com os testes convencionais, que podem levar até cinquenta dias para a leitura dos resultados.

5.2.3 Bactérias Oxidante do Ferro

Na UHE-Salto Pilão todos os corpos de prova apresentaram positividade para bactérias oxidantes de ferro (FIGURA 31). As bactérias oxidantes de ferro possuem grande diversidade estrutural, apresentam a capacidade de oxidar o íon ferroso a férrico e, além da corrosão, são capazes de produzir flóculos e depósitos de “fouling” inorgânico e biológico nos sistemas de águas industriais, contribuindo para falhas mecânicas em diversos equipamentos industriais.

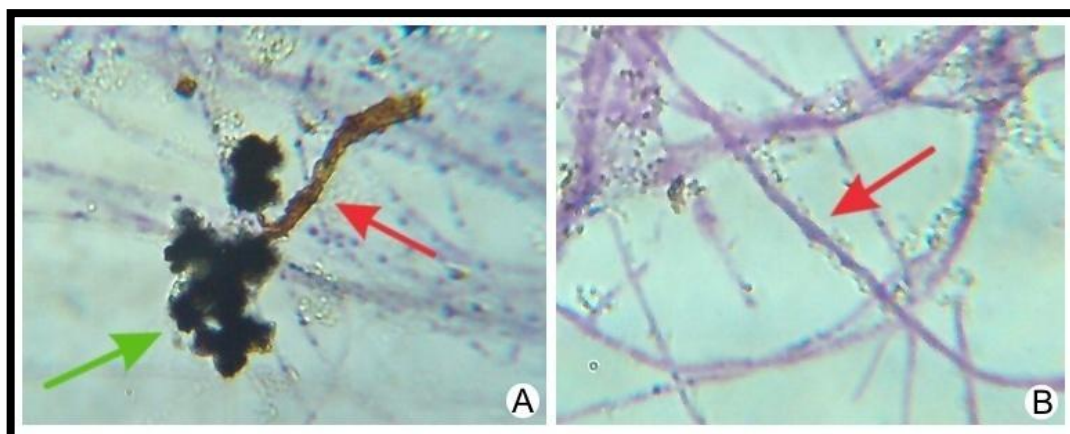


FIGURA 31 - Micromorfologia de Ferrobactérias (Coloração de GRAM) UHE-Salto Pilão, Ibirama-SC. Bactéria do gênero *Gallionella* sp (Microscopia ótica 1000x), onde a seta vermelha indica o microrganismo e a seta verde indica óxido de ferro aderido ao microrganismo (A). Bactéria do gênero *Sphaerotilus* sp (Microscopia ótica 1000x), onde a seta vermelha indica o microrganismo (B).

Fonte: Autor

Esses microrganismos autotróficos apresentam bainhas helicoidais perpendiculares ao eixo da célula, são constituídas por hidróxido de ferro, dissolvem-

se em ácidos fortes e quando se desprendem, aumentam a quantidade de sólidos em suspensão, como na água de refrigeração (VIDELA, 2003).

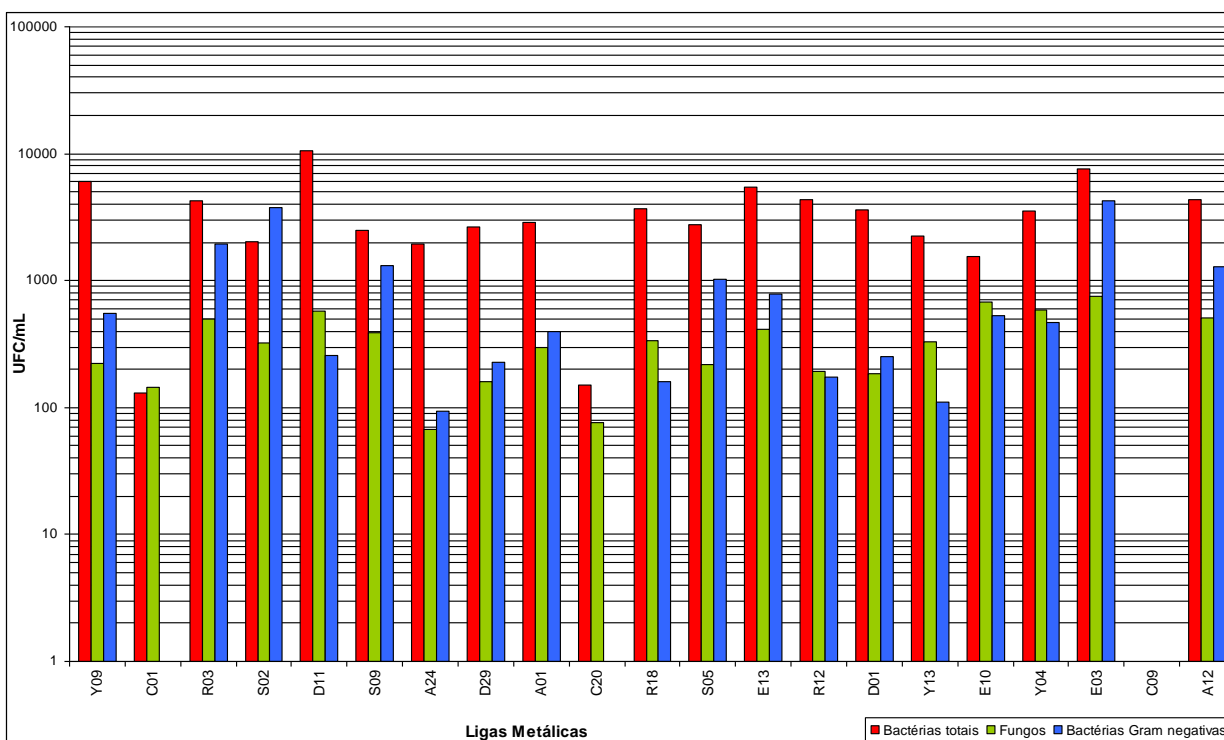
5.2.4 Bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas

Para a análise de bactérias aeróbicas e anaeróbicas nas amostras coletadas na UHE-Salto Pilão foi realizada uma análise qualitativa, semelhante à análise realizada na UHE-Balbina.

Uma análise quantitativa também foi realizada, devido ao conhecimento prévio de que o rio Itajaí-Açu recebe uma grande carga orgânica de resíduos de suinocultura. Este dado foi confirmado pelo resultado bacteriológico da água emitido pelo CEPPA – Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (UFPR) (Anexo A). Assim, realizando a análise quantitativa, foi possível estimar a quantidade de microrganismos que poderiam vir a contribuir na formação do biofilme.

Observando todas as ligas metálicas analisadas no experimento na UHE-Salto Pilão, o número de bactérias totais foi maior nas ligas D11 e E03, que apresentaram um número acima de 7×10^3 UFC/mL. Bactérias gram-negativas foram observadas em número elevado nas ligas E03 e S02 (GRÁFICO 1). As ligas metálicas D11, E03, E10 e S02 são componentes, respectivamente, de: conduto forçado; eixo/roda e rotor (QUADRO 5). A presença destas bactérias (GRÁFICO 1) nos tubérculos de corrosão dos CP's pode ser um fator desencadeante de processos microbiológicos que levam à formação de biofilmes e, em consequência, à biocorrosão. No grupo de bactérias gram-negativas (GRÁFICO 1) destaca-se, principalmente o gênero *Pseudomonas* sp, que desempenha um papel importante e bem documentado no estabelecimento dos biofilmes.

GRÁFICO 1 - Contagem de bactérias totais, bactérias gram-negativas e fungos (UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônia) isolados dos corpos de prova da primeira coleta (02/2008) UHE-Salto Pilão – Ibirama (SC).



5.2.5 Fungos

Na UHE-Salto Pilão os principais gêneros encontrados foram *Aspergillus* sp, *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp, *Phoma* sp, *Rhizopus* sp, *Chaetomium* sp e *Cladosporium* sp (FIGURA 32). Para a identificação foi empregada a mesma metodologia utilizada para os fungos isolados na UHE-Balbina, com avaliação da macromorfologia, micromorfologiam e sequenciamento de região ITS (FIGURAS 26, 27 e 28).

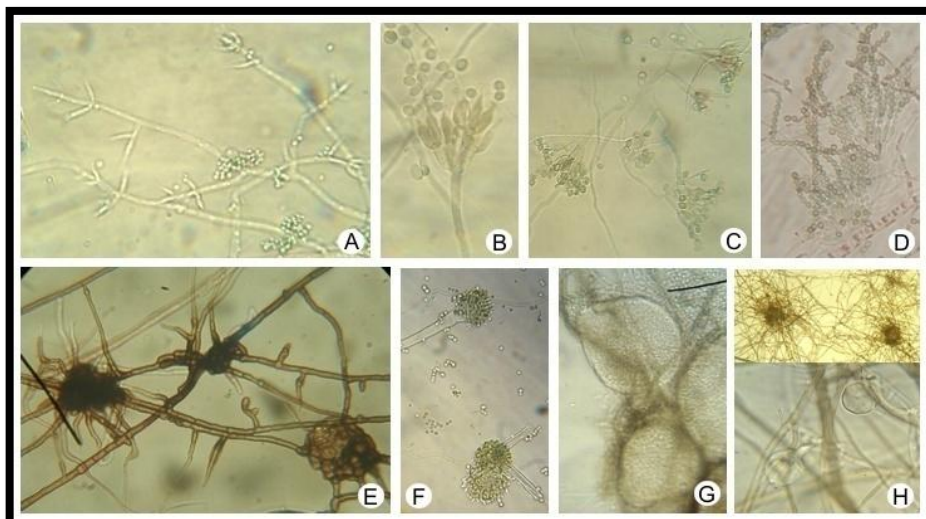


FIGURA 32. Micromorfologia dos fungos isolados dos CP's (Microscopia ótica 400x). Gêneros: (A) *Trichoderma* sp; (B) *Penicillium* sp1 (C) *Cladosporium* sp; (D) *Penicillium* sp2; (E) *Phoma* sp1; (F) *Aspergillus* sp; (G) *Phoma* sp2; (H) *Chaetomium* sp.

Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

As Centrais Geradoras Hidrelétricas possuem vários setores e componentes imersos em água constantemente. Estes estão sujeitos aos efeitos nocivos da formação de biofilmes e necessitam constantemente de manutenção para que o funcionamento dos equipamentos não seja interrompido. Por isso, caso ocorra um problema que danifique algum componente da usina, esta terá sua geração de energia elétrica comprometida e gerará grandes prejuízos.

A Manaus Energia S/A foi multada em R\$ 6,45 milhões por problemas de manutenção nos sistemas de distribuição e pela falta dos investimentos necessários à prestação do serviço adequado. A multa equivale a 0,8% do faturamento anual da distribuidora no período de março de 2005 a fevereiro de 2006. Outro exemplo ocorreu com a concessionária CERON, que foi multada em R\$ 2,594 milhões pelo descumprimento das metas anuais dos indicadores que avaliam a duração (DEC) e a frequência (FEC) das interrupções de energia no período 2000 a 2002, este valor corresponde a 1% do faturamento da empresa no período de outubro de 2002 a setembro de 2003 (ANEEL, 2009).

Este trabalho buscou a caracterização dos biofilmes e padronização de metodologias para isolamento e detecção de microrganismos envolvidos com a corrosão influenciada por microrganismos. Foram analisados os corpos de prova (ligas metálicas que permaneceram em contato direto com a água dos rios Uatumã e Itajaí-Açu) e deles isolados e identificados microrganismos encontrados em biofilmes sobre a superfície de metais específicos. Extremamente importante o reconhecimento e caracterização do perfil microbiológico existente neste tipo de ambiente, para que estratégias possam ser dimensionadas visando o controle e redução dos efeitos da biocorrosão em superfícies metálicas de Centrais geradoras hidrelétricas expostas às águas dos reservatórios.

A identificação de microrganismos por meio de técnicas moleculares normalmente se mostra eficaz e necessária principalmente nos casos de microrganismos não cultiváveis, envolvendo técnica de metagenômica utilizada por

Daly, Sharp e McCarthy, (2000) e Devereux, Hines, Stahl (1996). Devido à importância da preservação de bancos biológicos para estudos, o isolamento e conservação de cepas isoladas através de técnicas microbiológicas convencionais, utilizando-se meios seletivos para isolamento e técnicas de microscopia ótica e eletrônica para identificação, continuam sendo muito utilizadas para estudos de caracterização de biofilmes. Foi utilizado meio seletivo e técnica microbiológica específica para a detecção de presença e ausência dos microrganismos de cultivo diferenciado, que possuem metabolismo exigente e condições específicas de anaerobiose, mesmas técnicas utilizadas por Rao et al. (2000), Rodriguez-Cavallini e Cruz (1999), mas com algumas adaptações. Para alguns grupos bacterianos isto pode ser perfeitamente executado, por exemplo, as enterobactérias e bactérias oxidantes do ferro, mas no caso do grupo de BRS uma boa opção é a utilização de técnicas moleculares que mostraram uma maior sensibilidade para a detecção de gêneros e/ou espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Ben-Dov, Brenner e Kushmaro, (2006).

O primeiro passo na formação de biofilmes é a adsorção de compostos orgânicos na superfície dos metais. Este fato foi visualizado com mais intensidade no ponto A (FIGURA 11) da estação de corrosão na UHE-Balbina, que era alimentada com água do fundo do reservatório devido a proximidade da captação com o fundo do reservatório (informações fornecidas pelos engenheiros e técnicos da usina). No caso do ponto B (FIGURA 11) o depósito de material orgânico era menos acentuado, pois, apesar da captação de água estar igualmente a 10m de profundidade, o fundo do reservatório está mais abaixo (50m cota máxima). Devido a grande quantidade de acúmulo orgânico no ponto A, este foi o que apresentou a maior diversidade de microrganismos. Somado os fatores: alta carga orgânica que é coletada pelos dutos de captação de água e temperatura constante de 29-30°C durante todo o ano, este reservatório oferece condições excelentes ao desenvolvimento microbiano e dessa forma este material vem a contribuir com a corrosão sobre a superfície dos metais expostos, condições estas relatadas por Maciel (1982) e sabidamente importantes para o desenvolvimento do microrganismos que podem vir a influenciar o processo de corrosão na superfície metálica.

A avaliação realizada com as amostras coletadas no Rio Itajaí-Açu mostra uma situação um pouco diferenciada, neste caso temos um rio de média anual de temperatura em torno de 21,8 °C (SCHETTINI, 2002) e que recebe muitos afluentes, pode-se observar uma grande diferença na quantidade que coliformes totais e fecais nos resultados analíticos realizados pelo CEPPA (ANEXO A), onde os pontos de coleta (Pontos 3 e 4) a jusante do rio, em relação a UHE-Salto Pilão, encontram-se com uma carga quatro vezes maior que os pontos de coleta (Pontos 1 e 2) a montante. Com as amostras dos corpos de prova metálicos expostos nas estações de corrosão (FIGURA 12) foram realizados isolamentos com meios de cultivo seletivo e isolou-se uma grande quantidade de microrganismos, por exemplo, as ligas D11 e E03 apresentaram um número elevado de unidades formadoras de colônia, acima de 7×10^3 UFC/mL (GRAFICO 1) e as ligas E03 e S02 apresentam um elevado número de bactérias gram-negativas isoladas (GRÁFICO 1).

Considerando que estes metais são compostos de ligas baixas, praticamente sua composição é de aço carbono (QUADRO 5), temos os dois fatores necessários para o início de uma colonização sobre a superfície dos metais e formação do biofilme: Elevada concentração de microrganismos e metais com pouco tratamento e predisposição a sofrer com processos corrosivos. Dentre os isolados bacterianos identificados como gram-negativos, observou-se grande quantidade de bactérias do gênero *Pseudomonas* sp, que são consideradas precursoras na formação de biofilmes juntamente com algumas enterobactérias, caso semelhante relatado por Katsikogianni e Missirlis (2004), que também encontram-se em grande quantidade nas amostras de água e corrosão (GRAFICO 1)(ANEXO A).

Uma importante característica da formação de biofilmes é a comunicação através de sinais moleculares inter-espécies, sinais *quorum sensing*, que possibilitam a modificação do metabolismo dos envolvidos (RAMPONI et al., 2007). Esta relação fornece subsídios para que a resistência de alguns microrganismos envolvidos fique potencializada e dessa forma inicia-se a consolidação do biofilme e posterior maturação com o desenvolvimento de várias espécies microbianas. A secreção de Material Polimérico Extracelular (MPE) fornece a base necessária para esta adesão inicial e posterior manutenção do micro-ambiente formado, que irá

permitir o desenvolvimento de microrganismos como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) na fase de maturação do biofilme conforme citado por Beech e Sunner (2004).

Na maturação do biofilme vários grupos bacterianos, por exemplo, bactérias oxidantes do ferro e bactérias redutoras de sulfato, aceleram ou influenciam o processo de corrosão. O mecanismo envolvido nesta fase está relacionado com os metabólitos gerados por estes microrganismos que são compostos por ácidos e outros elementos agressivos. Estes elementos são gerados em condições especiais, que apenas são possíveis, pois, conforme relatado por Koneman et al. (2001), alguns microrganismos possui a capacidade de secretar exopolímeros e gerar uma matriz exopolimérica, capaz de fornecer a proteção a colônia em formação. Sabe-se que em condições especiais os microrganismos podem alterar o metabolismo, portanto em condições diferenciadas oriundas da formação do biofilme, fica a situação ideal para o desenvolvimento de processos específicos que irão auxiliar a corrosão influenciada por microrganismos.

Os ácidos orgânicos gerados por estes microrganismos seguem uma sequência lógica, através do consumo e geração destes por diversos grupos bacterianos (VIDELA, 2003). Estes compostos ao entrar em contato com a superfície metálica aceleram a reação catódica que iria expor o íon ferroso (Fe^{2+}) de forma natural (COETSER; CLOETE, 2005).

Nas amostras analisadas foram detectados bactérias do grupo das oxidantes de ferro, principalmente nas amostras coletadas da UHE-Salto Pilão, mas isto ocorreu, pois, foi utilizada uma maior variedade de metais, que representavam todas as ligas que seriam utilizadas nos equipamentos da usina. Nas amostras obtidas na UHE-Balbina, foram analisadas apenas três ligas metálicas, sendo apenas uma de aço carbono, onde se encontra a superfície perfeita ao ataque por ácidos orgânicos, visto que dentre todas as ligas testadas, apenas os corpos de prova de aço carbono formavam tubérculos de corrosão acentuados, situação semelhante foi relatada por Sand, 1997.

A formação de pits de corrosão e tubérculos mostra um grau acentuado de corrosão e são responsáveis pelas principais falhas mecânicas. Uma das indicações da presença das bactérias oxidantes de ferro é o depósito de hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (principal componente que compõem a coloração marrom-alaranjado do tubérculo de corrosão) (HEITZ; FLEMING; SAND, 1996).

No interior do tubérculo de corrosão encontra-se um aglomerado de compostos orgânicos e inorgânicos favorecendo a corrosão da superfície metálica em questão, observar Figura 20, onde se tem a amostra de tubérculos de corrosão estabelecidos (maduros), e a Figura 12, corpos de prova virgens, antes de serem instalados. Além da coloração negra na parte interna do tubérculo, os corpos de prova de aço carbono com corrosão acentuada possuem odor característico de ácido sulfídrico (H_2S), um indicativo da presença de bactérias oxidantes do enxofre e redutoras de sulfato, visto que estes microrganismos são geradores e consumidores de compostos a base de enxofre, segundo Videla (2003) as reações de oxidação e redução do enxofre possui como resultado a formação e consumo dos ácidos sulfúrico e sulfídrico (FIGURA 3).

O crescimento das bactérias redutoras de sulfato, diferente dos grupos anteriores, é extremamente delicado, estes microrganismos são exigentes e uma das principais necessidades é a ausência total de oxigênio. Quando o biofilme está maduro, a possibilidade de se formarem colônias de BRS é muito grande, pois no interior do biofilme existe uma depleção na concentração de oxigênio em comparação com o leito líquido, os modelos apresentados por Picioreanu, Xavier e Van Loosdrecht (2004) comprovam esta teoria. Esta característica permite o desenvolvimento deste grupo bacteriano. Devido à dificuldade de se isolar estes microrganismos, uma estratégia para a detecção de bactérias redutoras de sulfato em amostras ambientais é a utilização de meios seletivos para confirmação de presença e ausência (APHA; AWWA; WPCF, 1999) com o auxílio de técnicas de cultivo especiais (FIGURA 16). Outra possibilidade é a utilização de ferramentas moleculares para detecção, estratégia anteriormente adotada por outros autores Devereux et al. (1992) e Daly, Sharp e McCarthy (2000). Bem-Dov, Brenner e Kushmaro (2006) utilizaram ferramentas moleculares para a quantificação de BRS.

Com a utilização de meio seletivo e a adaptação da técnica de cultivo em anaerobiose proposta por Rodriguez-Cavallini e Cruz (1999), foi possível identificar a presença de BRS em amostras obtidas dos CP's em ambas as usinas. Esta técnica mostrou-se suficiente para a detecção em amostras de aço carbono onde se encontra uma quantidade grande de tubérculo de corrosão, conseqüentemente, biofilme e *biofouling*. Mas ao se aplicar os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (QUADRO 7) (FIGURA 17) aumentou-se a eficiência das análises, visto que a quantidade de amostras positivas foram confirmadas e amostras antes negativas, agora mostravam resultados positivos (FIGURA 23).

A utilização de ferramentas moleculares mostrou-se eficaz e extremamente importante no caso das bactérias redutoras de sulfato, pois reduziu o tempo de análise de 50 dias para 7 dias. O cultivo com meio seletivo é extremamente dispendioso e oferece um resultado ineficiente quando comparado à metodologia molecular aplicada. Utilizou-se apenas uma metodologia para confirmação da presença dos seis grupos principais de BRS (QUADRO 7) para se confirmar a origem da corrosão (influenciada ou não por microrganismos), mas poderiam ser aplicadas técnicas, como a utilizada por Bem-Dov, Brenner e Kushmaro (2006), para a quantificação destes grupos nas amostras obtidas.

Foi realizada uma alteração na metodologia original aplicada por Daly, Sharp e McCarthy (2000) reduzindo o número de reações utilizadas. O trabalho citado utilizou a técnica de Nested-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o grupo bacteriano e na sequência aplicaram os iniciadores específicos para cada grupo (QUADRO 7). Os resultados obtidos com a aplicação direta dos iniciadores específicos, mostrou-se ineficiente para alguns grupos (grupo 6). No presente trabalho também foi utilizada a mesma aplicação direta, mas o êxito foi garantido devido às amostras possuírem origem direta de biofilme, diferente do trabalho apresentado pelo grupo de Daly, Sharp e McCarthy (2000), onde as amostras de DNA extraídas eram oriundas de Lodo de estação de tratamento de esgoto. A confirmação de que cada grupo amplificado positivamente era correspondente aos gêneros previsto (QUADRO 7) foi obtida através do

sequenciamento das amostras e posterior comparação com sequências depositadas em bancos de dados moleculares (NCBI, 2009).

As alterações na superfície geradas pelo metabolismo dos microrganismos envolvidos com o processo de corrosão influenciada por microrganismos proporcionam a microrganismos, como os fungos, um substrato perfeito para o seu desenvolvimento. Existe uma grande quantidade de fungos que pode se desenvolver sobre a matriz exopolimérica de origem bacteriana ou alguns fungos que utilizam os compostos orgânicos secretados pelas bactérias que vivem nos biofilmes (GÖRS et al., 2007). A colonização de biofilmes com a presença de grupos fúngicos específicos, em alguns casos está relacionada ao comportamento decompositor inerente a este grupo, onde eles se desenvolvem para degradar a matéria orgânica presente e ao lançar enzimas e ácidos, principalmente o último composto, e desta forma contribuem com o fortalecimento do caráter corrosivo do biofilme instalado (CARVALHO, 2007).

A presença de fungos em substrato inorgânico, por exemplo superfícies metálicas, não é uma novidade, visto que existem vários trabalhos que mostram a destruição de superfícies rochosas por fungos (WARSCHEIDT; BRAAMS, 2000)

Este estudo revelou a diversidade microbiana existente em amostras de biofilme coletadas de corpos de prova metálicos de diferentes materiais. Estes materiais foram instalados em dois ambientes diferentes e extremamente distantes (aprox. 4000 km), uma Central geradora hidrelétrica instalada e em operação (UHE-Balbina) e outra em construção (UHE-Salto Pilão). Foi possível confirmar a existência de vários dos microrganismos citados na literatura como possíveis agentes influenciadores no processo de corrosão influenciada ou acelerada por microrganismos. Apesar de serem ambientes diversos, com reservatórios de profundidades diferentes e condições climáticas também diferentes, foram observados padrões semelhantes com relação ao ataque das superfícies metálicas. Ambos os experimentos tiveram a liga de aço carbono extremamente atacada e foram detectados os mesmos gêneros para BRS, grupos 2, 5 e 6 (QUADRO 7).

Padronizou-se metodologias, já antes descritas, para que pudessem ser aplicadas em amostras expostas em estações de corrosão em usinas hidrelétricas, facilitando as análises e procurando acelerar o processo de reconhecimento da origem do processo corrosivo, adicionando conceitos e subsídios a outras avaliações, por exemplo, análises eletroquímicas.

7 CONCLUSÕES

Com o presente projeto foi possível observar e confirmar o perfil de microrganismos envolvidos com a corrosão influenciada por microrganismos. Através da visualização por Microscopia eletrônica de varredura observou-se a deposição de material orgânico sobre a liga metálica e a formação de estruturas que sugerem a presença de micélio e depósitos de material ainda não caracterizado.

Foi possível realizar a padronização de metodologia a se aplicar para o isolamento e detecção de bactérias aeróbicas e aeróbicas facultativas envolvidas com a formação de biofilme, fungos que possuem um papel importante na colonização e maturação do biofilme, além de bactérias anaeróbicas obrigatórias que estão diretamente ligadas à formação de *pits* de corrosão.

Observou-se que a melhor metodologia para identificação da presença de BRS foi a abordagem molecular através da utilização de *primers* específicos e sequenciamento. Quanto às bactérias aeróbicas, foi utilizado bioquimismo e características morfológicas para a identificação.

A identificação dos fungos foi realizada através de metodologia microbiológica convencional, utilizando-se microscopia ótica e eletrônica e a confirmação de alguns microrganismos foi realizada através de sequenciamento de região ITS do DNA ribossomal.

Com o material coletado da UHE-Balbina, pode-se observar que existia uma grande diferença qualitativa entre as amostras do ponto central (pontos B e C) e o ponto de coleta próximo a máquina 5 (ponto A), onde sabe-se que existe um maior acúmulo de material orgânico depositado nos trocadores de calor e conseqüente entupimento que ocasiona a maior parte das paradas de máquina sem programação. Devido a grande quantidade de sedimentos depositados, forma-se um meio propício ao desenvolvimento de microrganismos e conseqüentemente a influência destes sobre o processo de corrosão causando a aceleração do mesmo. Apesar do programa de desinfecção da água utilizada para o resfriamento utilizando

“Cloro”, foi sugerido uma técnica mais eficiente utilizando NaOH constantemente em uma dada concentração para melhorar a eficiência do processo de manutenção das superfícies intactas.

As análises do material coletada da UHE-Salto Pilão sinalizam a possibilidade de problemas com corrosão influenciada por microrganismos, visto que ainda não haviam finalizado a construção no período de coleta das amostras e a presença de contaminantes oriundos de alta carga orgânica nos rios que irão alimentar o reservatório da usina. Com o auxílio das metodologias empregadas foi possível em um curto espaço de tempo detectar a presença de microrganismos potenciais a corrosão influenciada por microrganismos, como por exemplo as bactérias redutoras de sulfato. Neste caso foi sugerido ao consórcio construtor da usina a pintura de proteção das superfícies metálicas de aço carbono que permanecerão expostas constantemente a influência das águas do Rio Itajaí-Açu.

8 TRABALHOS FUTUROS

- Sugere-se o isolamento de bactérias redutoras de sulfato para estudos em laboratório da ação sobre metais como o aço carbono,
- Padronização de metodologia molecular para quantificação das BRS em amostras, utilizando-se PCR em tempo real e *primers* específicos,
- Estudo genético para avaliar a ligação da comunicação *quorum sensing* entre o grupo das *Pseudomonas* sp na formação do biofilme e outros microrganismos envolvidos com a colonização inicial de biofilmes,
- Desenvolvimento de estratégias para dificultar a formação do biofilme microbiano sobre superfícies metálicas e, conseqüentemente, a biocorrosão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N. J., T. A. BRIDGEMAN, e E. A. ZOTTOLA. "Enterococcus faecium attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods." *Journal of Food Protection* 61 (1998): p.833-838.

ANEEL. *Agência Nacional de Energia Elétrica*. 2009. www.aneel.gov.br (acesso em julho de 2009).

APHA; AWWA; WPCF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20ªed. Edição: L. S. CLESCERL, A. E. GREENBERG e A. D. EATON. Washington: American Public Health Association, 1999.

BARNETT, H. C., e B. B. HUNTER. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis: Burgess Publications, 1987.

BEECH, I. B., e C. C. GAYLARDE. "Recent advances in the study of biocorrosion - an overview." *Revista de Microbiologia* 30 (1999): 177-190.

BEECH, I. B., e C. W.S. CHEUNG. "Interactions of exopolymers produced by sulphate reducing bacteria with metal ions." *International Biodeterioration and Biodegradation* 35 (1995): 59-72.

BEECH, I. B., e J. SUNNER. "Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals." *Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004): 181-186.

BEECH, I. B., R. TAPPER, e R. GUBNER. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. Amsterdam: L. V. Evans, 2000.

BEECH, I. B., V. ZINKEVICH, R. TAPPER, e R. AVCI, R. GUBNER. "10th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium." *The interaction of exopolymers produced by marine sulphate-reducing bacteria with iron*. Frankfurt: Dechema Monographs, 1996.

BEECH, I. B., V. ZINKEVICH, R. TAPPER, e R. GUBNER. "The direct involvement of extracellular compounds from marine sulphate-reducing bacterium in deterioration of steel." *Geomicrobiology Journal* 15 (1998): 119-132.

- BEN-DOV, E., A. BRENNER, e A. KUSHMARO. "Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* Genes." *Microbial Ecology*, 2006.
- BOZZOLA, J. J., e L. D. RUSSELL. *Electron Microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1999.
- BRASILEIRO, A.C.M., e V.T.C. CARNEIRO. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1998.
- BRYANT, R. D., W. JANSEN, J. BOIVIN, E. J. LAISHLEY, e J. W. COSTERTON. "Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of steel." *Applied Environmental Microbiology* 57 (1991): 2804-2809.
- BUCHANAN, R. E., e N. E. GIBBONS. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974.
- CARAVELLI, A.H., L. GIANNUZZI, and N. ZARITZKY. "Reduction of hexavalent chromium by *Sphaerotilus natans* a filamentous microorganism present in activated sludges." *Journal of Hazardous Materials* 156, no. 1-3 (2008): 214-222.
- CARVALHO, C.C.C.R. "Biofilms: Recent Developments on an Old Battle." *Recent Patents on Biotechnology* 1 (2007): 49-57.
- CHEUNG, C. W. S., e I. B. BEECH. "The use of biocides to control sulphate-reducing bacteria in biofilms on mild steel surfaces." *Biofouling* 9 (1996): 231-249.
- COETSER, S. E., e T. E. CLOETE. "Biofouling and biocorrosion in industrial water systems." *Critical Reviews in Microbiology* (Routledge) 31 (2005): 213-232.
- COSTA, E. T. R. "Dissertação de mestrado em microbiologia veterinária." *Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável*. Seropédica, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.
- CRAGNOLINO, G., e O. H. TUOVINEN. "The role of sulphate-reducing and sulfur-oxidising bacteria in the localized corrosion of iron-based alloys, a review." *International Biodeterioration and Biodegradation* 20 (1984): 9-18.

- CRIADO, M. T., B. SUÁREZ, e C. M. FERRERÓS. "The importance of bacterial adhesion in dairy industry." *Food Technology* 48 (1994): 123-126.
- CROLET, J. L. "From biology and corrosion to biocorrosion." *Oceanol. Acta* 15 (1992): 87-94.
- 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 (2000): 1693-1705.
- DAUMAS, S., Y. MASSIANI, e J. CROUSIER. "Microbiological battery induced by sulphate-reducing bacteria." *Corrosion Science* 28 (1988): 1041-1050.
- DEVEREUX, R., M. D. KANE, J. WINFREY, e D. A. STAHL. "Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria." *System Applied Microbiology* 15 (1992): 601-609.
- DEVEREUX, R., M. E. HINES, e D. A. S. STAHL. "Cycling characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons." *Microbial Ecology* 32 (1996): 283-292.
- DINH, H. T., J. KUEVER, M. MUBMANN, A. W. HASSEL, M. STRATMANN, e F. WIDDEL. "Iron corrosion by novel anaerobic." *Letters to Nature* (Nature Publishing Group) 427 (2004): 829-832.
- EDYVEAN, R. G. J., J. BENSON, C. J. THOMAS, I. B. BEECH, e H. VIDELA. "Biological influences on hydrogen effects in steel in seawater." *Materials Performance* 37 (1998): 40-44.
- GÖRS, S., R. SCHUMANN, N. HAUBNER, e U. KARSTEN. "Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll a as biomarkers." *International Biodeterioration & Biodegradation* 60 (2007): 50-59.
- HALL, T.A. "Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symp.* 1999. 95-98.
- HAMILTON, W. A. "Sulphate reducing bacteria and anaerobic corrosion." *Annual Review of Microbiology* 39 (1985): 195-217.

- HAZEN, E. L., M. A. GORDON, e F. C. REED. *Laboratory identification of pathogenic fungi simplified*. 3ed. Springfield, 1973.
- HEITZ, E., H. C. FLEMING, e W. SAND. *Microbially influenced corrosion of materials*. Berlin: Springer - Verlag, 1996.
- HERRERA, T., e M. ULLOA. *El reino de los hongos*. 1 ed. México: Micología básica y aplicada, 1990.
- HOOG, S., J. GUARRO, J. GENÉ, e M. J. FIGUEIRAS. *Atlas of Clinical Fungi - Versão 2004.11*. 2004.
- IVERSON, I. P., e G. J. OLSON. "Anaerobic corrosion by sulfate-reducing bacteria due to highly reactive volatile phosphorus compound." *Microbial Corrosion* (Metals Society), 1983: 46-53.
- JUZELIUNAS, E. "Microbially influenced corrosion acceleration and inhibition. EIS study of Zn an Al subjected for two years to influence of *Penicillium frequentans*, *Aspergillus niger* and *Bacillus mycoides*." *Electrochemistry Communications* 7 (2005): 305-311.
- KATSIKOIANNI, M., e Y.F. MISSIRLIS. "Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used in Estimating Bacteria-Material Interactions." *European Cells and Materials* 8 (2004): 37-57.
- KERN, M. E., e K. S. BLEVINS. In: *Micologia Médica*, p256. São Paulo: Premier, 1999.
- KLICH, M. A., e J. I. PITT. *A laboratory guide to the common Aspergillus species an their Teleomorphs*. Austrália: Commonwealth Scientific and Industrial Research, 1988.
- KONEMAN, E. W., S. D. ALLEN, W. M. JANDA, P. C. SCHRECKENBERGER, e W.C. WINN JR. *Diagnóstico Microbiológico*. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
- LANE, D.L., B. PACE, G.J. OLSEN, D.A. STAHL, M.L. SOGIN, e N.R. PACE. "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." *Proceedings of National Academy of Science* 82 (1985): 6955-6959.

- LARONE, D. H. *Medically important fungi: a guide to identification*. New York: Elsevier, 1987.
- LASPIDOU, D. S., e B. E. RITTMANN. "Modeling biofilm complexity by including active and inert biomass and extracellular polymeric substances." *Biofilm* 1 (2005): 285-291.
- LERICHE, V., e B. CARPENTIER. "Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single and binary biofilms in response to chlorine treatment." *Journal of Food Protection* 58 (1995): 1186-1191.
- LITTLE, B. J., P. A. WAGNER, e Z. LEWANDOWSKI. "The relationship between biomineralization and microbiologically influenced corrosion." *The British Phycological Society*, 1998.
- LUGAUSKAS, A., L. LEVINSKAIT, e D. PECIULYTE. "Micromycetes as deterioration agents polymeric materials." *International Biodeterioration & Biodegradation* 52 (2003): 233-242.
- MACIEL, C. L. "Estudos dos processos geoquímicos de obstrução de filtros de barragens." *Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Geociências da USP*. São Paulo, 1982.
- MARSHALL, K. C., R. STOUT, e R. MITCHELL. "Mechanism of initial events in the adsorption of marine bacteria to surfaces." *Journal General Microbiology* 68 (1971): 337-348.
- MCNEIL, M. B., e B. J. LITTLE. "Mackinawite formation during microbial corrosion." *Corrosion* 46 (1990): 599-600.
- MELO, I. S., e J. L. AZEVEDO. *Microbiologia Ambiental*. Ed. Embrapa, 1997.
- MENEZES, M., e S. M.A. OLIVEIRA. *Fungos Fitopatogênicos*. Pernambuco: UFRPE - Imprensa Universitária, 1993.
- MULLIS, K.B., e F.A. FALOONA. "Recombinant DNA - Part F." In: *A polymerase catalyzed chain reaction*, 335-350. San Diego: Academic Press, 1987.
- MURRAY, P. R., E. J. BARON, TENOVER, M. A., YOLKEN, F. C. e PFALLER, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 8ªed. Washington: ASM Press, 2003.

MURTHY, P. S., e R. VENKATESAN. "Evaluation of sodium hypochlorite for fouling control in plate heat exchangers for seawater application." *International Biodeterioration & Biodegradation* 55 (2004): 161-170.

NCBI. *National Center for Biotechnology Information*. 2009.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (acesso em 2009).

NEIVA, I.F. "Caracterização molecular de biosorotipos selvagens de *streptococcus mutans* isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie." *Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos*. Curitiba: UFPR, 2007.

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

PARIZZI, S. Q. F. "Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência." *Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa*. Viçosa, MG, 1998. 57p.

PICIOREANU, C., J.B. XAVIER, e M.C.M. VAN LOOSDRECHT. "Advances in mathematical modeling of biofilm structure." *Biofilms* (Cambridge University Press) 1 (2004): 337-349.

QUITELA, A. *Hidráulica*. Lisboa: Fundação Gulbenkian, 2007.

RAMPONI, G., POLTICELLI, F., BERTANI, I., RIGHETTI, K., VENTURI, V., ZENNARO, E., LEONI, L. "The Pseudomonas Quorum-Sensing Regulator RsaL Belongs to the Tetrahelical Superclass of H-T-H Proteins." *Journal of Bacteriology* 189 (2007): 1922-1930.

RAO, T.S., T.N. SAIRAM, B. VISWANATHAN, e K.V.K. NAIR. "Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system." *Corrosion Science* 42 (2000): 1417-1431.

REIS JUNIOR, F.B., V.M. REIS, e K.R.S. TEIXEIRA. "Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41 (2006): 431-438.

- RODRIGUEZ-CAVALLINI, E., e E. CRUZ. "Un método sencillo para generar anaerobiosis en tubos de cultivo." *Revista biomédica* 10 (1999): 103-106.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. e ERLICH, H.A. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239 (1988): 487-491.
- SALVAREZZA, R. C., M. F De MELE, e H. A. VIDELA. "Study of the biological films formed during the pitting of aluminium in human plasma." *The journal of the European Society for Artificial Organs*, 1984: 137-144.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, e T. MANIATIS. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2002.
- SAND, W. "Microbial Mechanisms of Deterioration of Inorganic Substrates- A General Mechanistic Overview." *International Biodeterioration & Biodegradation* 40 (1997): 183-190.
- SCHETTINI, C.A.F. "Caracterização Física do Estuário do Rio Itajaí-Açu, SC." *RBRH - Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 7 (2002): 123-142.
- SMITH, J. L., e P. M. FRATÂMICO. "Factores involved in the emergence and persistence of foodborne diseases." *Journal of Food Protection* 58 (1995): 696-708.
- STRINGARI, D. "Estudo da variabilidade genética de *Guinardia* spp por meio de marcadores RAPD e sequências ITS." *Dissertação de mestrado*. Curitiba: UFPR, 2004. 94.
- SURMAN, S., G. MORTON, e B. KEEVIL. "Biofilms: an overview." *PHLS Microbiology Digest* 13 (1996): 33-38.
- THOMAS, C. J., R. G. J. EDYVEAN, e R. BROOK. "Biologically enhanced fatigue." *Biofouling* 1 (1988): 65-77.
- THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS, e T.J. GIBSON. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Research* 22 (1994): 4673-4680.

- TOMARAS, A.P., C.W. DORSEY, R.E. EDELMANN, e L.A. ACTIS. "Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system." *Microbiology* 149 (2003): 3473-3484.
- TORTORA, G. J., B. R. L. FUNKE, e C. CASE. *Microbiologia*. 6. São Paulo: Artmed, 2002.
- VICENTE, V.A. "Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose." *Tese de doutoramento*. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2000. 172.
- VIDELA, H. A. *Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais*. 1. São Paulo: E. Blucher, 2003.
- VIDELA, H. A. "Prevention and control of biocorrosion." *International Biodeterioration and Biodegradation* 49 (2002): 259-270.
- WARSCHEIDT, T., e J. BRAAMS. "Biodeterioration of stone: a review." *International Biodeterioration & Biodegradation* 46 (2000): 343-368.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, e J. TAYLOR. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: Innis MA, PCR protocols: a guide to methods and applications." 315-322. London: Academic Press, 1990.
- WILSON, M., e W. COSTERTON. *Introducing Biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
- YUAN, S., e S. O. PEHKONEN. "Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by aerobic *Pseudomonas* NCIMB 2021 bacteria: AFM and SPS study." *Colloids and Surfaces* 59 (2007): 87-99.
- ZUO, R., D. RNEK, B.C. SYRETT, e R. M. GREEN. "Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water." *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (2003): 275-283.
- ZUO, R., e T. K. WOOD. "Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using gramicidin-S-producing biofilms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (2003): 747-753.

ANEXO A – Relatórios analíticos

Durante o desenvolvimento do projeto foram realizadas análises físico-químicas e bacteriológicas das amostras de água coletadas: Reservatório da Usina Hidrelétrica de Balbina (Rio Uatumã – Presidente Figueiredo/AM) e construção do reservatório da Usina Hidrelétrica de Salto Pilão (Rio Itajaí-Açu - Ibirama/SC)

Relatórios Analíticos - Análises Físico-Química e Bacteriológicas (UHE – Balbina)

Para a análise de água, realizada no dia 16/02/07, foram coletadas amostras de água do ponto A e do ponto B (FIGURA 11), e analisadas pelo Laboratório Microlab – Laboratório de análises e pesquisas (Manaus/AM), através da indicação da FUCAPI. A análise microbiológica foi realizada por este laboratório em função da dificuldade de trazer a amostra de água para Curitiba (até 24 horas após a coleta), atendendo a metodologia de análise proposta pelo “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1999”.

Resultado Físico-Químico

TABELA A – Análise Físico-Química das amostras de água coletas nos pontos A e B das estações de corrosão instaladas na UHE-Balbina.

Parâmetros	Unidade	PONTO A <i>Barragem</i>	PONTO B <i>Após Cloração</i>	Resolução CONAMA nº 357 de 17/03/2005 Art.15 – Classe 2 V.M.P.
Alcalinidade Total	<i>Mg CaCO₃/L</i>	11,0	10,0	-----
Condutividade Elétrica	<i>µS/cm</i>	8,04	9,34	-----
Cor	<i>mg Pt/L</i>	44,0	30,0	75,0
DQO	<i>mg O₂/L</i>	6,0	3,0	-----
pH	-----	6,57	6,36	6,0 a 9,0
Sulfeto	<i>mg NH₃/L</i>	0,00	0,00	0,002
Turbidez	<i>NTU</i>	2,3	1,8	100

Fonte: Resultados Físico-Químicos do relatório analítico MCR 139/07 – Microlab Laboratório de análises e pesquisas, amostras da UHE-Balbina, Manaus-AM.

Resultado Bacteriológico

TABELA B – Análise Bacteriológica das amostras de água coletadas nos pontos A e B das estações de corrosão instaladas na UHE-Balbina.

Parâmetros	PONTO A	PONTO B	Resolução CONAMA nº 357 de 17/03/2005 Art.15 – Classe 2 V.M.P.
	Barragem	Após Cloração	
Coliformes Totais (N.M.P./100 mL)	1100	23	-----
Coliformes Fecais (N.M.P./100 mL)	Ausente	Ausente	1000

Fonte: Resultados Físico-Químicos do relatório analítico MCR 139/07 – Microlab Laboratório de análises e pesquisas, amostras da UHE-Balbina, Manaus-AM

Relatório Analítico - Análise Bacteriológica (UHE – Salto-Pilão)

Para a análise de água do Rio Itajaí-Açu, foram coletadas amostras de água de quatro pontos de coleta: Ponto 1, água superficial à montante do rio Itajaí-Açu em relação a UHE-Salto Pilão; Ponto 2, água coletada a uma profundidade de 2m à montante do rio Itajaí- Açu em relação a UHE-Salto Pilão; Ponto 3, água superficial à jusante do rio Itajaí-Açu em relação a UHE-Salto Pilão; Ponto 4, água coletada a uma profundidade de 2m à jusante do rio Itajaí- Açu em relação a UHE-Salto Pilão. As amostras coletadas foram analisadas pelo CEPPA – Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, atendendo a metodologia de análise proposta pelo “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1999”.

TABELA C – Análise Bacteriológica das amostras de água coletas nos pontos 1, 2, 3 e 4 das estações de corrosão instaladas na UHE-Salto Pilão.

Parâmetros	Resultado analítico	Ponto de coleta	Resolução CONAMA nº 357 de 17/03/2005 Art.15 – Classe 2 V.M.P.
Coliformes Totais (N.M.P./100 mL)	550	PONTO 1 Montante	1000
Coliformes Fecais (N.M.P./100 mL)	23	superfície	-----
Coliformes Totais (N.M.P./100 mL)	1000	PONTO 2 Montante	1000
Coliformes Fecais (N.M.P./100 mL)	76	fundo	-----
Coliformes Totais (N.M.P./100 mL)	2400	PONTO 3 Jusante	1000
Coliformes Fecais (N.M.P./100 mL)	200	superfície	-----
Coliformes Totais (N.M.P./100 mL)	4600	PONTO 4 Jusante	1000
Coliformes Fecais (N.M.P./100 mL)	310	fundo	-----

Fonte: Resultados Bacteriológicos do relatório analítico emitido pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, amostras da UHE-Salto Pilão, Ibirama-SC).