



Consórcios Bacterianos e Corrosão Microbiologicamente Influenciada: Estado da Arte

Microbial Consortia and Microbiologically Influenced Corrosion: The State of Art

Mariana Isabeli Valentim*, José Carlos Alves Galvão[†],
Denis Emanuel Garcia de Almeida[‡], Karoline Caetano da Silva[§]

RESUMO

Em detrimento da evidenciação da corrosão microbiologicamente influenciada (CMI), buscam-se formas de combate e prevenção dos microrganismos responsáveis pela biocorrosão, bem como formação de biofilmes prejudiciais aos equipamentos metálicos e poliméricos. Entende-se que essa busca inclui a investigação e identificação, por meio da classificação sistemática e ecológica dos organismos envolvidos. Entretanto, percebe-se uma carência de diretrizes específicas ou uma padronização de protocolos em microbiologia para estudo de CMI; o que apresenta-se como uma problemática a ser perscrutada. O presente estudo objetiva, por meio da abordagem de pesquisa sistemática de literatura e *Methodi Ordinatio*, compilar estudos referência no tema abordado, e contribuir para o aprofundamento das pesquisas de CMI em relação a consórcios microbianos. A busca aponta para uma emergência no interesse de pesquisas sobre biocorrosão nos últimos dez anos, bem como uma tendência à utilização de métodos laboratoriais tradicionais para identificação de microrganismos; ainda que a informática se apresente, cada vez mais, como auxiliar nas investigações fenéticas e tratamento de dados, estatisticamente.

Palavras-chave: Corrosão Biológica, Bactérias – Identificação, Corrosão Metálica, Testes microbiológicos

ABSTRACT

Due to the disclosure of the microbiologically influenced corrosion (MIC), tactics are being sought in order to remediate and prevent the growth of microorganisms responsible for biocorrosion, as well the formation of biofouling on metallic and polymeric equipment. It is accurate to say that this includes the study and identification, by systematic and ecological means, of the organisms involved. However, it is noted that, there is a lack of specific guidelines or formal protocols for the MIC study. This fact portrays a problem that needs to be peered out. By employing the approach of systematic review and the *Methodi Ordinatio*, this paper aims to synthesize relevant studies on the covered topic, contributing to the increase on MIC research. The results indicate a rise of interest on biocorrosion research, in the last ten years. Also, pointed on the application of conventional methods to be a bias for identification of microorganisms. Still, informatics presents itself as adjunct for phenetic investigations and statistical processing of data.

Keywords: Biocorrosion, Bacteria – Identification, Metal Corrosion, Microbiological assay

1 INTRODUÇÃO

* Lic. Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil;
mariana.valen.tim@hotmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa; galvao@utfpr.edu.br

[‡] Eng. Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil;
denisemanuel2011@gmail.com

[§] Eng. Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil;
karoline_kaitano@hotmail.com



Mesmo perante o avanço inegável da ciência, é possível afirmar que pouco sabemos sobre a complexidade microbiana; isto se deve principalmente as dificuldades encontradas no cultivo das diversas linhagens evolutivas, bem como a especificidade e exigências de cada estudo. Um dos fenômenos provenientes do metabolismo microbiano, a CMI, apresenta preocupações emergentes para a indústria e sociedade. Segundo Videla e Herrera (2005), a participação de microrganismos em processos de corrosão induz à várias peculiaridades, com destaque para a modificação das superfícies metálicas e do ambiente ao redor, pela formação de biofilmes.

Precedentes, como Valentim *et al.* (2021), atestam a presença de bactérias causadoras de corrosão em materiais metálicos de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) e induzem a probabilidade da ação em simbiose de espécies diferentes, presentes no meio especificado; configurando o que denomina-se de consórcio microbiano. Embora amplamente estudadas as aplicações dos consórcios microbianos em meios especializados, pouco é explorado deste tópico com relação a CMI; faltam protocolos e métodos especializados para resolução dessa problemática.

Entende-se que, por meio da revisão sistemática de literatura e o levantamento das contribuições relevantes à temática e a análise das abordagens utilizadas em cada caso, obter-se-á um direcionamento da pesquisa para construção de protocolos adequados de de maior efetividade presumível; assim como a verificação da viabilidade de tais procedimentos

2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA

A estratégia escolhida e adaptada à intenção de pesquisa, foi o *Methodi Ordinatio (A.M.O)*, instituída inicialmente por Pagani *et al.* (2015). Por meio desta, é possível evitar a revisão narrativa com viéses e, ainda assim, aproveitar-se das evidências de respaldo técnico, buscando formas de adaptá-las a proposta inicial. A primeira etapa para a revisão é o delineamento da pesquisa; neste foi instituído a seguinte questão focal supracitada.

Para maior abrangência de resultados na pesquisa definitiva, foram utilizadas as três grandes bases de dados: *ScienceDirect*, *ACS Publications* e *BioOne Complete*, para obtenção dos artigos por meio do conjunto de descritores: ("*biocorrosion*" OR "*microbiologically influenced corrosion*" OR "*bacterial corrosion*") AND ("*consortium*" OR "*symbiosis*" OR "*bacterial community*"). O intervalo de tempo estipulado foi de dez anos e obteve-se o fator de impacto de cada *journal* por meio da plataforma *Scimago*.

A primeira triagem se deu pela exclusão das revisões e capítulos de livros; pois entende-se que, para obtenção de protocolos microbiológicos testados, sejam necessários ensaios experimentais que são melhor evidenciados e detalhados em artigos de pesquisa. Seguidamente, opta-se por um refinamento pela leitura dos títulos e resumo; observa-se que, mesmo selecionados os estudos por meio de operadores booleanos e palavras-chave específicas, obteve-se resultados pouco ou não pertinentes ao tema em questão.

O *A.M.O* atribui uma pontuação de relevância por multicritérios, dada pela equação 1. O *score* de fator de impacto (*Fi*) do *journal* onde foi indexada a pesquisa é dividido por mil, sendo o resultado somado ao peso ($1 \leq \alpha \leq 10$); este por sua vez é multiplicado pela diferença entre os anos de pesquisa e publicação e, por fim, somado ao número de citações indexadas ($\sum Ci$).

$$InOrdinatio = \left(\frac{Fi}{1000} \right) + \alpha * [10 - (ResearchYear - PublishYear)] + (\sum Ci) \quad (1)$$



O software *Mendeley* foi utilizado para a checagem de duplicatas e conversão de extensão de arquivos. As mesmas foram então abertas no software *JabRef*, do qual fez-se uso para a organização das listas de referências. Por meio do *website Google Scholar*, obteve-se o número de citações em todas as bases de dados indexadas. O peso para o ano de publicação foi definido como 5, o que significa que a relevância dada para o ano de publicação é média. Em seguida, uma planilha com a lista de referências organizadas é criada, para a incorporação da fórmula do *A.M.O.* e desta obtêm-se a pontuação dos estudos elegíveis, que agora podem ser lidos na íntegra e analisados sistematicamente de acordo com a meta de leitura estipulada.

3 RESULTADOS

Após uma pesquisa preliminar com diversos conjuntos de descritores, definiu-se os fatores definitivos. A busca definitiva nas bases de dados retornou os seguintes resultados: 182 *research articles* da plataforma *ScienceDirect*; 343 na *ACS* e 192 na plataforma *BioOne*. Totalizando 712 artigos após remoção de duplicatas.

Os principais assuntos de interesse, nos trabalhos revisados, são relacionados aos métodos empregados na coleta, isolamento, cultura e identificação de microrganismos relacionados ao CMI; os instrumentos e equipamentos utilizados, bem como as abordagens escolhidas para as análises dos resultados obtidos em cada caso. Após as séries de triagens, restaram 17 artigos da plataforma *ScienceDirect*; 8 da *ACS* e 2 da *BioOne*. Essa redução teve como base os seguintes critérios para exclusão: (I) Não apresentam ao menos um dos descritores como temática principal, destoando da presente proposta; (II) Não possuem contribuição significativa para a pergunta-problema supracitada, por não explicitarem os procedimentos de análise microbiológica utilizados; (II) Não possuem contribuição significativa para a pergunta-problema, porque têm foco no estudo da fauna de um ecossistema pouquíssimo semelhante ao de ETEs;

Dos 27 estudos selecionados, 10 são provenientes de *journals* dos Estados Unidos, 9 do Reino Unido, 6 dos Países Baixos e 2 de *journals* da China. Esses valores se devem, principalmente, as bases de dados escolhidas. Para visualização prática, a Tab. 1 expõe uma relação de frequência (*f*) de artigos que obtiveram pontuação *InOrdinatio* dentro dos intervalos estipulados; a amplitude de intervalo é de 12 pontos.

Tabela 1. Relação de frequência na pontuação A.M.O. dos artigos revisados

<i>f</i>	Intervalo <i>InOrdinatio</i>	Autores
1	341,075 ↔ 353,075	PINTO, A. J. <i>et al.</i> (2012)
1	173,075 ↔ 185,075	LIU, G. <i>et al.</i> (2014b)
1	89,075 ↔ 101,075	GUAN, J <i>et al.</i> (2013)
2	77,075 ↔ 89,075	JIANG, G. <i>et al.</i> (2016); JIN, J. <i>et al.</i> (2015)
3	65,075 ↔ 77,075	LI, X. <i>et al.</i> (2015); WAAK, M. B. <i>et al.</i> (2018); DONG, Y. <i>et al.</i> (2020)
5	53,075 ↔ 65,075	LIU, R. <i>et al.</i> (2014a); MA, X. <i>et al.</i> (2017); ZHONG, C. <i>et al.</i> (2019); ZHANG, G. <i>et al.</i> (2019); LI, X. <i>et al.</i> (2018)

Fonte: Autoria própria (2021)

Coleta e Amostragem

Percebeu-se que os artigos, dos quais a amostragem ocorre em estações de tratamento de água potável ou residual, citam a trajetória dos fluidos em tratamento, considerando os processos físico-químicos habituais,



próprios do local. Essa observação torna-se relevante na medida em que a experimentação *ex situ* deve seguir os mesmo parâmetros do ambiente original, visto que o crescimento de microrganismos depende de suas próprias especificidades. Segundo (WADE, *et al.*, 2017), ainda não há padronização ou diretrizes recomendadas para a realização de testes de CMI em ambiente laboratorial, justificando-se assim a abundância de técnicas de coleta e amostragem para estudos de CMI, vislumbradas na literatura.

Ainda no caso de ETEs e ETAs, é interessante utilizar de uma coleta variada; em exemplo, Ma *et al.* (2017) coletaram amostras de água de quatro locais, ou unidades operacionais, ao longo da estação. Uma constante na maioria dos artigos analisados, é o transporte de amostras líquidas, do local de coleta até o laboratório, que é realizado em gelo ou nitrogênio líquido; são as técnicas de acondicionamento para transporte mais tradicionais e recomendadas para a referida situação.

Tratando-se de ligas metálicas ou outros sólidos, é possível realizar a confecção de cupons para manipulação por tratamentos. Quando confeccionados e, após esterilizados apropriadamente, os cupons podem ser inoculados com amostras de água residual, como experimentado por Ziadi *et al.* (2019) e Wang *et al.* (2015); ou, alternativamente, inoculados em meio de simulação, juntamente com os microrganismos de interesse, tal como realizado por Dong *et al.* (2020). Zhou *et al.* (2020) utiliza outra abordagem, coletando amostras diretamente do local de estudo e submetendo-as as respectivas análises.

Técnicas de cultivo e isolamento de microrganismos

O primeiro procedimento regular para análises microbiológicas, expresso nos artigos consultados, é a utilização de membranas filtrantes de polímeros diversificados, para obtenção da biomassa de um meio aquoso; o tamanho dos poros da membrana e sua composição definem sua aplicabilidade.

Liu *et al.* (2014b), utilizaram o método independente de cultivo, por meio da caracterização molecular para detecção de 7 filos de bactérias dominantes, em água desclorinada e biofilmes de tubulações. Um dos procedimentos conduzidos, foi o teste de ATP; este pode ser realizado por meio de um luminômetro simples. Essa abordagem é amplamente utilizada em estudos de metagenômica, os quais objetivam a compreensão de diversidade microbiana, sem a necessidade de cultivos individuais e especializados.

Dong *et al.* (2020), no intuito de isolar as bacterias marinhas associadas a algas *Arthrospira platensis* G., utilizaram o crescimento em F/2 e o método de cultivo de enriquecimento Luria Bertani (LB); posteriormente purificando os microrganismos de interesse em outra placa LB. A cultura e identificação foi bem sucedida para *Halomonas titanicae* V.; uma proteobacteria, gram-negativa e halotolerante, que apresenta comportamento de CMI.

Em contrapartida, Wood e Liao (2019) fizeram uso das duas abordagens: meios dependentes de cultura TSA e R2A, bem como a amplificação e sequenciamento direto da biomassa, sem realização de cultivo. Os autores concluíram que a diversidade taxonômica do consórcio bacteriano, quando utilizado a abordagem independente de cultura, é maior que quando utilizadas as culturas; implicando que, neste caso específico, a abordagem independente foi mais eficaz.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Todos os estudos analisados relatam a utilização de técnicas tradicionais de extração ou purificação de DNA e/ou RNA, citando a utilização de kits prontos. A amplificação do RNA ribossômico 16S por *PCR* ou *qPCR* é outra constante em todos os estudos; a primeira difere da segunda na medida em que permite a amplificação e detecção simultânea da sequência. A *qPCR* exige insumos especiais e, entretanto, resulta em



dados mais precisos, quantitativamente. Ma *et al.* (2017) realizaram os dois procedimentos, *PCR* e *qPCR* para fungos e bactérias totais.

A análise dos resultados obtidos é habitualmente visualizada por meio da eletroforese em gel, embora os artigos não tenham evidenciado essa etapa. Já para identificação e comparações fenéticas, a bioinformática atua, com o auxílio de *pipelines*, ou seja, de *softwares*, bancos de dados e protocolos operacionais, a fim de se obter informações interpretáveis e comparáveis a partir dos procedimentos laboratoriais realizados. O pipeline mais citado nos estudos selecionados, foi o *QIIME* (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). As abordagens estatísticas *MPN* (*most probable number*) e a variância multivariada permutacional (*PERMANOVA*) se fizeram bem presentes nas leituras.

4 CONCLUSÃO

Através da revisão sistemática de artigos selecionados, provenientes das plataformas citadas, foi possível vislumbrar um panorama geral das técnicas utilizadas nos últimos dez anos, em estudos relevantes. O estado da arte da temática: consórcios microbianos relacionados a CMI, apresenta-se emergente; novos estudos têm contribuído para a taxonomia e sistemática, por testarem alternativas biotecnológicas; bem como para a indústria, por prognosticarem resoluções para problemas vigentes.

É intencionado que esses conhecimentos obtidos protagonizem a etapa experimental que será realizada posteriormente. Serão utilizados, especialmente, os artigos que apresentam os protocolos mais rigorosamente detalhados, tomando como exemplo os próprios da plataforma *ACS*; nestes, são fornecidos ao leitor, anexos e *hyperlinks* com informações de suporte (*supporting information*).

Idealiza-se, ainda, que as metodologias revisadas e dispostas sistematicamente, sejam referência para as próximas investigações de pesquisadores da área; fornecendo assim, suporte para os mesmos, para que estes atinjam seus objetivos específicos.

REFERÊNCIAS

- DONG, Y. *et al.* **Microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel caused by an alga associated bacterium *Halomonas titanicae***. *Journal of Materials Science & Technology*. p. 200–206, vol. 37, 2020. DOI: 10.1016/j.jmst.2019.06.023
- GUAN, J *et al.* **Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA & *dsrAB* genes**. *International Biodeterioration & Biodegradation*. p. 58–66, vol. 76, 2013. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.06.021
- JIANG, G. *et al.* **Wastewater-Enhanced Microbial Corrosion of Concrete Sewers**. *Environmental Science & Technology*. p. 8084–8092, vol. 50, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.6b02093
- JIN, J., WU, G.; GUAN, Y. **Effect of bacterial communities on the formation of cast iron corrosion tubercles in reclaimed water**. *Water Research*. p. 207–218, vol. 71, 2015. DOI: 10.1016/j.watres.2014.12.056
- LI, X. *et al.* (2018) **Characterization of the bacterial communities and iron corrosion scales in drinking groundwater distribution systems with chlorine/chloramine**. *Journal of Environmental Sciences*. p. 192–204, vol. 69, 2018. DOI: 10.1016/j.jes.2017.10.009



- LI, X. *et al.* (2015) **Characteristics of biofilms and iron corrosion scales with ground and surface waters in drinking water distribution systems.** *Corrosion Science*. p. 331–339, vol. 90, 2014. DOI: 10.1016/j.corsci.2015.10.028
- LIU, R. *et al.* (2014a). **Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system.** *Journal of Environmental Sciences*. p. 865–874, vol. 26, 2014. DOI: 10.1016/S1001-0742(13)60481-7
- LIU, G. *et al.* (2014b). **Pyrosequencing Reveals Bacterial Communities in Unchlorinated Drinking Water Distribution System: An Integral Study of Bulk Water, Suspended Solids, Loose Deposits, and Pipe Wall Biofilm.** *Environmental Science & Technology*. p. 5467–5476, vol. 48, 2015. DOI: 10.1021/es5009467
- MA, X. *et al.* **Centralized Drinking Water Treatment Operations Shape Bacterial and Fungal Community Structure.** *Environmental Science & Technology*. p. 7648–7657, vol. 51, 2017. DOI: 10.1021/acs.est.7b00768
- VALENTIM, M. I. *et al.* Avaliação de Processos de Corrosão Influenciada Microbiologicamente em Estações de Tratamento de Esgoto. In: HOLZMANN, H. A.; DALLAMUTA, J. (eds.) **Engenharia de materiais e metalúrgica: tudo à sua volta.** vol. 2. Ponta Grossa (PR): Atena, 2021. p. 100-110. DOI: 10.22533/at.ed.622210504
- VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. **Microbiologically influenced corrosion: looking to the future.** *International Microbiology*. s/p, vol. 8, 2005. ISSN: 1139-6709
- PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L.; RESENDE, L. M. **Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication.** *Scientometrics*. p. 2109–2135, vol. 105, 2015. DOI: 10.1007/s11192-015-1744-x
- PINTO, A. J.; XI, C.; RASKIN, L. **Bacterial Community Structure in the Drinking Water Microbiome Is Governed by Filtration Processes.** *Environmental Science & Technology*. p. 8851–8859, vol. 46, 2012. DOI: 10.1021/es302042t
- WAAK, M. B. *et al.* **Occurrence of Legionella spp. in Water-Main Biofilms from Two Drinking Water Distribution Systems.** *Environmental Science & Technology*. p. 7630–7639, vol. 52, 2018. DOI: 10.1021/acs.est.8b01170
- WADE, S. A. *et al.* **On the need for more realistic experimental conditions in laboratory-based microbiologically influenced corrosion testing.** *International Biodeterioration & Biodegradation*. p. 97–106, vol. 121, 2017. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.03.027
- ZHANG, G. *et al.* **Taxonomic relatedness and environmental pressure synergistically drive the primary succession of biofilm microbial communities in reclaimed wastewater distribution systems.** *Environment International*. p. 25–37, vol. 124, 2019. DOI: 10.1016/j.envint.2018.12.040
- ZHONG, C. *et al.* **Temporal Changes in Microbial Community Composition and Geochemistry in Flowback and Produced Water from the Duvernay Formation.** *ACS Earth Space Chem*. p. 1047–1057, vol. 3, 2019. DOI: 10.1021/acsearthspacechem.9b00037