

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE  
CAMPUS DE SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

**CLEIDE CALDAS COSTA**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM FLUIDO PARA CORTES  
DE METAIS EM INDÚSTRIA METALÚRGICA**

Sorocaba  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE  
CAMPUS DE SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

**CLEIDE CALDAS COSTA**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM FLUIDO PARA CORTES  
DE METAIS EM INDÚSTRIA METALÚRGICA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade do *Campus* de Sorocaba, Universidade Federal de São Carlos, na defesa para obtenção do título de mestre, no Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iolanda Cristina Silveira Duarte

Co-orientação: Prof. Dr. André Cordeiro Alves dos Santos

Sorocaba  
2018

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por tudo. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante a minha vida.

À Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, instituição que viabilizou minha formação neste programa de Pós-Graduação;

Ao professor **Dr. André Cordeiro**, por apresentar-me ao programa e pela co-orientação durante a pesquisa;

À professora **Dra. Iolanda Aguiar**, minha orientadora, pelo apoio, ensinamentos durante todo o programa e por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de São Carlos para os ensaios.

À técnica de laboratório **Mônica Almeida**, por sua amizade e à professora **Dra. Ana Carolina Araújo**, pelo auxílio nos processos microbiológicos.

À Arch Química Brasil Ltda subsidiária da Lonza e a **Fábio Forastieri**, meu muito obrigado pela oportunidade e viabilidade desse projeto.

Ao **Dr. Mário Lúcio Lopes**, pelo apoio e incentivo.

Agradeço especialmente à **Vanessa Costa Diana** e **Milene Bianchini Antonio**, pessoas que sempre me apoiaram incondicionalmente e que, seguramente, são as que mais compartilham da minha alegria: minhas queridas amigas irmãs.

Por fim, meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais **Evandro Costa Conceição e Zuleide Caldas Costa** e aos meus irmãos **Fábio e Evandro Jr.**, minha família, que sempre me incentiva na busca por conhecimentos.

Dedico também a **Mauricio Franzim**, meu gestor, pelo incentivo e por acreditar no meu potencial, sem você não teria sido possível o pleno desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

COSTA, Cleide Caldas. Avaliação da contaminação microbiana em fluido para cortes de metais em indústria metalúrgica. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018

Fluidos para cortes de metais (*Metalworking Fluids* - MWF) é a classe de óleos e líquidos utilizados para lubrificar, reduzir o calor e o atrito entre a ferramenta e a peça, auxiliando a usinagem das peças no momento do corte. A contaminação proveniente da água de diluição e os nutrientes presentes no MWF podem contribuir para o crescimento de micro-organismos no fluido. Estes micro-organismos podem causar doenças em operadores, corrosão de componentes de máquinas, ferramentas, peças e diminuição da vida útil do MWF, devido à perda de suas propriedades físico-químicas. O objetivo deste trabalho, foi monitorar as condições microbiológicas de fluido para cortes de metais em sete centrais de uma metalúrgica. O monitoramento foi realizado semanalmente, durante sete meses. As amostras do MWF foram analisadas quanto às concentrações de ativos biocidas N-butil-1,2-benzisotiazolin-3-ona (NBBIT) e 1,2-benzisotiazolin-3-ona (BIT), por cromatografia líquida e à contagem de micro-organismos por plaqueamento em meios específicos para bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras. A presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS), foi verificada em intervalo de sete semanas. As concentrações de ativos biocidas NBBIT e BIT estiveram abaixo dos mencionados pela literatura como eficientes no controle de contaminação. Todas as centrais de sistema de circulação, apresentaram contaminação por bactérias, leveduras e apenas uma das centrais não apresentou presença de BRS. Os MWF avaliados não apresentaram contaminação por fungos filamentosos. Dessa forma, concluiu-se, que a metalúrgica analisada não está seguindo a dosagem de ativos biocidas estabelecidas de 200 ppm para NBBIT e 2.500 ppm para BIT e isto está acarretando contaminações que podem ser prejudiciais aos operadores. Sugere-se que a empresa tome medidas de ações preventivas, adotando o monitoramento semanal, ações corretivas como auditorias de planta para detectar e controlar a carga microbiológica das centrais.

Palavras-chave: Fluidos para cortes de metais, NBBIT, BIT, bactérias, leveduras, bactérias redutoras de sulfato.

## **ABSTRACT**

COSTA, Cleide Caldas. Evaluation of microbial contamination in fluid for metal cutting in the metallurgical industry. 2018. Dissertation (Master in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2018.

Metalworking Fluids (MWF) is the class of oils and liquids used to lubricate, reduce heat and friction between the tool and parts, helping the parts machining at the time of cutting. Contamination from the dilution water and the nutrients present in the MWF can contribute to the growth of microorganisms in the fluid. These microorganisms can cause diseases in operators and also corrosion of machine components, tools and parts shortening the life of the MWF, due to the loss of its physicochemical properties. The objective of this study was to monitor the microbiological conditions of metal cutting in seven central circulation systems of a metallurgical plant. Monitoring was realized weekly for seven months. The MWF samples were analyzed for concentrations of biocidal actives N-Butyl-1,2-benzisothiazoline-3-one (NBBIT) and 1,2-benzisothiazoline-3-one (BIT) by liquid chromatography and counting of microorganisms by pour plating in specific mediums for total mesophilic aerobic bacteria, yeasts and filamentous fungi. The presence of sulfate reducing bacteria (BRS) was performed at seven weeks intervals. Bacteria and yeasts contaminated all central circulations systems and only one of the central had no BRS presence. The MWF evaluated showed no contamination by filament fungi. The concentrations of biocidal active NBBIT and BIT were below those mentioned in the literature as efficient in the control of contamination. Thus, it was concluded that the analyzed metallurgy is not following the dosage of established biocides active 200 ppm to NBBIT and 2.500 ppm to BIT, this is leading to contaminations that can be harmful to the operators. The suggestion is that the company take preventive action measures, such as weekly monitoring and corrective actions like plant audits to detect and control the microbiological load of the central circulations system.

**Keywords:** Fluids for cutting metals, Bacteria, Yeast, Sulfate Reducing Bacteria, NBBIT, BIT

## **LISTAS DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

**ABNT** – Associação Brasileira de Normas Técnicas

**BRS** - Bactérias Redutoras de Sulfato

**BIT** - 1,2-benzisotiazolin-3-ona

**CDC** - Center for Disease Control and Prevention

**DGGE** - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

**NBBIT** - N-butil-1,2-benzisotiazolin-3-ona

**MWF** - Metalworking Fluids

**NIOSH** - National Institute for Occupational Safety and Health

**OECD** - The Organization for Economic Co-operation and Development

**PCR** - Polymerase Chain Reaction

**SDA** - Saboraud Dextrose Agar

**TSA** – Tryptic Soy Agar

**UFC** - Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
4.1 Coleta de amostras.....	8
4.2 Determinação dos biocidas (NBBIT e BIT).....	9
4.3 Determinação Microbiológica em amostras de MWF.....	9
4.3.1 <i>Contagem de bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras.....</i>	<i>9</i>
4.3.2 <i>Determinação da ocorrência de bactérias redutoras de sulfato (BRS) .....</i>	<i>10</i>
4.4 Diversidade bacteriana em MWF por DGGE .....	11
4.4.1 <i>Análise das comunidades bacterianas por PCR .....</i>	<i>11</i>
4.4.2 <i>DGGE de comunidades bacterianas .....</i>	<i>12</i>
4.4.3 <i>Análises estatísticas dos perfis do DGGE.....</i>	<i>12</i>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>23</b>
<b>7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
<b>APÊNDICE A – Resultados das contagens de micro-organismos aeróbios e ativos NBBIT e BIT no período de 02/02/2016 a 24/05/2016. ....</b>	<b>29</b>
<b>APÊNDICE B – Resultados das contagens de micro-organismos aeróbios e ativos NBBIT e BIT no período de 31/05/2016 a 30/08/2016. ....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Fluidos para corte de metais, (*Metal working fluids* - MWF) é o nome dado a uma gama de óleos e outros líquidos, utilizados para lubrificar peças de metal no momento em que estas estão sendo usinadas (Canadian Center for Occupational Health and Safety, 2014). A indústria adquire o MWF de forma concentrado e o dilui em água em proporção de 3 até 10% no momento e no local onde serão utilizados (BRINKSMEIER et al., 2015).

A contaminação proveniente da água de diluição e os nutrientes presentes no MWF podem contribuir para o crescimento de micro-organismos no fluido. Estes micro-organismos podem causar doenças em operadores, corrosão de componentes de máquinas, ferramentas, peças e diminuição da vida útil do MWF, devido à perda de suas propriedades físico-químicas.

As bactérias e fungos crescem em todas as formulações de fluidos miscíveis em água (SAHA; DONOFRIO, 2012). Os micro-organismos mais frequentemente encontrados em MWF são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella* spp., *Desulfovibrio* spp. e *Flavobacterium* spp. (ROSSMORE, 1994).

Biocidas podem ser adicionados ao MWF com o objetivo de reduzir e ou prevenir a ocorrência de micro-organismos. No entanto, mesmo com a adição de biocidas, é possível observar a ocorrência de micro-organismos (LODDERS; KAMPFER, 2012) em MWF. A adição de biocidas deve ser inferior a 2% (20.000 ppm) e seguir as recomendações do fabricante (SANDIN,1991). A adição de biocidas na formulação de fluidos deve atender às restrições solicitadas por cada empresa do setor, sendo estes limites baseados em normas e regulamentações que definem o limite máximo para cada molécula, considerando a exposição diária dos operados.

Na rotina das empresas, foi possível observar que muitas desconhecem o potencial total de contaminação dos MWF, o que acarreta o não monitoramento microbiológico e, conseqüentemente, a ausência de controles para monitorar a saúde de seus operadores.

Dessa forma, é fundamental que as empresas monitorem a presença de micro-organismos, bem como as concentrações de ativos biocidas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi monitorar uma empresa metalúrgica quanto à contagem de bactérias mesófilas aeróbias, leveduras, fungos filamentosos, presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e concentração de ativos biocidas.

## 2. OBJETIVO

O objeto deste estudo foi avaliar a ocorrência de micro-organismos e concentração de ativos biocidas em amostras de MWF de sete centrais de distribuição de uma metalúrgica de usinagem de peças para motores automotivos, por um período de sete meses.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Fluidos Para Cortes de Metais (MWF)

Fluidos para corte de metais (MWF) usados em processos industriais de usinagem de moagem de peças de metais, podem ser misturados com água ou óleo (KAPPOR et al., 2014). Os MWF misturados com água podem ser divididos em emulsões de água (> 60% de óleo mineral concentrado); fluido semissintético (emulsões com 5 a 60% de óleo mineral) e sintéticos (fluidos verdadeiros ou dispersões com < 5% de óleo concentrado) (Simpson et al., 2003).

As emulsões de MWF são estabilizadas em uma mistura óleo/água, por um sistema emulsionante com agentes tensoativos. A molécula emulsificante apresenta uma parte hidrofílica e uma parte lipofílica. A molécula ambivalente interage com a extremidade hidrófila do agente emulsionante na fase aquosa, conferido a estabilidade da emulsão (BRINKSMEIER et al., 2015). A escolha da formulação de MWF dependerá do tipo de metal a ser usinado e das características necessárias durante a usinagem. Quando é necessário maior poder lubrificante, o MWF a ser utilizado deve ser concentrado devido a maior viscosidade, no entanto, quando se deseja maior refrigeração, MWF base água, deve ser utilizado. Além dos surfactantes os MWF podem conter biocidas, tampões de pH, agentes antiespumantes, inibidores de corrosão (VIRJI et al., 2000).

MWF têm como finalidade, auxiliar o corte das peças na usinagem, moagem, reduzindo o calor e atrito entre a ferramenta e a peça que está sendo produzida; dissipando e conduzindo o calor gerado através das suas propriedades de lubrificação e refrigeração. Esses fluidos são de alta relevância para manter a integridade da superfície no trabalho de metais, protegendo contra a oxidação sendo utilizados no processo onde existem operações em metais como: usinagem, esmerilhamento, impacto de deformação, jateamento abrasivo e polimento (BRINKSMEIER; LUCCA; WALTER, 2004; OECD, 2011). Durante a usinagem o fluido tem como função retirar os cavacos (retalhos da peça recortadas durante a modelagem da peça)

transportando-os para fora da zona de trabalho. Esse conjunto de propriedades oferece ao fluido a função de minimizar o esforço das máquinas e aumentar a produtividade (BRINKSMEIER et al., 2015).

MWF recirculados através de canais por toda a planta industrial, retornando a uma central de distribuição, onde é reutilizado enquanto suas propriedades físico-químicas não tenham sido alteradas. Em geral, os óleos integrais (aqueles que não foram diluídos), são os menos susceptíveis a contaminação e biodegradação (OECD, 2011). Durante a recirculação, podem ser introduzidos no MWF componentes da peça usinada, pontas de cigarro, lixo e produtos intermediários e finais do metabolismo microbiano (VIRJI et al., 2000)

MWF são considerados resíduos perigosos que segundo a resolução nº 313/2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estão incluídos na classe 1 e precisam de tratamentos específicos para serem descartados. Todo óleo lubrificante que apresente contaminação ou não esteja adequado para sua utilização, deve passar por processo de refino.

O refino é capaz de recuperar a porção integral do óleo lubrificante do fluido, com o propósito de minimizar a geração de resíduos e o impacto no ambiente, sendo dessa forma reutilizado (CONAMA, 2005).

No mundo anualmente são usados 2.000.000 m<sup>3</sup> de MWF concentrado e esse volume pode ser muito maior depois de diluído em água. Após perder suas propriedades esse resíduo deve ser disposto de forma adequada e o custo pode variar de U\$ 28,00 a U\$56,00/m<sup>3</sup>. Em empresas de pequeno porte, esse custo é maior (U\$ 56,00 a U\$113,00/m<sup>3</sup>) (McADAM et al., 2012).

O tratamento de MWF é um processo desafiador devido a elevada demanda química de oxigênio (DQO) e toxicidade. Os processos mais comuns são: coagulação, separação por membrana, incineração ou disposição em aterros. O processo biológico é uma opção atrativa economicamente. Eficiências de remoção de DQO de 72% foram obtidas em sistema de tratamento híbrido combinando ozonização com biodegradação aeróbia (JAGADEVAN; GRAHAM; THOMPSON, 2013)

### **3.1.2. ATIVOS BIOCIDAS EM MWF**

A adição de ativos biocidas é a maneira mais comum de evitar a contaminação ou controlar o crescimento microbiano em MWF (SEIDEL et al., 2017). O modo de ação e a efetividade dos agentes biocidas são determinados pela interação da substância e de suas propriedades físicas diretamente com as estruturas moleculares das células microbianas. As propriedades envolvidas são, solubilidade, polaridade, dissociação, reatividade, entre outras.

As diferenças entre o modo de ação devem ser consideradas e podem resultar em consequências na aplicação e efetividade dos biocidas. Biocidas contendo isotiazolinonas, NBBIT e BBIT, contem ligações N-S que podem reagir com a porção nucleofílica das células abrindo os anéis das isotiazolinonas que impedirá as reações bioquímicas do metabolismo (PAULUS, 2004).

O ativo biocida 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT) é utilizado para preservar diversos produtos devido a sua estabilidade ao calor, não volatilidade, compatibilidade com compostos iônicos e não iônicos permanecendo ativo em meios ácidos e alcalinos, podendo ser utilizado em produtos que em alguma parte do processo possam ter contato com calor, sem alterar suas propriedades biocidas. Para alguns gêneros de micro-organismos, como *Pseudomonas* e algumas espécies de fungos como *Alternaria alternata* e *Rhodotorula rubra*, as concentrações do biocida devem ser superiores (até 2.500 ppm) às recomendadas a outras espécies de micro-organismos (PAULUS, 2004).

N-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-ona(NBBIT) é um ativo biocida que apresenta alta estabilidade química e térmica. Emulsões de MWF devem conter de 50 ppm a 200 ppm de NBBIT. Este biocida tem apresentado eficiência frente a fungos, leveduras e bactérias. No entanto para o controle de *Pseudomonas* são recomendadas concentrações maiores que 200 ppm (PAULUS, 2004).

Os micro-organismos podem se desenvolver no MWF ou aderidos em máquinas, tubulações ou em tanques formando biofilmes. Segundo Trafny et al. (2015) os biocidas não são efetivos na remoção do biofilme encontrado em fabricas de usinagem de peças onde há MWF. O uso de biocidas deve respeitar as dosagens recomendadas pelos fabricantes e a orientação técnica, a super dosagem não garante a efetividade e podem ser prejudiciais à saúde dos operadores e máquinas (VIJAY et al., 2007).

A efetividade dos biocidas está aliada as técnicas de boas práticas de fabricação, que incluem auditorias periódicas e sanitizações de plantas que iram garantir a qualidade da centrais.

### **3.1.3. CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO MWF**

Os micro-organismos utilizam os componentes orgânicos e aditivos presentes na formulação dos fluidos como nutriente (OSHA, 2011). Quase todos os componentes do MWF podem ser metabolizados pelos micro-organismos como fonte de carbono e energia (SEIDEL et al., 2017).

A contaminação microbiológica afeta e reduz drasticamente a vida útil do fluido, uma vez que, a degradação causada ocorre de forma acelerada gerando perdas econômicas significativas quando o fluido perde suas características e tem que ser frequentemente substituído

(THEAKER; THOMPSON, 2010). Essa contaminação microbiana pode levar a redução das propriedades lubrificantes e anticorrosivas (TRAFNY et al., 2015).

Além da perda de vida útil do MWF e de, possivelmente, danificar as peças em contato com ele, esses micro-organismos podem estar associados à transmissão de doenças como a pneumonia de hipersensibilidade nos operários expostos ao aerossol de MWF durante o processo de usinagem (SHELTON, 1999; NIOSH, 2015).

A exposição dos operadores ao MWF pode ser por contato com a pele e inalação de aerossóis (SIMPSON et al., 2003). Os aerossóis podem conter todos os contaminantes presentes no fluido e contaminar toda a extensão fabril onde o aerossol pode alcançar. Cerca de 1,2 milhões de trabalhadores da indústria metalúrgica dentro de todas as operações de usinagem estão potencialmente expostos aos fluidos por meio de aerossóis gerados no processo de usinagem ao respirar, ou por meio de contato com a pele ao manusear peças, ferramentas e equipamentos tratados com os fluidos (CDC, 2002). Virji et al. (2000) analisaram amostras de aerossóis de MWF e observaram contagem de bactérias entre  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

Em 2002 foram descritos casos de doenças respiratórias em operadores expostos aos MWF contaminados por *Mycobacterium*. A asma também está relacionada ao trabalho e é uma das doenças ocupacionais mais prevalentes, que impõe custos significativos na área da saúde e de acidentes de trabalho (CDC, 2002). A pneumonia por hipersensibilidade diagnosticada em operadores expostos aos fluidos contaminados é causada por *Mycobacterium immunogenum* (GILBERT; VEILLETTE; DUCHAINE, 2010). *M. immunogenum* e *Pseudomonas fluorescens* são frequentemente isolados de MWF (KHAN; YADAV, 2004). National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH - Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional) recomenda que a exposição aos aerossóis de MWF deve ser limitada entre 0,4 a 0,5 mg/m<sup>3</sup> de ar, com uma concentração média ponderada de tempo de até 8 horas/dia durante uma semana de trabalho de 40 horas. Esse limite de exposição recomendado destina-se a prevenir ou reduzir significativamente doenças respiratórias associadas com a exposição ao MWF.

Van Der Gast et al. (2001) descreveram que dentre os micro-organismos gram-negativos mais isolados de amostras de fluidos, foram: *Pantoea agglomerans* com 23%, *Citrobacter freundii* com 19%, *Pseudomonas aeruginosa* com 15%, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas mendocina* somaram juntas 22%, *Alcalinobacillus lignieresii* com 9%, *Acinetobacter genospecies* e *Acinetobacter jonsonii* com 4%, seguindo por *Salmonella enterica* sorovar Typhi e *Bordetella bronchiseptica* cada uma com 3%.

Bactérias gram negativas da espécie *Ralstonia picketti* e gram positivas da espécie *Clavubacter michiganensis* também foram encontradas em MWF (VAN DER GAST et al., 2002).

A literatura apresenta uma diversidade bacteriana baixa, entre elas já foram descritos a presença de *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Algaligenes*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Mycobacterium* (VAN DER GAST et al., 2003). No entanto, apesar dos problemas econômicos, ambientais, operacionais e de saúde dos operadores, o monitoramento microbiano em fábricas que utilizam MWF não são rotineiramente realizadas (TRAFNY et al., 2015).

O crescimento de bactérias e leveduras em MWF a base de água é inevitável. Assim biocidas devem ser usados com a finalidade de diminuir os efeitos causados pelos microorganismos (MEYER et al., 2017).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os fluidos de emulsão semissintético avaliados foram diluídos a concentração mínima recomendada de 8%, indicado para sistemas centralizados e distribuídos em máquinas individuais para usinagem geral de ferro fundido, aços carbono, aços liga e inoxidáveis, alumínio e suas ligas, e metais amarelos. Não foi possível determinar a composição completa do fluido.

Os biocidas utilizados para controlar a contaminação microbiológica foram adicionados ao óleo ainda concentrado e este foi posteriormente diluído para preparar a emulsão que foram completar os níveis da central de usinagem. Durante todo o monitoramento foram avaliados a concentração dos ativos biocidas BIT e NBBIT para a preservação da emulsão do fluido semissintético.

##### 4.1. COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de emulsões de MWF semissintéticos (Figura 1) foram coletadas semanalmente (02 de fevereiro a 30 de agosto de 2016), período amostrado de sete meses, em tanques de sete centrais de distribuição contendo, aproximadamente 150 m<sup>3</sup> em metalúrgica de peças para motores de veículos no interior do estado de São Paulo. As amostragens foram antes da saída para as máquinas de usinagem. O MWF amostrado foi armazenado em frascos de 50 mL a 20-25°C até o momento da análise.

As análises realizadas nas amostras foram: pH, concentração de ativos biocidas, contagem de bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos, leveduras e presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Figura 1 - Exemplos de amostras de fluido para cortes de metais



## **4.2 DETERMINAÇÃO DOS BIOCIDAS (NBBIT E BIT)**

Todas as amostras coletadas foram avaliadas quanto à concentração de ativos biocidas presentes. A determinação de ativos foi realizada através cromatografia líquida de alta performance (HPLC), pesando 0,5 g da amostra do fluido coletado em duplicata. Para o preparo da solução, foram adicionados 10 mL de acetonitrila grau HPLC, e 0,25 mL de ácido acético, agitou-se e recolheu-se o líquido sobrenadante filtrando com auxílio de membrana de 0,22 µm. Foram preparadas soluções estoque de ativo biocida para construção da curva padrão utilizando o ativo biocida 1,2-benzisotiazolin-3-ona (BIT) (LONZA a, 2013) diluídos com acetonitrila grau HPLC e ácido acético, até total dissolução. Para o preparo do padrão N-butyl-1,2-benzisotiazolin-3-ona (NBBIT), 500 ppm do ativo biocida foram diluídos em metanol (LONZA b, 2013).

Calibrou-se o cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) (Waters 2695 Modelo Alliance, EUA) com detector de UV 2489 operando em 318 nm e coluna Symmetry C18 (5µm 4,6x250 mm), para BIT fase móvel água:acetonitrila:metanol:ácido acético (68:17:12:3) a 30°C e para NBBIT fase móvel água:acetonitrila:metanol:ácido acético (65:25:20:2,5) a 40°C ambos por cerca de 30 minutos e injetou-se os padrões e as amostras.

Para os cálculos, foram comparados os cromatogramas obtidos com os padrões e com as amostras. Os picos que apresentaram resoluções satisfatória quanto à altura, forma e tempo de retenção, foram integrados ao cromatograma e avaliados através do Software instalado em computador.

## **4.3. DETERMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM AMOSTRAS DE MWF**

### **4.3.1. CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS, FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS.**

O método de contagem em placa é o mais usado para monitorar MWF. Para a contagem microbiana, as amostras de MWF foram diluídas em solução salina 0,85% e plaqueadas em profundidade utilizando-se o meio de cultura TSA (ágar triptona de soja - Difco™ EUA) para bactérias mesófilas aeróbias totais e meio de cultura SDA (ágar saboraud dextrose - Difco™ EUA) para fungos e leveduras.

As placas para determinação de bactérias foram incubadas a 35±2°C por um período de 48 horas e as placas para contagem de fungos e leveduras foram incubadas a 25±2°C por um período de 7 dias, sendo analisadas após 3-5 dias para o crescimento de leveduras.

#### 4.3.2 DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

Devido a possibilidade de corrosão no sistema de MFW, a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) foi determinada durante o período de 02 de março a 19 de abril de 2016, nas setes centrais. BRS podem liberar sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e ocasionar biocorrosão de tubulações e tanques (VIDELA et al, 1992).

Em frascos de antibióticos de 10 mL, foram adicionados 9 mL de meio Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Mobilidade (SIM) e 1 mL de amostra de MFW. Os frascos foram fechados com tampa de butila e lacrados com tampa de alumínio (Figura 3). Neste meio, o citrato ferroso e o tiosulfato de sódio são usados para detectar a produção de  $H_2S$ , sendo a presença de BRS verificada pelo enegrecimento do meio (Figura 4 e 5).

O controle positivo foi feito com a inoculação de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757, conhecido como redutor de sulfato.

Os frascos foram incubados por um período de 21 dias em estufa a  $35^\circ C (\pm 2^\circ C)$ .

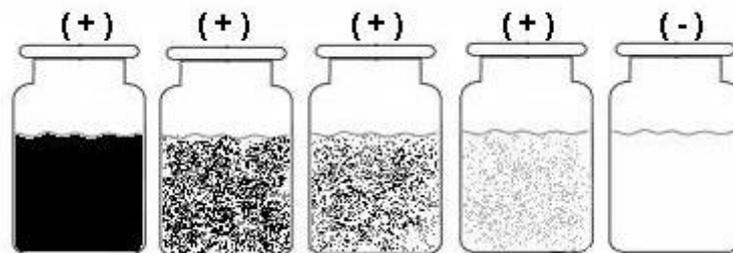
Figura 3- - Amostras de fluido para corte de metais inoculadas em meio SIM



Figura 5 - Enegrecimento do meio de cultura SIM como indicador de presença de BRS



Figura 3 - Escala de presença de H<sub>2</sub>S nos meios inoculados com fluido. (+) presença e (-) ausência



Fonte: ABNT ( NBR 16445, 2016)

#### 4.4 DIVERSIDADE BACTERIANA EM MWF POR DGGE

##### 4.4.1. ANÁLISE DAS COMUNIDADES BACTERIANAS POR PCR

Amostras dos fluidos no período de 02 de março a 19 de abril de 2016 foram submetidas a extração de DNA. O DNA genômico total foi extraído com o kit PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit de acordo com o protocolo do fabricante (MOBIO Laboratories, Inc., EUA). Fragmentos do gene RNAr 16S foram amplificados pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando os oligonucleotídeos sintéticos 954f (5'- GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G- 3') e 1369r (5'-GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG- 3') para bactérias (YU; MORRISON, 2004).

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 5 min; seguida por desnaturação 1,30 min a 94°C, anelamento por 45 s a 38°C, extensão 1 minuto a 72°C e extensão final por 5 min a 72°C. O

controle negativo da PCR foi realizado com todos os componentes da reação de PCR exceto o DNA.

#### **4.4.2 DGGE DE COMUNIDADES BACTERIANAS**

Ao final da PCR, as amostras foram aplicadas em eletroforese de gel de agarose, (80 V por 60 minutos com o marcador 1 kb). As bandas de DNA foram visualizadas em transluminador com luz UV e, em seguida, foi desenvolvida a visualização da diversidade bacteriana da amostra pelo gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE).

O DDGE foi feito no equipamento DCode system (BIO-Rad, EUA). O gel foi feito de poliacrilamida com gradiente desnaturante de 45% a 65%, preparado a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%), uma com 0% e outra contendo 100% dos agentes desnaturantes (7M de ureia 100% e de formamida deionizada 40%). Aguardou-se 3 horas para a polimerização. A eletroforese foi desenvolvida a 60°C, 60 V, por 18 horas. Terminada a corrida, o gel foi corado em nitrato de prata. Para coloração, o gel foi agitado por 30 min em solução fixadora (50 mL de etanol, 2,5 mL ácido acético glacial e completado para 500 mL água destilada), lavado com água destilada, agitado 30 min em solução de nitrato de prata (0,48 g de AgNO<sub>3</sub> e completado para 300 mL de água destilada). Seguidamente foi colocada solução reveladora (NaOH 7,5 M 30mL, formaldeído 2,25 mL, completado para 300 mL) após alcançar a coração desejada foi colocada solução de parada (ácido acético glacial 15 mL e completado para 50 mL). O gel foi lavado em água destilada e fotografado.

#### **4.3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS PERFIS DO DGGE**

Os perfis de bandas do DGGE foram analisados utilizando software Bionumerics versão 3,4 (Applied Maths, Bélgica). Os cálculos de similaridades foram baseados no coeficiente de correlação de Pearson. Por meio desses cálculos foram desenvolvidas análises de agrupamento para formar os dendogramas (RECHE et al., 2005).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH das centrais foi monitorado durante todo experimento, mantendo-se na faixa de 8,1 a 9,0.

Os resultados da contagem de fungos filamentosos não foram incluídos nos gráficos, pois nenhuma das amostras apresentou contagem acima do índice de detecção (<10).

Os ativos biocidas, BIT e NBBIT, utilizados na preservação das emulsões durante esse monitoramento, foram indicados pelo fabricante por serem compatíveis com as características do MWF e das peças usinadas.

As concentrações de BIT estiveram abaixo da recomendada pelo fabricante, no entanto, na quarta semana de amostragem da central 4, a concentração desse ativo estava em 80 ppm, sendo a única amostra dentro das recomendações de 50 a 200 ppm.

As concentrações de NBBIT das centrais analisadas também, estiveram abaixo da recomendada pelo do fabricante, foram observadas diferentes concentrações durante as semanas e centrais avaliadas sendo as menores concentrações observadas na central 7 (<2 a 5 ppm). Nesta central foi observada presença de BRS em todas as semanas amostradas.

Paulus (2004) descreveu que concentrações NBBIT necessários para controlar os principais micro-organismos encontrados em MWF deve estar na concentração até 2.500 ppm e para BIT entre 50 a 200 ppm.

Não foram encontradas legislações brasileiras que descrevam limites para o uso de biocidas nos fluidos para metalurgia. Cada montadora delimita o uso e concentrações de químicos, de acordo com suas regulamentações internas.

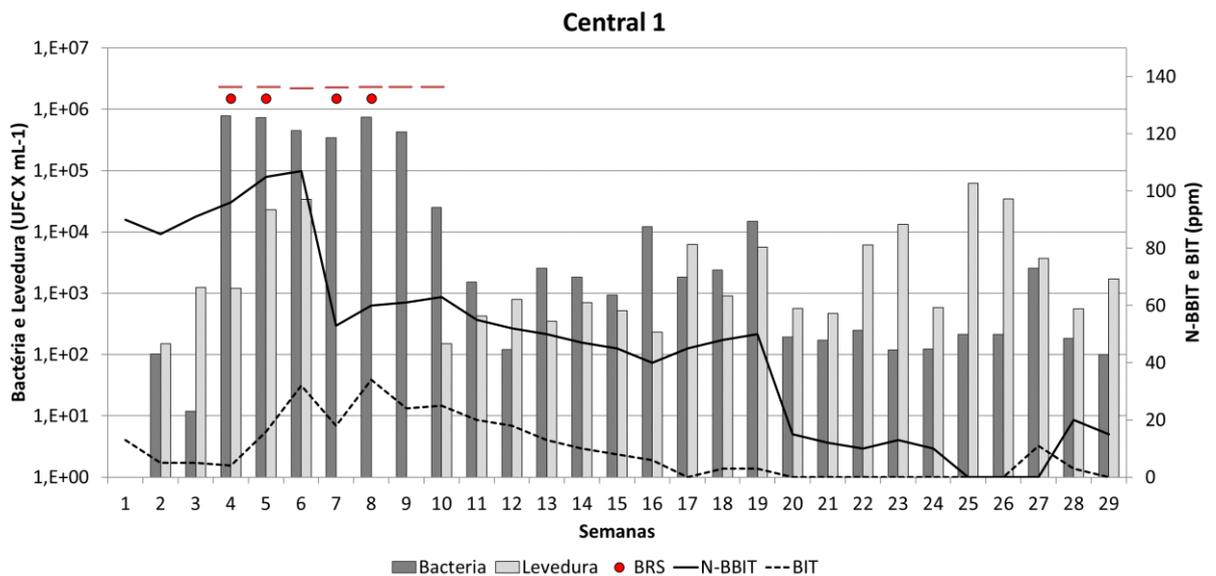
Segundo Trafny et al. (2015) a presença de biocidas não reduziu a contagem de bactérias nas fabricas analisadas devido provavelmente à resistência dos biofilmes. Esses autores constataram formação de biofilmes em várias máquinas de usinagem e apontaram que a presença de biocida pode causar maior estresse ambiental para a comunidade bacteriana.

As Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 apresentam os resultados de contagem de bactérias mesófilas aeróbias totais (UFC/mL), leveduras (UFC/mL) e as concentrações dos ativos em ppm, no período de 29 semanas para cada central avaliada. Os dados de fungos filamentosos não foram incluídos pois não houve crescimento em nenhuma amostra analisada. Os fungos tais como *Fusarium* spp., *Exophiala* spp., *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. já foram encontrados em MWF (TRAFNY et al., 2015; KAPOOR et al., 2014)

Durante o período monitorado as emulsões de MWF demonstraram grande variação na contagem de micro-organismos, com máximo de 10<sup>6</sup> UFC/mL de micro-organismos.

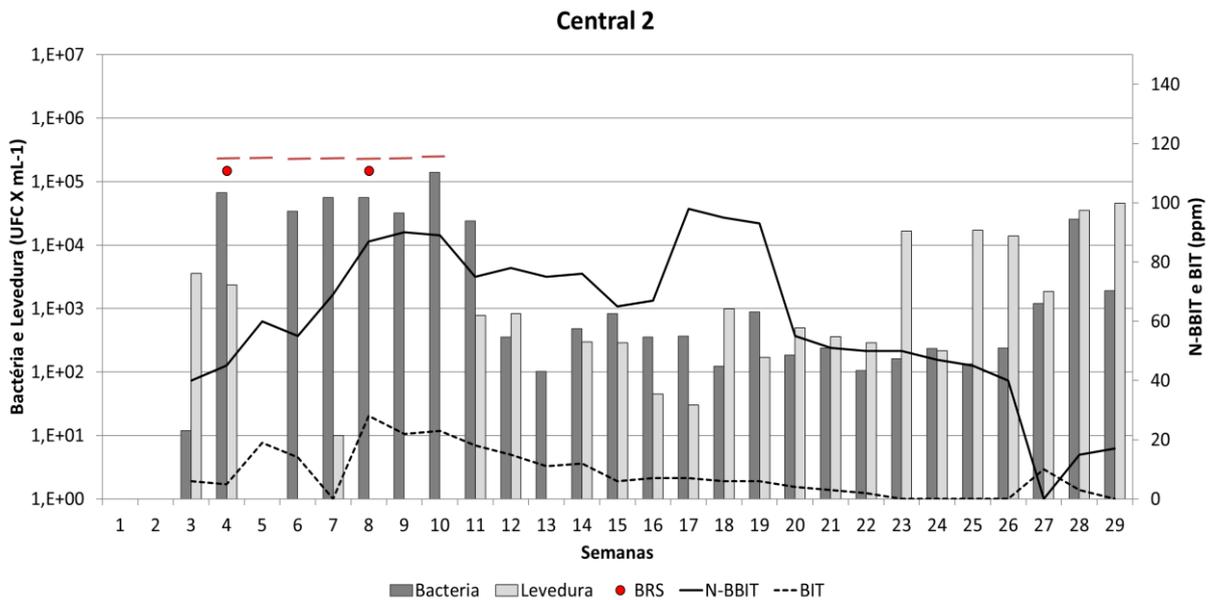
Para a central de usinagem 1, a contagem de micro-organismos após a 3ª semana de monitoramento foi maior que  $10^5$  UFC/mL. A frequência das contagens para bactérias e leveduras entre  $10^2$  UFC/mL foi de 41 e 44%, respectivamente. Para BRS, foi observada a presença em 57% das semanas monitoradas. As concentrações dos ativos BIT foi de  $< 2$  a 34 ppm e NBBIT variaram de  $< 2$  a 107 ppm (Figura 6).

Figura 6 – Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 1. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem ( $< 10$  UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



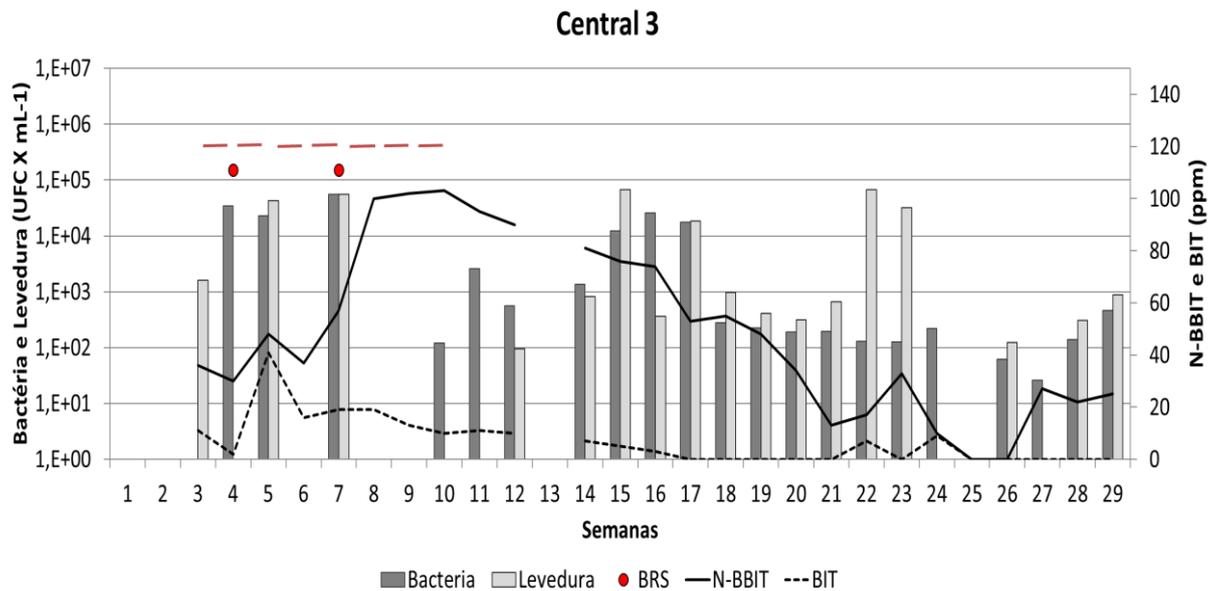
A central de usinagem 2, foi monitorada por 27 semanas, apresentou contagens  $< 10$  UFC/mL na quinta semana de monitoramento e em 55% das amostras contagens entre  $10^2$  a  $10^3$ , mas a contaminação atingiu contagens até  $10^5$  UFC/mL. Para leveduras, a contagem máxima foi de  $10^4$  UFC/mL em 18% das amostras. Para BRS, esta central apresentou menor contaminação, sendo 28% das amostras com resultados positivos. Quanto aos ativos biocidas estes variaram de  $< 2$  a 98 ppm para NBBIT e de  $< 2$  a 10 ppm para BIT (Figura 7).

Figura 7- Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 2. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem (< 10 UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



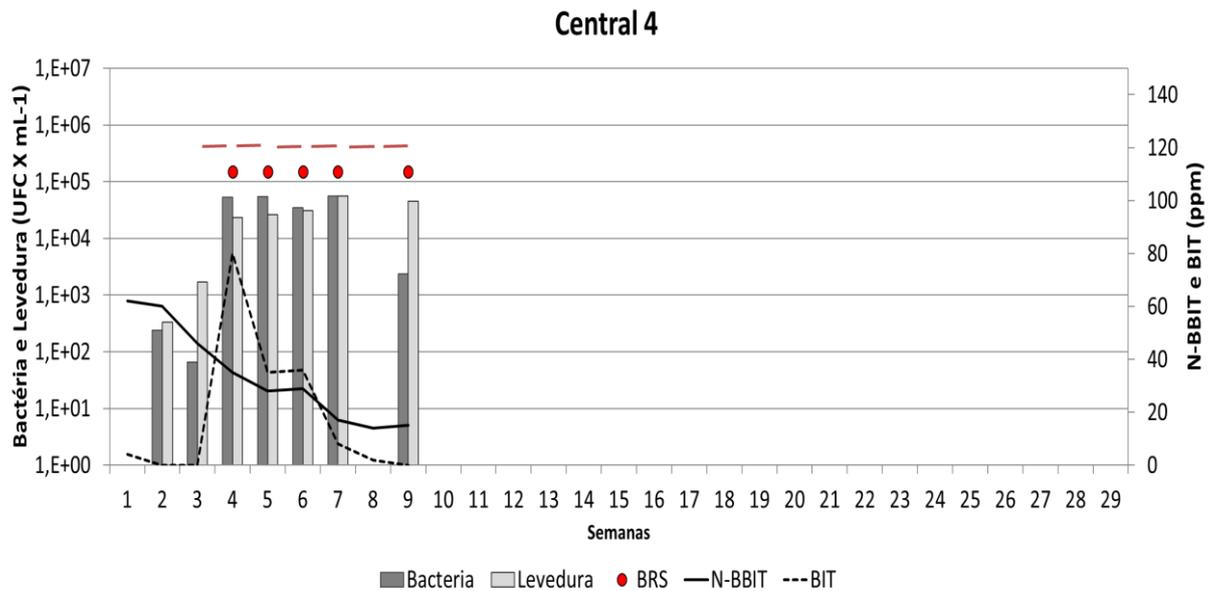
Durante as 26 semanas de monitoramento da central de usinagem 3 foi possível verificar que a contaminação esteve abaixo de  $10^5$  UFC/mL. Em 42% das amostras coletadas as contagens estiveram entre  $10^2$  UFC/mL para bactérias enquanto que para leveduras, apenas 34% das amostras. Esta central apresentou a mesma porcentagem de presença de BRS que a central 2. A variação do ativo NBBIT foi de < 2 a 103 ppm e de BIT de < 2 a 41 ppm (Figura 8)

Figura 8 - Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 3. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem (< 10 UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



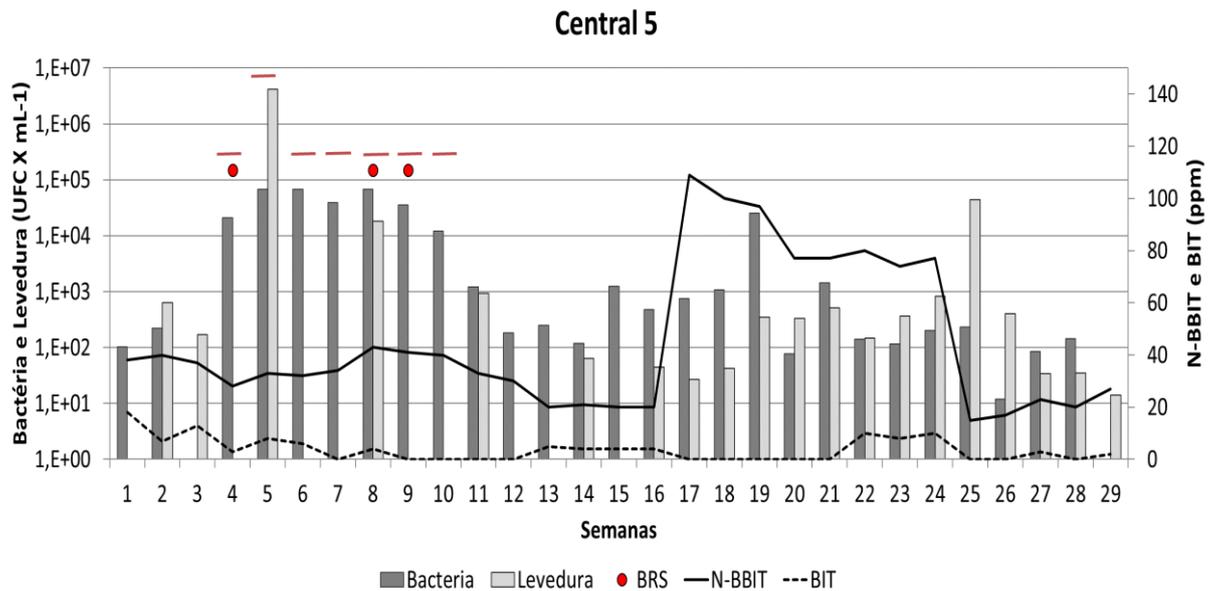
A central de usinagem 4 foi monitorada somente por nove semanas devido a paralisação da usinagem. Não foi constatado contagens acima de  $10^5$  UFC/mL para bactérias. Para leveduras esse valor foi observado em 55% das amostras e 44% para bactérias, BRS estiveram presentes em 71% das amostras. As concentrações de NBBIT variaram de 14 a 62 ppm e de BIT esta variação foi de  $< 2$  a 80 ppm (Figura 9).

Figura 9 - Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 4. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem ( $< 10$  UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



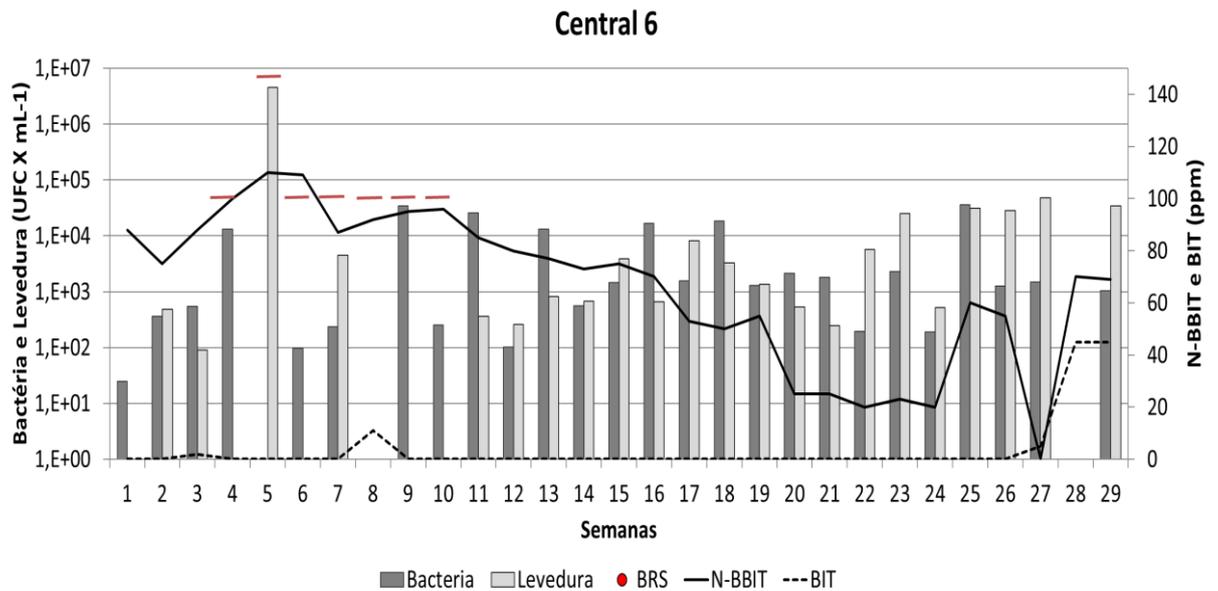
A Central de usinagem 5 foi monitorada por 29 semanas e apresentou contagens de até  $10^4$  UFC/mL em 27% das amostras de bactérias, tendo maiores contagens em  $10^2$  UFC/mL (37%). As BRS tiveram presentes em 42% das amostras. Para leveduras foi observado em apenas uma amostra contagem de  $10^6$  UFC/mL. Para as demais semanas as contagens estiveram em  $10^2$  UFC/mL (34%). Esta central foi a que apresentou concentração mínima de NBBIT de 15 ppm (a mais elevada para todas as centrais) e máxima de 109 ppm, porém para o ativo BIT foi observado concentrações de < 2 a 10 ppm (Figura 10).

Figura 10 - Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 5. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem (< 10 UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



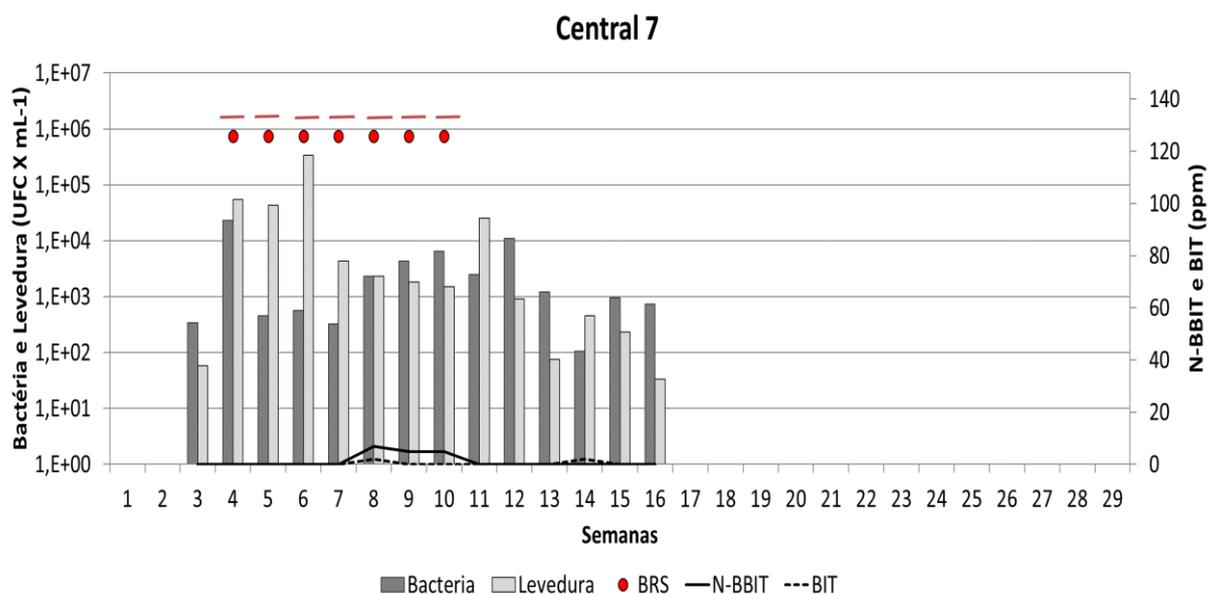
A central de usinagem 6 foi monitorada por 29 semanas, apresentando contagens abaixo de  $10^5$  UFC/mL, para bactérias e apresentou maior semelhanças entre as contagens no período, com 31% das amostras com  $10^3$  UFC/mL. Contagem de levedura de  $10^6$  UFC/mL foi observada em uma amostra dessa central, nas demais semanas foi observada 31% de contagens com  $10^2$  UFC/mL. Não foram encontradas BRS em nenhuma amostra dessa central. A concentração máxima de NBBIT encontrada em todas as análises de monitoramento foi observada nesta central com 110 ppm e o ativo BIT a variação foi de < 2 a 11 ppm (Figura 11).

Figura 11 - Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 6. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem (< 10 UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



Na central de usinagem 7 foi monitorada durante 14 semanas, devido a paralisação da central. As contagens de bactérias mesófilas aeróbias estiveram abaixo de  $10^5$  UFC/mL, e contaminação de 50% das amostras em  $10^2$  UFC/ mL. Apesar das contagens estarem menores que nas demais centrais, a presença de BRS foi em 100% das amostras. As contagens de leveduras foram até  $10^5$  UFC/ mL em apenas uma amostra, nas demais as contagens estiveram próximas  $10^2$  a  $10^4$  UFC/mL. Nesta central foi observada as menores concentrações dos ativos biocidas NBBIT (< 2 a 5 ppm) e BIT (< 2 a 2 ppm) (figura 12).

Figura 12 - Concentração de ativos biocidas (ppm), contagem de bactérias mesófilas aeróbias leveduras e presença de BRS em fluido de corte para metais - central de usinagem 7. A ausência de barras no gráfico indica valores inferiores ao limite de detecção da técnica de contagem (< 10 UFC/mL). A descontinuidade dos traços indica as semanas onde não houve coleta de amostras por inatividade da central monitorada. Traços vermelhos acima das barras das contagens indica as semanas onde foi monitorado BRS.



A central 6 foi a que apresentou maiores concentrações de NBBIT com máximo de 110 ppm. Nesta central não foi detectada a presença de BRS, no período de monitoramento e as concentrações de NBBIT estiveram entre 87 – 110 ppm, sendo as mais elevadas no período. Apesar desta constatação não foi possível encontrar uma relação direta das concentrações dos ativos e a presença de BRS na central. As BRS são representadas por diversas espécies sendo a maioria anaeróbia. A presença de BRS pode estar associada a corrosão e formação de biofilmes. Estudos isolaram BRS do gênero *Citrobacter* em emulsões de MWF (Zhang et al., 2015).

Durante o levantamento bibliográfico foram reportadas por Khan; Yadav (2004) em 20 amostras de MWF contagens de bactérias próximas as obtidas no presente trabalho ( $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL). Di Mairuta; Rüfenacht; Küenzi (2017) afirmaram que apesar da contagem de micro-organismos em placa ser o método mais usado, os resultados obtidos podem estar subestimados tanto quanto a densidade quanto em diversidade.

Alguns micro-organismos podem não crescer nas condições impostas. Os autores utilizam sequenciamento massivo de DNA e observaram a predominância de *Pseudomonas* em todas as amostras. Lidders e Kampfer (2012) demonstraram em seu estudo que o potencial da contaminação de uma emulsão pode chegar a  $10^8$  UFC/mL para bactérias. Salmeen et al. (1987) descreveu contagens maiores atingindo até  $10^9$  UFC/mL. Kapoor et al. (2014) obtiveram contagens bacterianas de  $10^7$  a  $10^{10}$  UFC/mL e observaram que a limpeza não foi capaz de eliminar a contaminação, provavelmente há formação de biofilmes no sistema e estes não foram removidos durante a procedimento de limpeza. A adição de biocida não afetou imediatamente na redução de contagens bacterianas, indicando dessa forma que este apresentava efeito bacteriostático e não bactericida como esperado. Trafny et al. (2015) avaliaram a contagem de

bactérias em 10 plantas industriais da Polônia e observaram que 30% dessas excederam a contagem de  $10^6$  UFC/mL e que em algumas máquinas de usinagem chegou a  $10^8$  UFC/mL.

Foram selecionadas três centrais para análise de PCR / DGGE, de acordo com a concentração de ativos, onde foram escolhidas centrais com maiores concentrações (central 1), concentrações medianas (central 3) e baixas (central 7). Também fez parte da escolha, centrais com contaminações acima de  $10^4$  (Centrais 1 e 7), entre  $10^2$  a  $10^3$  (Central 7) e centrais com contagens  $<10$  (Central 3), como quanto a presença e ausência de BRS (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras selecionadas para extração de DNA, PCR/DGGE

Central / Data da coleta	Contagem de micro- organismos viáveis		Presença/ Ausência de BRS	Biocidas ppm		
	Bactéria	Levedura		N-BBIT	BIT	
C.1	02.03	$7,8 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	+	96	4
	22.03	$4,5 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^4$	-	107	32
	12.04	$4,3 \cdot 10^5$	$<10$	-	61	24
C.3	02.03	$3,4 \cdot 10^4$	$<10$	+	30	5
	22.03	$<10$	$<10$	-	37	14
	12.04	$<10$	$<10$	-	102	13
C.7	02.03	$2,3 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^4$	+	$<2$	$<2$
	22.03	$5,6 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^5$	+	$<2$	$<2$
	30.03	$2,3 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^3$	+	$<2$	$<2$
	05.04	$4,3 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$	+	7	2
	12.04	$2,3 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$	+	5	$<2$

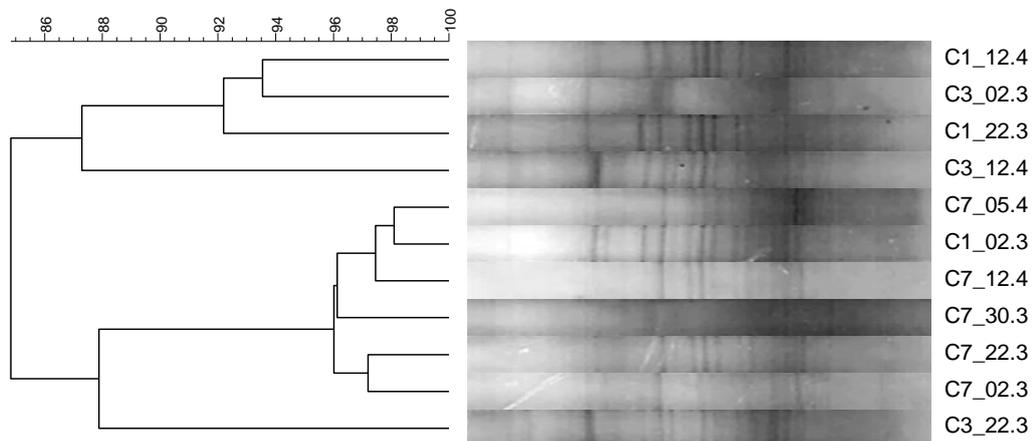
(+): Presença de bactérias redutoras de sulfato

(-): Ausência de bactérias redutoras de sulfato

Fonte: elaborado pela autora

As bandas de DGGE estão apresentadas em um dendograma usando a correlação de Pearson (Figura 13), o agrupamento utilizado para essa análise de diversidade genética entre os perfis foi o método da ligação média entre grupos ou UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Não foi possível equiparar a presença de bandas específicas para gêneros ou espécie, no entanto, notou-se baixo número de bandas (menor que 20) quando comparada a amostras de solo ou lodos biológicos. Essa baixa diversidade pode ser reflexo da natureza seletiva do MWF (VAN DER GAST et al., 2003) e a presença de ativos biocidas. Observou-se elevada similaridade (maior que 86%) entre todas as amostras analisadas. Maiores similaridades foram observadas entre as centrais C1-02.03 e C7 05.04 (98%) e C7- 22.03 e C7-02.03 (97%). Essa elevada similaridade encontrada em todas as amostras analisadas indica que a comunidade bacteriana é muito similar devido as condições de operação como pH, temperatura, MWF e biocidas utilizados. Não foi possível estabelecer uma correlação entre os perfis de bandas e as contagens microbianas e concentração de biocidas.

Figura 13 – Agrupamento (UPGMA) dos perfis de bandas de DGGE usando correlação de Pearson para comunidades bacterianas de MWF das centrais 1, 3 e 7 em diferentes datas de coleta.



Van der Gast et al. (2003) analisaram as amostras de MWF por meio de DGGE e observaram baixa diversidade de bactérias (número de bandas menor que 10).

Trafny et al. (2015) atribuem que algumas bactérias presentes no MWF possam não crescer em meio sólido usado e dessa forma não serem detectadas na contagem. Observaram ainda que houve maior diversidade de bactérias em MWF com biocidas, e que isso pode ser um fator importante na preservação funcional da comunidade bacteriana em condições ambientais hostis.

Segundo Kapoor et al. (2014) métodos moleculares independentes do cultivo tais como DGGE combinados com outros métodos de identificação, podem ser usados em MWF pois é necessário compreender tanto as frações cultiváveis, quanto não cultiváveis; bem como a estrutura da comunidade microbiana total. Os autores avaliaram MWF sintético após recarga e limpeza por 65 semanas. As contagens bacterianas foram bastante elevadas e observadas mesmo após a limpeza. O qPCR confirmou a prevalência de 6 grupos potencialmente patogênicos: pseudomonas, bactérias entéricas, micobacteria, legionella, actinomicetes e fungos. O DGGE revelou uma riqueza bacteriana de 23 bandas por amostra. Segundo Van der Gast et al (2002) o MWF exerce uma pressão seletiva, que favorece distintas populações de bactérias e dessa forma baixa diversidade.

No trabalho de Di Mairuta, Rüfenacht; Küenzi (2017) foi comparada a diversidade microbiana de MWF com e sem biocidas. A diversidade microbiana foi muito semelhante, porém não idêntica.

## **6. CONCLUSÕES**

O monitoramento realizado pode demonstrar a susceptibilidade dos fluidos de corte e seu grande potencial de proliferação dos micro-organismos.

Constatou-se que as concentrações de biocidas presentes no MWF estavam abaixo do indicado pela literatura e isso pode ter contribuído para o crescimento tanto de bactérias mesófilas aeróbias e redutoras de sulfato quanto leveduras. O presente estudo não deprecia a qualidade dos biocidas usados na empresa, ao contrário recomenda-se maior atenção nas dosagens dos aditivos biocidas, para que estes possam controlar os micro-organismos. Considera-se prematuro afirmar que, o uso de biocidas abaixo da recomendação possa

contribuir para resistência dos micro-organismos, uma vez que outros estudos precisam ser realizados.

A presença de BRS na maioria das centrais indica potencial de biocorrosão.

A diversidade bacteriana parece ser muito similar entre as centrais.

Recomenda-se também a verificação de formação de biofilmes em máquinas e tubulações e que limpezas periódicas seja feita nas máquinas e também próximo ao local de usinagem para reduzir a contaminação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR16445 Tintas para construção civil - Método para avaliação de desempenho de tintas para edificações não industriais - Detecção de bactérias redutoras de sulfato em tintas, vernizes e complementos. 2016

BRINKSMEIER E, LUCCA D.A, WALTER A; Chemical Aspects of Machining Processes. *Annals of the CIRP - Manufacturing Technologies*, v. 53, p. 685–699, 2004.

BRINKSMEIER, E. et al. Metalworking fluids - Mechanisms and performance. *CIRP Annals - Manufacturing Technology*, v. 64, p. 605- 625, 2015

Canadian Center for Occupational Health and Safety CCOHS; Easy-to-read, question-and-answer fact sheets covering a wide range of workplace health and safety topics, from hazards to diseases to ergonomics to workplace promotion, [http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/metalworking\\_fluids.html](http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/metalworking_fluids.html), Document last updated on April 3, 2014, acesso 02/02/2015.

Center for Disease Control and Prevention CDC; Respiratory illness in works exposed to metalworking fluid contaminated with nontuberculous mycobacteria, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5116a4.htm> 2002, Acesso em 10/04/2015.

CONAMA Resolução N° 313/2002 - Dispõe sobre o Inventário Nacional de Resíduos Sólidos Industriais - Data da legislação: 29/10/2002 - Publicação DOU n° 226, de 22/11/2002, págs. 85-91.

CONAMA, Resolução n°362. Dispõe sobre o recolhimento, coleta e destinação final de óleo lubrificante usado ou contaminado. - Data da legislação: 23/06/2005 - Publicação DOU n° 121, de 27/06/2005, págs. 128-130.

DI MAIRUTA, N.; RÜFENACHT, A.; KÜENZI, P. Assessment of bacteria and archaea in metalworking fluids using massive parallel 16S r RNA gene tag sequencing. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 65, p. 266-273, 2017.

DIN 51385. Lubricants - Processing Fluids for Forming and Machining of Materials - Terms, Beuth-Verlag, 2013.

GILBERT, Y., VEILLETTE, M., DUCHAINE, C; Metalworking fluids biodiversity characterization. *J. Appl. Microbiol.* v.108, p. 437–449. 2010

KAPPOR, R. et al. Extended tracking of the microbial community structure and dynamics in an industrial synthetic metalworking fluid system. *FEMS Microbiology ecology*, v. 87, p. 664-677, 2014

KHAN U. H. I.; YADAV, S. J., Real-time PCR assays for genus-specific detection and qualification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids. *Molecular and Cellular Probes*, v.18, p.67 – 73. 2004

JAGADEVAN, S.; GRAHAM, N. J.; THOMPSON, J. P. Treatment of waste metalworking fluid by a hybrid ozone-biological process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 244-245, p. 394-402, 2013

LODDERS N., KAMPFER P., A combined cultivation and cultivation-independent approach shows high bacterial diversity in water-miscible metalworking fluids, *Systematic and Applied Microbiology* 35; 246– 252, 2012.

LONZA (a) Determinação de BIT em tintas látex, emulsões e detergentes por centrifugação, Instrução De Trabalho Do Controle De Qualidade 10.4.19, Revisão 02. 2013.

LONZA (b) Determinação de NBBIT em Fluido Metalworking via HPLC, Instrução De Trabalho Do Controle De Qualidade 10.4.21, Revisão 03. 2013.

MCADAM et al. Incorporating biodegradation and advanced oxidation processes in the treatment of spent metalworking fluids. *Environ. Technol*, v. 33, p. 2741-2750, 2012.

MEYER, D.; REDETZKY, M.; BRINKSMEIER, E. Microbial-based metalworking fluids in milling operations. *CIRP Annals*, v. 66, p. 129- 132, 2017.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH NIOSH. Centers for disease control and prevention; Hypersensitivity pneumonitis due to metal working fluids: sporadic or under reported. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/nioshtic-2/20041818.html>, acessado em 01/04/2015.

NIOSH National Institute for Occupational Safety and Health. Centers for disease control and prevention (NIOSH); Evaluation of hypersensitivity pneumonitis among workers exposed to metal removal fluids. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/nioshtic-2/20023907.html>, acessado em 01/04/2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT OECD, emission scenario document on the use of metalworking fluids, Environmental Health and Safety Publications Series on Emission Scenario Documents No. 28, 2011

OSHA. Metalworking Fluids, Occupational Safety & Health Administration, Safety and health topics, 2011 disponível em: <<https://www.osha.gov/SLTC/metalworkingfluids/>> Acesso em 08 nov. 2015.

PAULUS W., *Directory of Microbicides for the Protection of Materials – A Handbook*, DOI: 10.1007/1-4020-2818-0\_1 published by Kluwer Academic publishers, P.O Box 17, 3300AA Dordrecht, The Netherlands. 2004

RECHE, I. et al. Does Ecosystem Size Determine Aquatic Bacterial Richness? *Ecology*, v.86, p. 1715–1722, 2005.

ROSSMOORE, L.A., ROSSMOORE, H.W.; Metalworking fluid microbiology. IN: Byers editor. *Metalworking fluids*. New York, Marcel Decker Inc.; p. 247-271. 1994.

SAHA, R., DONOFRIO, R.S.; The microbiology of metalworking fluids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 94, p. 1119 – 1130, 2012.

SALMEEN I. et al. Presence of *Acinetobacter* species among the predominant bacteria found in a contaminated metal-working fluid. *Tribology International* Vol. 20, 218 – 221. 1987.

SANDIN M., MATTSBY-BALTZER I., EDEBO L. I. Control of Microbial Growth in Water-Based Metal-Working Fluids. *International Biodeterioration*, vol. 27, p. 61-74, 1991.

SEIDEL, B. et al. Performance evaluation of metalworking fluids based microorganisms. *Prod. Eng. Res. Dev.*, v. 11, p.41- 49, 2017.

SHELTON, B.G., FLANDERS, W.D., MORRIS, G.K.; *Mycobacterium* sp. as a Possible Cause of Hypersensitivity Pneumonitis in Machine Workers. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 05, p. 270- 273, 1999.

SIMPSON, A. T. et al. Occupational exposure to metalworking fluid mist and sump fluid contaminants. *Ann. Occup. Hyg*, v. 47, p. 17-30, 2003.

THEAKER, D., THOMPSON, I. The Industrial Consequences of Microbial Deterioration of Metal-working Fluid. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer - Verlag, Berlin, p. 2642 - 2650, 2010.

TRAFNY, E. A. et al. Microbial contamination and biofilms on machines of metal industry using metalworking fluid with or without biocidas. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 99, p. 31-38, 2015

VAN DER GAST C.J. et al. Identification and characterization of bacterial populations of an in-use metal-working fluid by phenotypic and genotypic methodology, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.47, p. 113 – 123, 2001.

Van der Gast, C. J. Selection of microbial consortia for treating metalworking fluids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 29, p. 20-27, 2002

VAN DER GAST, C.J. et al. Bacterial community structure and function in a metal-working fluid. *Environ. Microbiol.* v.5, p.453–461. 2003.

VIDELA, H. A; CHARACKLIS, W.G., Biofouling and microbiologically influenced corrosion, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.29, p.195-212, 1992.

VIJAY, V. et al, Predicting dermal permeability of biocides in commercial cutting fluids using laser approach. *Toxicology Letters*, v.175, p. 34- 43, 2007.

VIRJI, M.B. et al. Identifying the determinants of viable microorganisms in the air and bulk metalworking fluids. *American industrial Hygiene Association*, v. 61, p. 788-797, 2000.

ZHANG, Q. et al. Corrosion behavior of WC-Co hardmetals in the oil-in-water emulsions containg sulfate reducing *Citrobacter* sp. *Corrosion Science*, v. 94, p. 48-60, 2015.

YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70 (8), p. 4800–4806, 2004.

APENDICE A

Tabela 2. Resultados das contagens de micro-organismos aeróbios e ativos NBBIT e BIT no período de 02/02/2016 a 24/05/2016.

	02/fev	16/fev	22/fev	02/mar	08/mar	22/mar	30/mar	05/abr	12/abr	19/abr	26/abr	03/mai	10/jun	17/mai	24/mai
<b>Bacteria</b>															
A.1	<10	102	12	7,84E+05	7,30E+05	4,50E+05	3,46E+05	7,45E+05	4,30E+05	2,50E+04	1,52E+03	1,20E+02	2,54E+03	1,82E+03	9,34E+02
A.2	-	-	12	6,70E+04	<10	3,40E+04	5,60E+04	5,60E+04	3,20E+04	1,40E+05	2,40E+04	3,56E+02	1,02E+02	4,85E+02	8,28E+02
A.3	-	-	<10	3,40E+04	2,30E+04	<10	5,60E+04	<10	<10	1,20E+02	2,56E+03	5,60E+02	-	1,37E+03	1,23E+04
A.4	<10	241	65	5,30E+04	5,40E+04	3,50E+04	5,60E+04	<10	2,35E+03	-	-	-	-	-	-
A.5	102	221	<10	2,07E+04	6,70E+04	6,70E+04	3,90E+04	6,72E+04	3,56E+04	1,20E+04	1,20E+03	1,84E+02	2,50E+02	1,20E+02	1,25E+03
A.6	25	358	540	1,30E+04	<10	9,80E+01	2,37E+02	<10	3,40E+04	2,51E+02	2,58E+04	1,01E+02	1,32E+04	5,60E+02	1,47E+03
A.7	-	-	338	2,30E+04	4,50E+02	5,60E+02	3,24E+02	2,30E+03	4,30E+03	6,54E+03	2,50E+03	1,10E+04	1,20E+03	1,05E+02	9,52E+02
<b>Levedura</b>															
A.1	<10	1,50E+02	1,24E+03	1,20E+03	2,32E+04	3,40E+04	<10	<10	<10	1,50E+02	4,25E+02	7,86E+02	3,50E+02	7,08E+02	5,23E+02
A.2	-	-	3,54E+03	2,34E+03	<10	<10	1,00E+01	<10	<10	<10	7,79E+02	8,30E+02	<10	2,96E+02	2,90E+02
A.3	-	-	1,61E+03	<10	4,30E+04	<10	5,60E+04	<10	<10	<10	<10	9,40E+01	-	8,10E+02	6,69E+04
A.4	<10	3,32E+02	1,70E+03	2,30E+04	2,60E+04	3,10E+04	5,60E+04	<10	4,50E+04	-	-	-	-	-	-
A.5	<10	6,36E+02	1,70E+02	<10	4,20E+06	<10	<10	1,80E+04	<10	<10	9,28E+02	<10	<10	6,30E+01	<10
A.6	<10	4,80E+02	9,10E+01	<10	4,56E+06	<10	4,50E+03	<10	<10	<10	3,58E+02	2,57E+02	8,10E+02	6,72E+02	3,91E+03
A.7	-	-	5,80E+01	5,41E+04	4,30E+04	3,40E+05	4,32E+03	2,30E+03	1,80E+03	1,50E+03	2,51E+04	9,14E+02	7,60E+01	4,57E+02	2,30E+02
<b>NBBIT</b>															
A.1	90	85	91	96	105	107	53	60	61	63	55	52	50	47	45
A.2	-	-	40	45	60	55	69	87	90	89	75	78	75	76	65
A.3	-	-	36	30	48	37	57	100	102	103	95	90	-	81	76
A.4	62	60	46	35	28	29	17	14	15	ND	-	-	-	-	-
A.5	38	40	37	28	33	32	34	43	41	40	33	30	20	21	20
A.6	88	75	88	100	110	109	87	92	95	96	85	80	77	73	75
A.7	-	-	<2	<2	<2	<2	<2	7	5	5	<2	<2	<2	<2	<2
<b>BIT</b>															
A.1	13	5	5	4	16	32	18	34	24	25	20	18	13	10	8
A.2	-	-	6	5	19	14	<2	28	22	23	18	15	11	12	6
A.3	-	-	11	2	41	16	19	19	13	10	11	10	-	7	5
A.4	4	<2	<2	80	35	36	8	2	<2	ND	-	-	-	-	-
A.5	18	7	13	3	8	6	<2	4	<2	<2	<2	<2	5	4	4
A.6	<2	<2	2	<2	<2	<2	<2	11	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
A.7	-	-	<2	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2	<2	<2	<2	2	<2

Fonte: elaborado pela autora

**APENDICE B**

Tabela 3. Resultados das contagens de micro-organismos aeróbios e ativos NBBIT e BIT no período 31/05/2016 a 30/08/2016.

	31/mai	07/jun	14/jun	21/jun	28/jun	05/jul	12/jul	10/jul	26/jul	02/ago	09/ago	16/ago	22/ago	30/ago
<b>Bactéria</b>														
A.1	1,22E+04	1,81E+03	2,41E+03	1,50E+04	1,93E+02	1,71E+02	2,48E+02	1,19E+02	1,22E+02	2,14E+02	2,12E+02	2,54E+03	1,82E+02	1,00E+02
A.2	3,57E+02	3,67E+02	1,24E+02	8,80E+02	1,83E+02	2,38E+02	1,06E+02	1,62E+02	2,33E+02	1,33E+02	2,40E+02	1,20E+03	2,55E+04	1,90E+03
A.3	2,55E+04	1,76E+04	2,77E+02	2,25E+02	1,89E+02	1,93E+02	1,29E+02	1,27E+02	2,21E+02	<10	6,20E+01	2,60E+01	1,40E+02	4,65E+02
A.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A.5	4,81E+02	7,43E+02	1,07E+03	2,56E+04	7,70E+01	1,43E+03	1,42E+02	1,16E+02	2,02E+02	2,33E+02	1,20E+01	8,40E+01	1,43E+02	<10
A.6	1,65E+04	1,57E+03	1,84E+04	1,30E+03	2,12E+03	1,80E+03	1,93E+02	2,26E+03	1,88E+02	3,60E+04	1,25E+03	1,50E+03	<10	1,03E+03
A.7	7,37E+02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Levedura</b>														
A.1	2,32E+02	6,21E+03	9,10E+02	5,65E+03	5,69E+02	4,73E+02	6,16E+03	1,32E+04	5,87E+02	6,16E+04	3,47E+04	3,73E+03	5,51E+02	1,72E+03
A.2	4,50E+01	3,00E+01	9,98E+02	1,70E+02	5,00E+02	3,63E+02	2,87E+02	1,66E+04	2,16E+02	1,71E+04	1,39E+04	1,85E+03	3,54E+04	4,53E+04
A.3	3,67E+02	1,85E+04	9,74E+02	4,06E+02	3,18E+02	6,60E+02	6,76E+04	3,20E+04	<10	<10	1,24E+02	<10	3,06E+02	8,72E+02
A.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A.5	4,50E+01	2,70E+01	4,20E+01	3,53E+02	3,36E+02	5,13E+02	1,46E+02	3,66E+02	8,26E+02	4,40E+04	4,01E+02	3,40E+01	3,50E+01	1,40E+01
A.6	6,66E+02	8,22E+03	3,28E+03	1,35E+03	5,37E+02	2,45E+02	5,74E+03	2,52E+04	5,13E+02	3,11E+04	2,84E+04	4,82E+04	<10	3,40E+04
A.7	3,30E+01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NBBIT</b>														
A.1	40	45	48	50	15	12	10	13	10	<2	<2	<2	20	15
A.2	67	98	95	93	55	51	50	50	47	45	40	<2	15	17
A.3	74	53	55	48	34	13	17	33	10	<2	<2	27	22	25
A.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A.5	20	109	100	97	77	77	80	74	77	15	17	23	20	27
A.6	70	53	50	55	25	25	20	23	20	60	55	<2	70	69
A.7	<2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>BIT</b>														
A.1	6	<2	3	3	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	11	3	<2
A.2	7	7	6	6	4	3	2	<2	<2	<2	<2	10	3	<2
A.3	3	<2	<2	<2	<2	<2	7	<2	9	<2	<2	<2	<2	<2
A.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A.5	4	<2	<2	<2	<2	<2	10	8	10	<2	<2	3	<2	2
A.6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	5	45	45
A.7	<2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: elaborado pela autora