

5. Resultados e discussões

No presente trabalho foram realizados dois estudos com a finalidade de simular as condições de formação de biofilme nos tanques de estocagem de petróleo (teste estático) e o outro com a finalidade de simular as condições de um sistema de escoamento de petróleo (teste dinâmico). Em ambos os estudos foi realizada uma avaliação da cinética de formação dos biofilmes. Avaliou-se também a ação do biocida THPS sobre o biofilme formado e a influência deste agente químico no processo de formação do biofilme.

5.1. Ensaio Estático

Para o ensaio estático a quantificação de bactérias planctônicas só foi realizada no início do ensaio, onde o resultado foi idêntico ao do sistema dinâmico, pois o fluido utilizado apresentava as mesmas condições e a quantificação no final do ensaio não foi realizada, pois as condições microbiológicas em cada frasco são provavelmente diferentes, e assim não poderia fornecer um dado utilizável.

5.1.1. Ensaio 1 – Avaliação da cinética de formação do biofilme

A tabela 9 apresenta os resultados da quantificação dos grupos microbianos avaliados no fluido oleoso.

Tabela 9 – Crescimento de bactérias planctônicas

Tempo de processo (horas)	BANHT	BRS
24	6,90E+04nmp/mL	6,90E+03nmp/mL

Foi observado na tabela 10 que não ocorreu o crescimento de BPF, BFHT e BRS no sistema, apenas as BANHT apresentaram células cultiváveis.

Tabela 10 – Monitoramento dos microrganismos

Tempo do experimento (hs)	BANHT	BRS	BPF	BFHT
24	2,25E+02nmo/cm ²	ND	ND	ND
96	1,00E+00nmp/cm ²	ND	ND	ND
168	1,05E+01nmp/cm ²	ND	ND	ND
264	1,29E+02nmp/cm ²	ND	ND	ND
360	3,60E+02nmp/cm ²	ND	ND	ND

ND – não detectado

Na figura 32 pode-se analisar o comportamento do crescimento de BANHT ao longo do ensaio com uma queda acentuada no ponto de 96 horas e posteriormente um crescimento da população sésil. Está queda pode estar relacionada com a inoculação e com as condições do frasco, pois cada tempo apresentava um frasco diferente. Comparando as análises de microscopia, contagem bacteriana e contagem de pites podemos observar que ocorreu uma queda no ponto de 96 horas e que a formação de um biofilme maduro só ocorreu com 360 horas de ensaio.

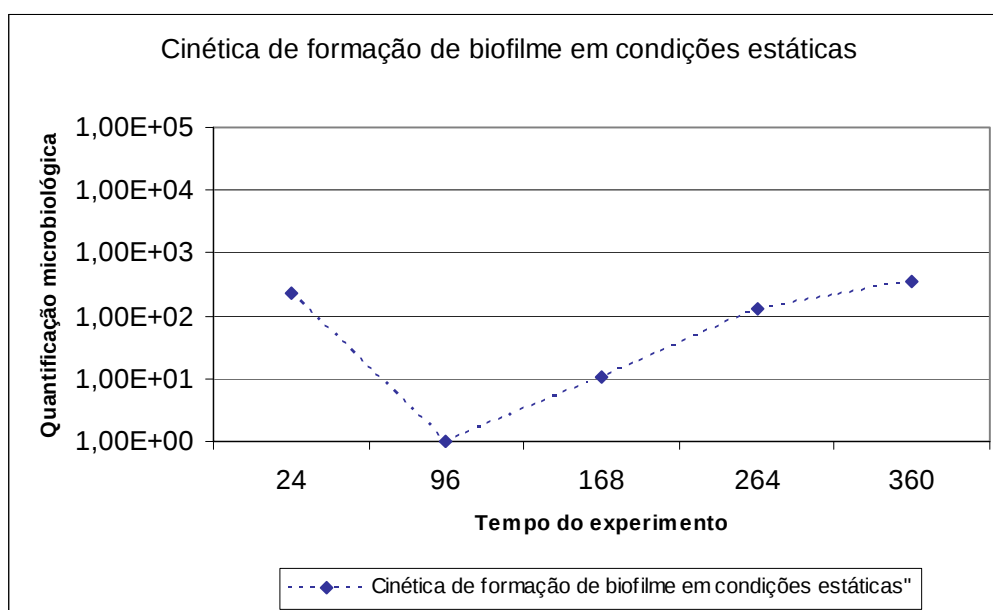


Figura 32 - Crescimento microbiológico na cinética de formação do biofilme.

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura e utilizando o protocolo 2 foi possível avaliar a formação do biofilme no ensaio estático.

Após 24 horas de incubação observamos (Figura 33 A e 34 A) que não há presença de material polimérico e sim uma superfície irregular com presença de produto de corrosão. O mesmo ocorre para 96 e 168 horas, onde pode ser visualizado (Figura 33

B e 34 B e Figura 33 C e 34 C) que quase toda a área da superfície do cupom está coberta de produto de corrosão. A partir de 264 horas (Figura 33 D e 34 D) é possível observar a formação de material polimérico, sem a presença de bactérias. Após 360 horas (Figura 33 e 34 E) é observada a presença de um biofilme. Análise de EDS (Figura 35, região marcada na figura 33 e 34) destes cupons mostrou a presença de compostos inorgânicos como cálcio, magnésio, ferro e outros.

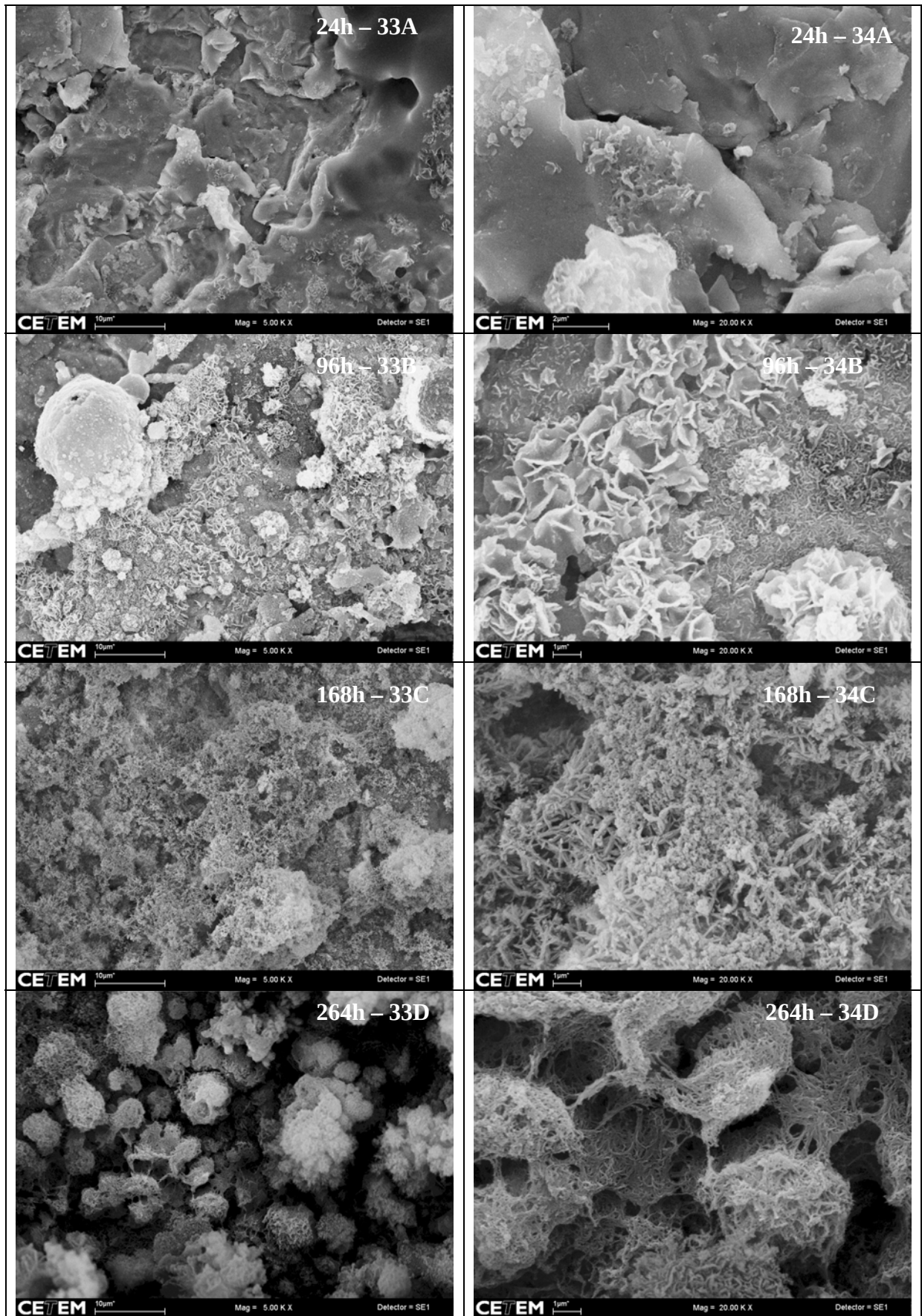




Figura 33 – Cinética de formação de biofilme em condições estáticas

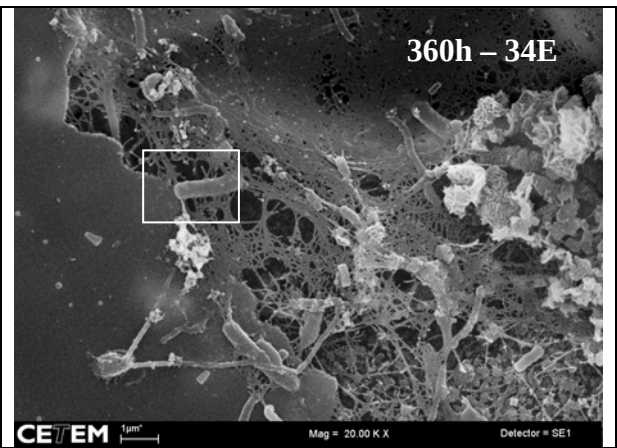


Figura 34 – Cinética de formação de biofilme em condições estáticas

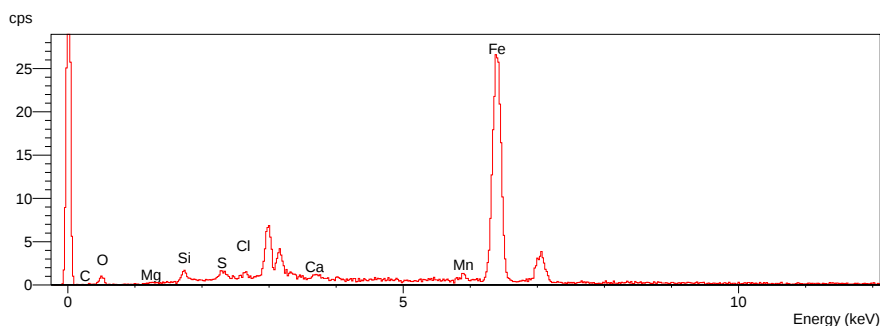


Figura 35 - EDS realizado no cupom 360 horas.

Os compostos inorgânicos presentes no biofilme variam de acordo com a composição química do fluido em que eles se encontram e, provavelmente, afetam sua estrutura física e biológica. Elementos como cálcio, o magnésio e o ferro interferem diretamente nas ligações entre as SPE do biofilme. SPE promovem processos de adesão e são responsáveis pela integridade estrutural do biofilme (Characklis, 1981; Applegate e Bryers, 1991).

A tabela 11 apresenta os resultados das contagens dos pites formados nos cupons expostos ao fluido oleoso onde a área total medida foi toda a área do cupom.

Os pites identificados são, na verdade, micropites com baixa densidade. A densidade de pites foi inferior ao menor índice estabelecido na norma ASTM G-01, referência de avaliação. A figura 36 apresenta uma imagem representativa da avaliação de pites.

Tabela 11 – Densidade de pites nos cupons em condições estáticas

Tempo do processo (hs)	Densidade dos pites na cinética de formação do biofilme
24	9,00E+05
96	1,00E+06
168	1,90E+06
264	2,20E+06
360	2,40E+06

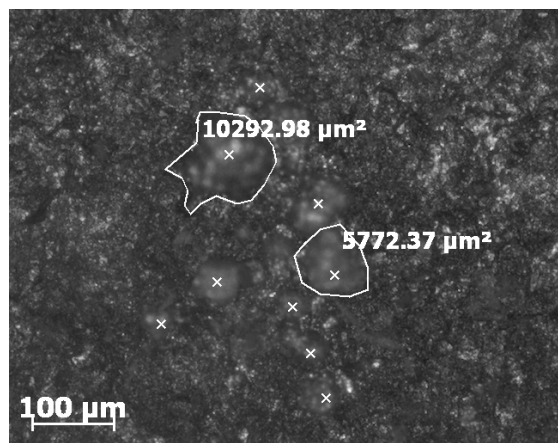


Figura 36 – Imagem representativa da contagem de pites

Na análise da figura 37 observamos que não houve diferença significativa no número de pites encontrados, em relação a cinética de formação do biofilme.

Não é observada alteração significativa no número de pites formados ao longo do experimento. Este fato nos leva a concluir que a contribuição das BANHT na formação de pites não é expressiva.

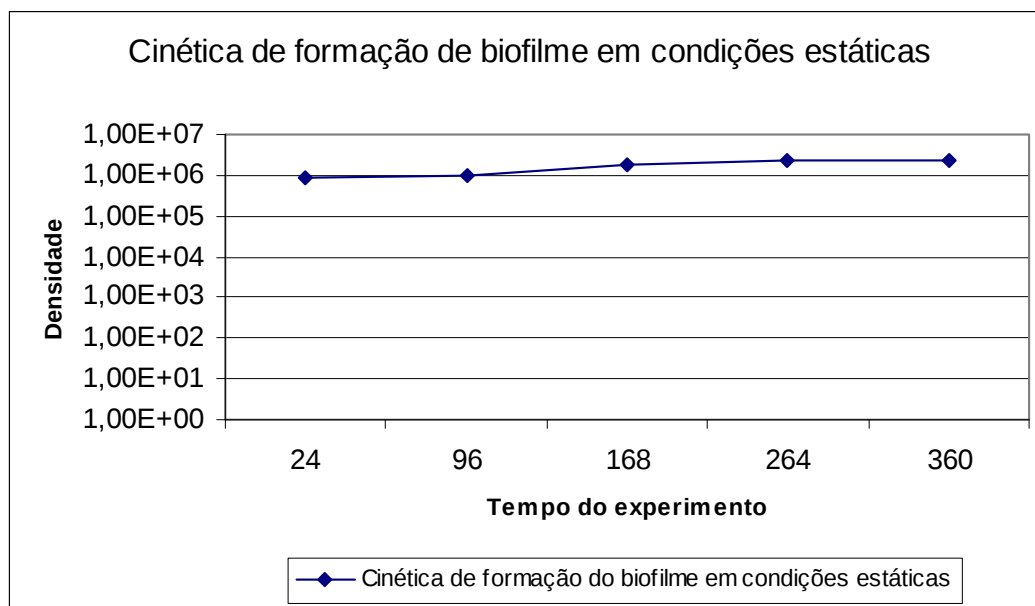


Figura 37 – Densidade de pites na cinética de formação do biofilme

5.1.2. Ensaio 2 - Influência da adição de THPS na formação de biofilme

Na tabela 12 estão representados os resultados encontrados no monitoramento de BANHT após a adição do biocida.

Tabela 12 – Monitoramento da BANHT

Tempo do experimento (horas)	Influência da adição de THPS na formação de biofilme	BRS	BPF	BFHT
24	4,50E+03	ND	ND	ND
96	1,05E+01	ND	ND	ND
168	1,00E+00	ND	ND	ND
264	9,00E+00	ND	ND	ND
360	6,90E+02	ND	ND	ND

A figura 38 mostra que para a concentração do biocida de 30ppm, usada no ensaio, a população bacteriana vai decaindo até 168 horas quando atinge valor muito baixo, se observa que a partir de 168 horas o crescimento da população bacteriana volta a ocorrer voltando a níveis similares àquele encontrado após 24 horas.

Este fato nos leva a concluir que nas condições do ensaio, a concentração de 30ppm só foi efetiva nas primeiras horas. Após o período de 168 horas observou-se um aumento de concentração de células sésseis até o final do monitoramento.

Os biocidas tendem a eliminar apenas uma fração das bactérias presentes nos biofilmes e as que sobrevivem crescem rapidamente para reconstruir um biofilme ativo. Isso confirma a necessidade de se fazer uma dosagem freqüente dos biocidas a fim de manter as populações bacterianas sésseis em um nível baixo. A utilização rotineira de “pigs” raspadores, antes e após as dosagens com os produtos químicos, também deve ser adotada para aumentar a eficiência do tratamento (Al-Hashem e colaboradores, 1999).

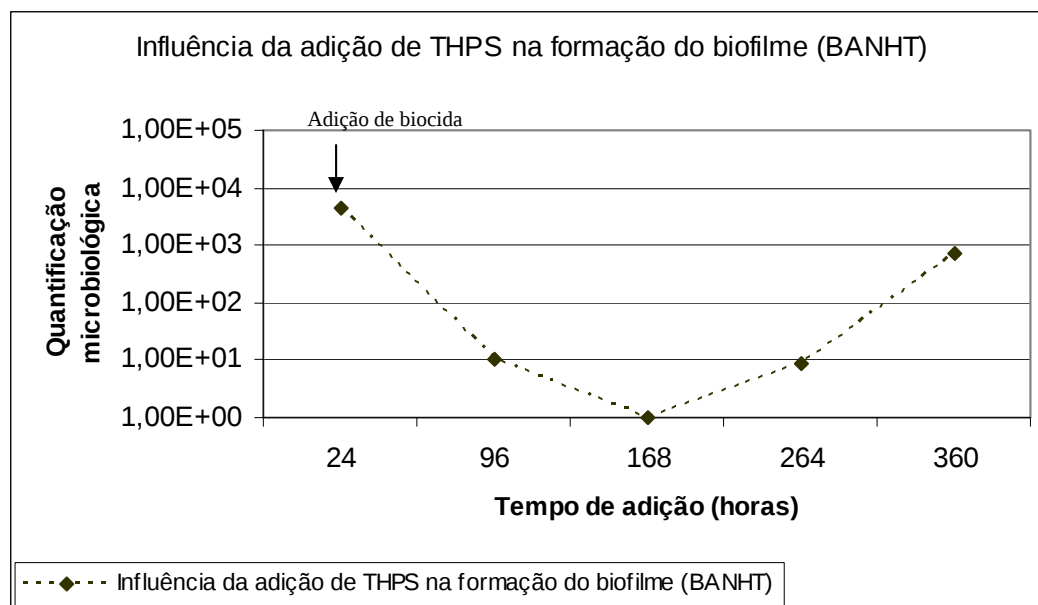
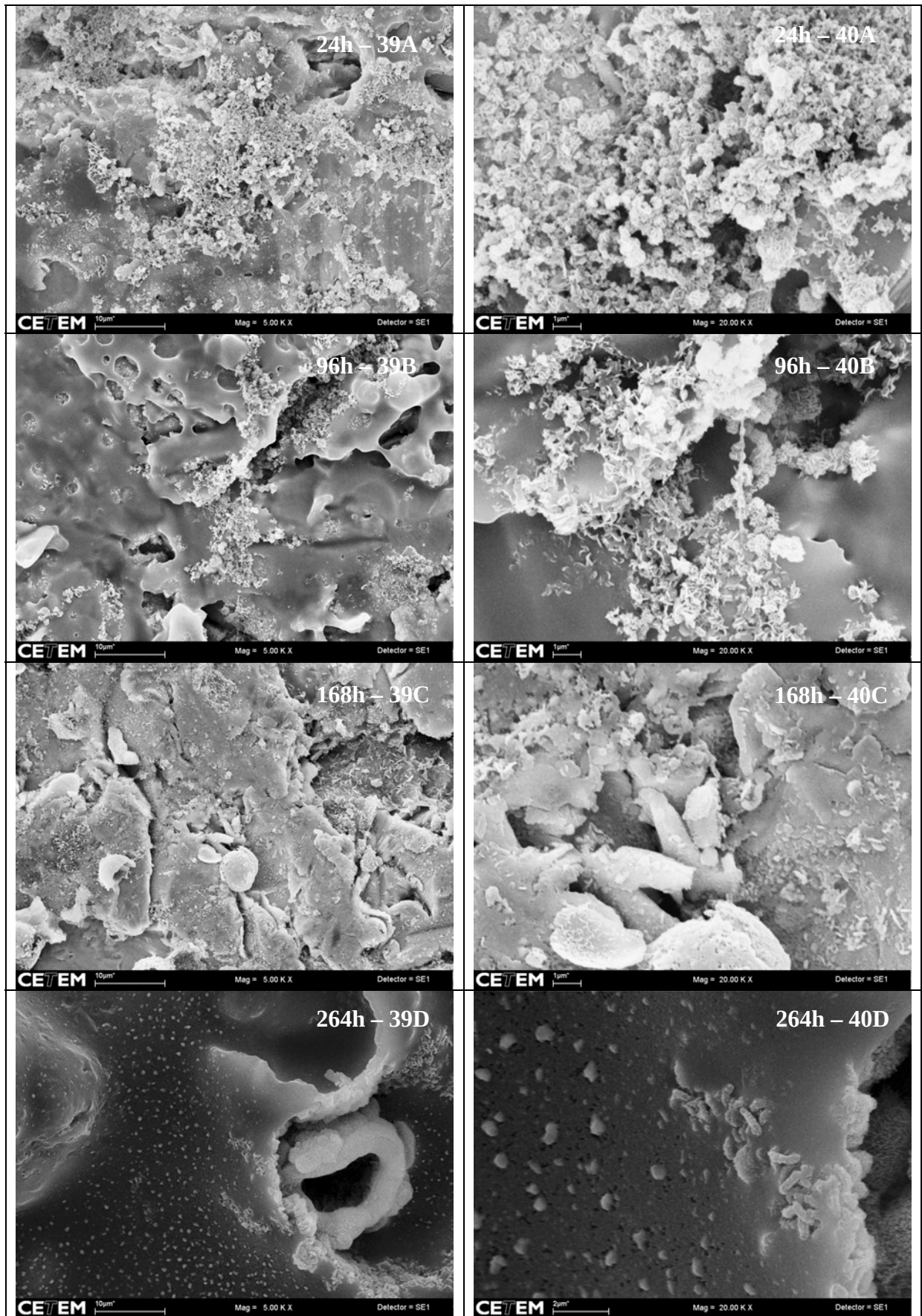


Figura 38 – Crescimento microbiológico avaliado na influencia da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas.

Trabalhos realizados em laboratório têm demonstrado que microrganismos em biofilmes (forma sésil) estão protegidos dos efeitos letais dos biocidas (Foley e Gilbert, 1996). O grau de resistência dos biofilmes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos está claramente associado com elementos de matriz extracelular (Costerton e colaboradores, 1999). Existem na literatura trabalhos sugerindo que SPE poderiam fisicamente dificultar a difusão e o acesso de agentes antimicrobianos às células do interior do biofilme (Suci e colaboradores, 1994).

Análise da superfície dos cupons mostrou que após 24 horas de incubação (Figura 39 A e 40 A) havia muito produto de corrosão e pouco material polimérico, não havendo presença de bactérias. Após 96 horas (Figura 39 B e 40 B) observou-se tanto pouca quantidade de material polimérico, como poucas bactérias e muito produto de corrosão como sulfeto de ferro próximo e aderido ao SPE e às bactérias. Após 168 horas (Figura 39 C e 40 C) tanto as bactérias, como o material polimérico são muito reduzidos e os produtos de corrosão aumentam, pois este ponto representa o tempo de maior eficiência do biocida. Após 264 horas (Figura 39 D e 40 D) encontramos tanto bactérias como produto de corrosão (sulfeto de ferro) e a presença de uma estrutura que se assemelha a um tubérculo. Após 360 horas (Figura 39 E e 40 E) não foi detectada a presença de bactérias, somente produto de corrosão.



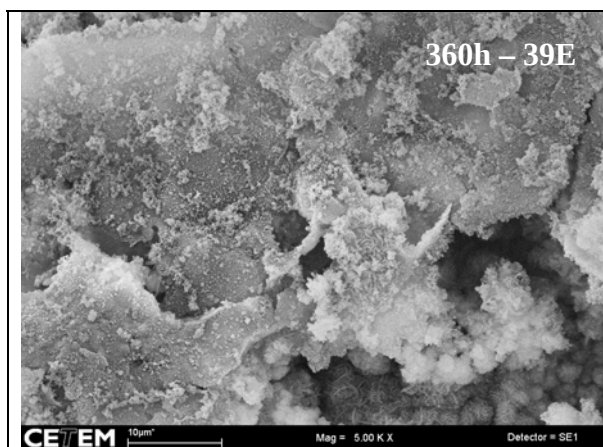


Figura 39 – Cinética após a adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas.

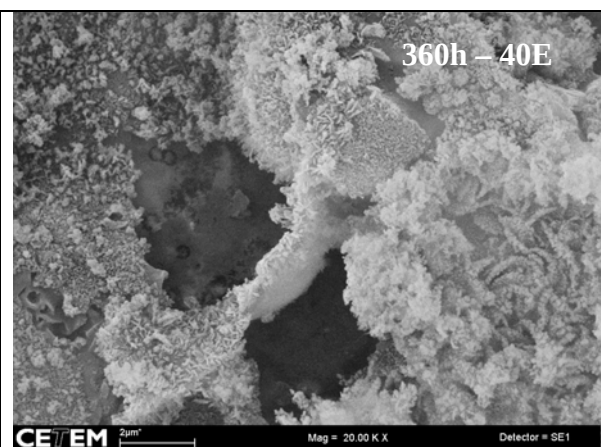


Figura 40 – Cinética após a adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas.

De modo a compreender melhor a cinética de formação do biofilme foi realizada análise por EDS (Figura 41) para 360 horas (Figura 39 e 40 E). Esta demonstra a presença de ferro e sulfeto que juntos formam o composto sulfeto de ferro confirmando assim a presença destes compostos na análise.

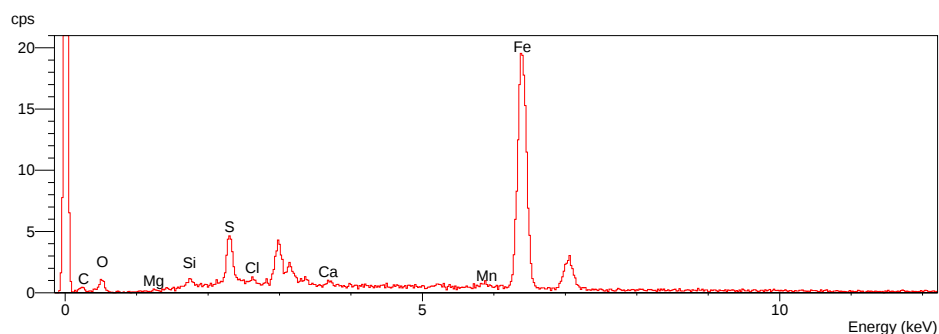


Figura 41 – Análise de EDS para avaliação da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas.

O produto de corrosão, sulfeto de ferro, foi encontrado ao longo deste ensaio associado à pequena quantidade de biofilme e envolvendo a superfície bacteriana. Foi estudada por Videla, 2000 a presença destes compostos em biofilmes formados por BRS.

Tabela 13 – Densidade de pites

Tempo do processo (hs)	Densidade de pites com influencia da adição de THPS na formação de biofilme
24	2,90E+06
96	1,80E+05
168	9,00E+04
264	2,30E+05
360	4,10E+05

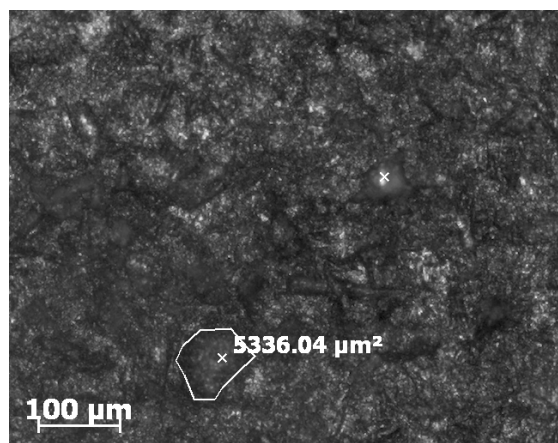


Figura 42 – imagem representativa da contagem de pites

A densidade de pites (Figura 42) apresenta o mesmo perfil do crescimento bacteriano (Figura 38), mostrando a influencia da formação de bactérias na corrosão do material.

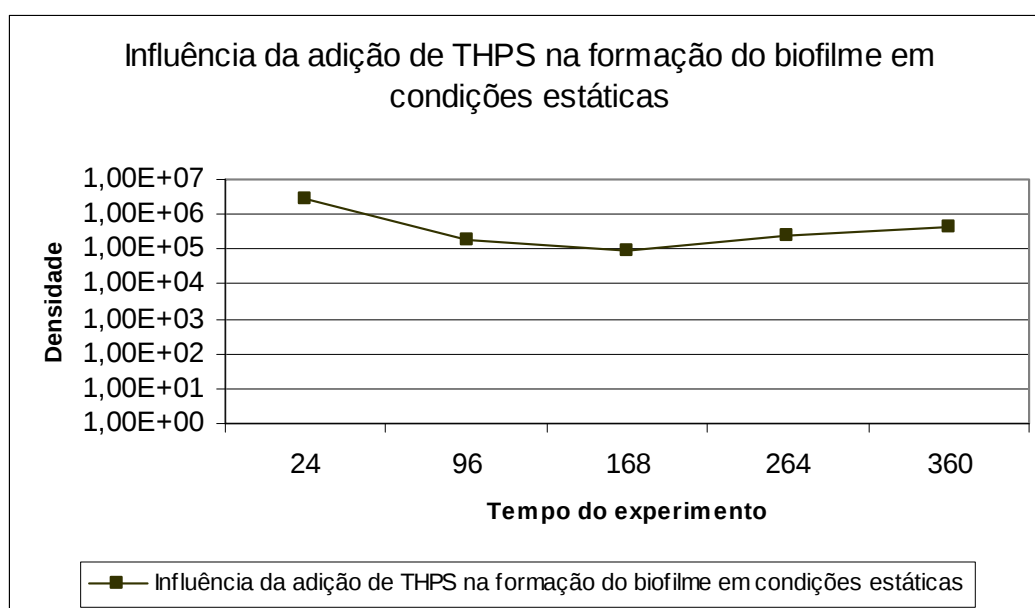


Figura 43 – Densidade de pites na avaliação da adição de THPS na formação do biofilme.

5.1.3. Ensaio 3 – Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado

Tabela 14 – Monitoramento de BANHT

Tempo do experimento (horas)	Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado	BRS	BPF	BFHT
24	6,90E+01	ND	ND	ND
96	4,20E+01	ND	ND	ND
168	1,00E+00	ND	ND	ND
264	1,29E+02	ND	ND	ND
360	1,29E+02	ND	ND	ND

Neste ensaio observou-se o mesmo perfil de comportamento do ensaio 2. Convém ressaltar que antes da adição do biocida, o material estava exposto ao fluido oleoso por 360 horas sendo este, portanto, o tempo de formação do biofilme. Após a adição do biocida observou-se uma drástica diminuição do número de células viáveis até 168 horas. Após este período sem a adição de nutrientes ao meio, a concentração celular aumenta atingindo ao final do monitoramento valores mais altos que no início (Figura 44). Estes dados corroboram os resultados obtidos no ensaio 2.

Em muitos sistemas industriais, é importante que os biocidas possam promover uma morte rápida da população bacteriana, caso contrário, o tempo de contato e a taxa de renovação podem ser tais que, se um biocida não demonstrar rápida eficiência, sua concentração cairá para níveis não efetivos (Al-Hashen, 1999).

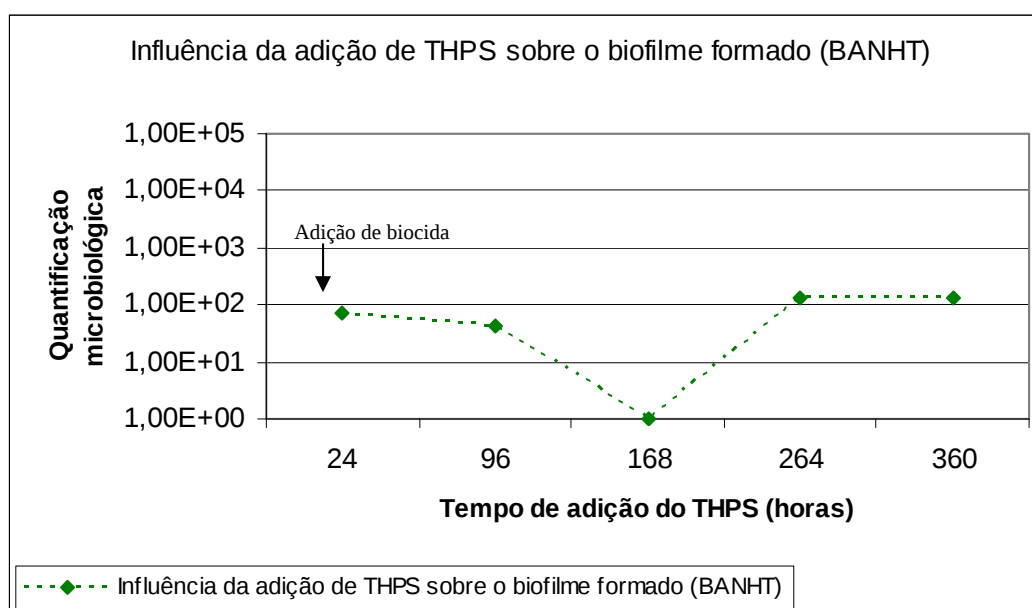
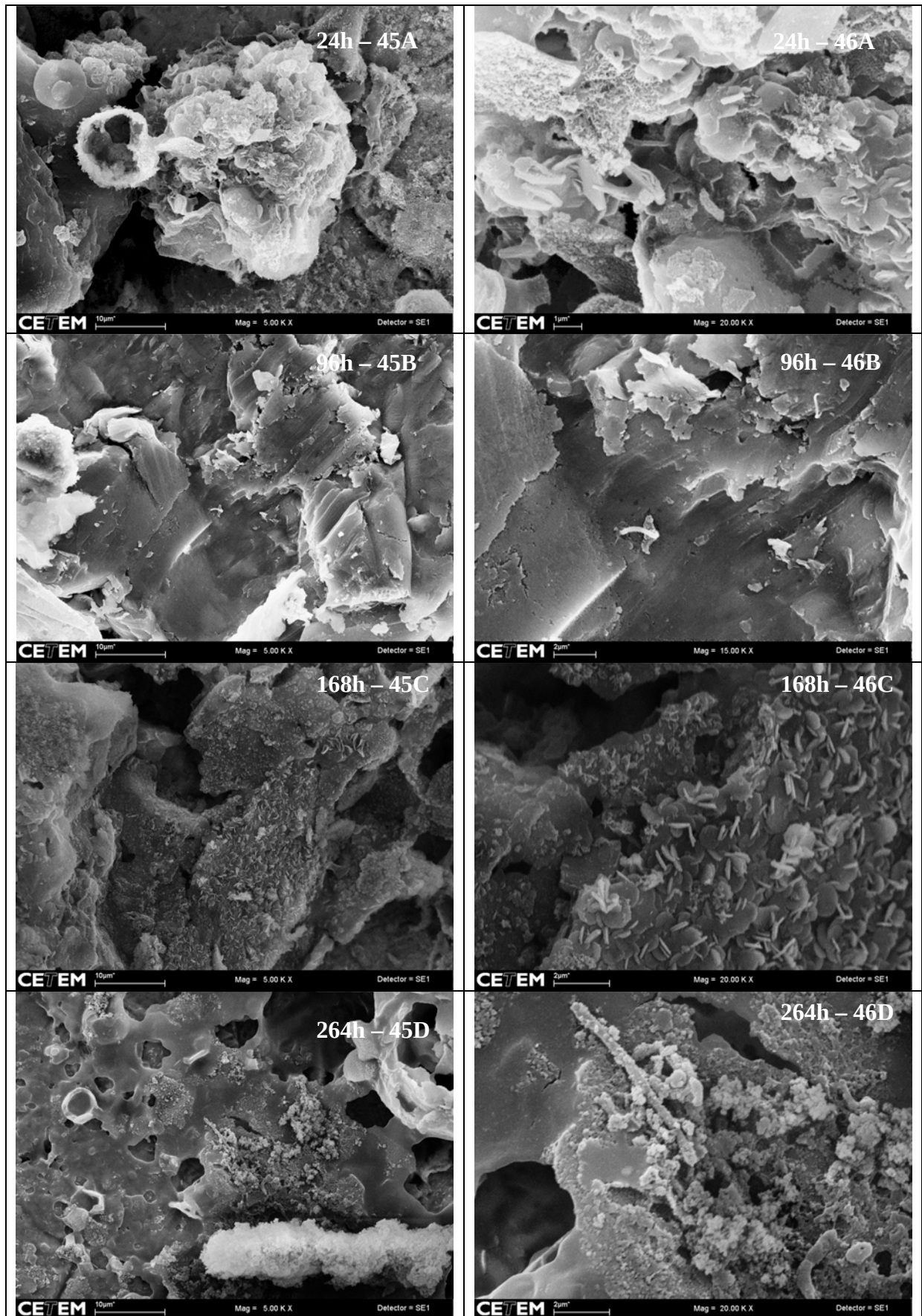


Imagem 44 – Crescimento microbiológico avaliado na influencia da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas.

Através das análises realizadas no MEV foi possível observar a presença de bactérias em pequena quantidade e pouco material extracelular. Quando comparamos as imagens da avaliação do THPS na formação do biofilme com a imagem do biofilme já formado observamos que o cupom apresenta uma superfície diferente, mas em ambos os cupons foram encontradas bactérias nos tempos de 96 horas e 264 horas, figura 45 e 46 B e D, respectivamente.

A redução do biofilme formado na superfície do cupom é relacionada a adição de biocida ao sistema. Isto é corroborado com a contagem microbiológica onde após 168 horas ocorre uma queda acentuada na população bacteriana.

A análise por MEV mostra que a evolução do biofilme segue o padrão definido pela contagem microbiana. Após 24 horas há pouco produto de corrosão (Figura 45 A e 46 A) e ausência de biofilme, visualizado. Após 96 horas se observa um início de formação de biofilme (Figura 45 B e 46 B) pela presença de pouco material extracelular e bactérias isoladas. Após 168 horas existe apenas a presença de produto de corrosão (Figura 45 C e 46 C) o que é evidente com a ação do biocida. Para os demais tempos de ensaio 264 e 360 horas (Figuras 45 D e 46 D e 45 E e 46 E, respectivamente) se detecta a presença de material extracelular e bactérias, embora em pouca quantidade.



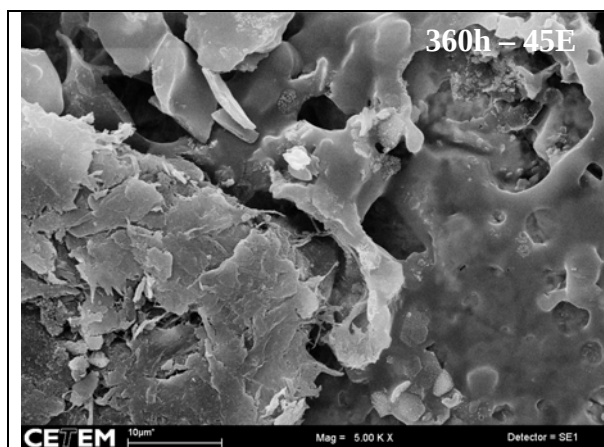


Figura 45 – Imagens da avaliação da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas.

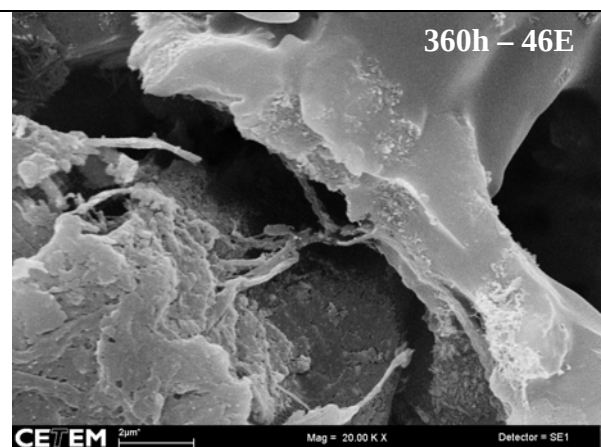


Figura 46 – Imagens da avaliação da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas.

É detectada através de análise por EDS (Figura 47), a presença de oxigênio e ferro indicando possivelmente a formação de óxido de ferro como produto de corrosão. Esta formação é um indicativo apenas da presença de oxigênio no sistema não sendo necessariamente relacionada com o metabolismo microbiano.

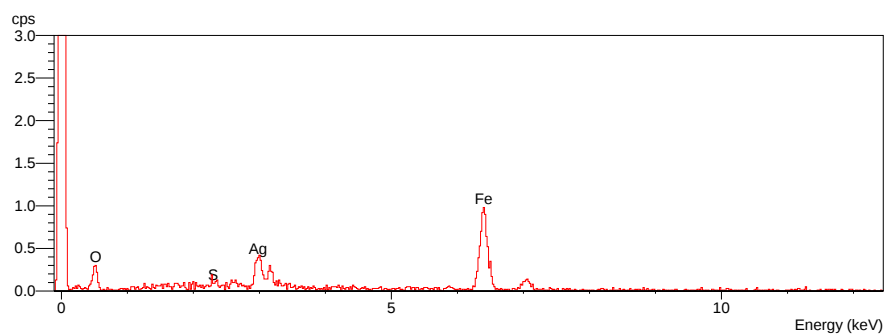


Figura 47 – Análise de EDS no cupom de 360 horas.

Tabela 15 – Densidade de pites

Tempo do experimento (hs)	Influencia da adição de THPS sobre o biofilme formado
24	1,20E+06
96	7,70E+05
168	6,80E+05
264	8,10E+05
360	1,20E+06

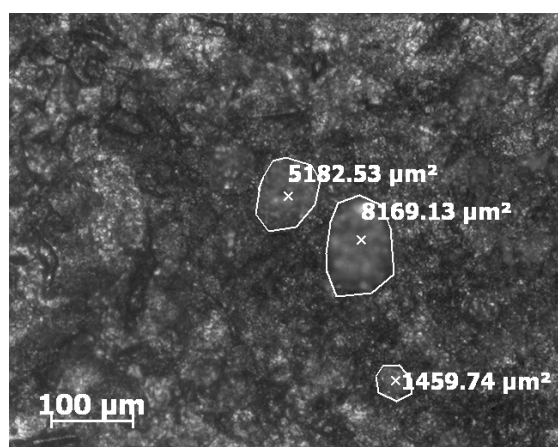


Figura 48 – Imagem representativa da contagem de pites

Não é observada alteração significativa no número de pites formados ao longo do experimento (Figura 49). Este fato nos leva a observar que a contribuição das BANHT na formação de pites não é expressiva tendo em vista que, após 168 horas houve uma queda do número de células viáveis (Figura 44) não refletindo redução do número de pites.

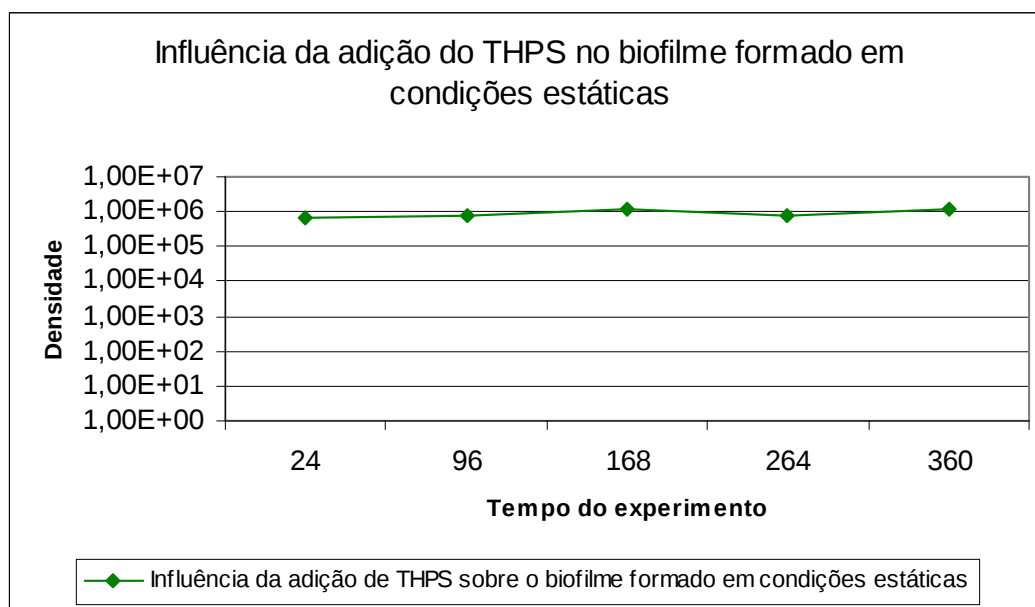


Figura 49 – Densidade de pites na avaliação da adição de THPS sobre o biofilme formado.

5.2. Ensaio Dinâmico

A figura 50 mostra a aparência característica do suporte do “looping” utilizado no sistema dinâmico com o cupom impregnado de óleo.



Figura 50 – Suporte utilizado no sistema dinâmico e o cupom.

5.2.1. Ensaio 1 – Avaliação da cinética de formação do biofilme

Foi realizada a quantificação das bactérias planctônicas no início e no final do experimento. Avaliou-se o crescimento de bactérias BANHT, BRS, BPF e BFHT.

Os resultados mostraram que as bactérias dos grupos BPF e BFHT não apresentaram crescimento ao longo de todo o ensaio, já as BRS e BANHT apresentaram crescimento (Figura 51 e 52 respectivamente), porém estas tiveram comportamento diferente ao longo do estudo. Como mostrado na tabela 16, houve uma diminuição do número de células viáveis, para os dois grupos microbianos.

Tabela 16 - Crescimento microbiológico de bactérias Planctônicas

Tempo de processo (horas)	BANHT	BRS
24	6,90E+04	6,90E+03
360	3,30E+03	1,1E+01

A concentração de bactérias planctônicas presentes no fluido de processo exerce um papel fundamental na determinação da taxa inicial de colonização microbiana da superfície. Após a adesão, a população bacteriana séssil torna-se independente da planctônica (Ferris & colaboradores, 1989). Em sistemas industriais as células aderidas

podem sofrer destacamento e deste modo são carreadas pelo fluxo passando a controlar o acúmulo de biofilme em outra parte do sistema (Hermanowicz & Cooper, 1987).

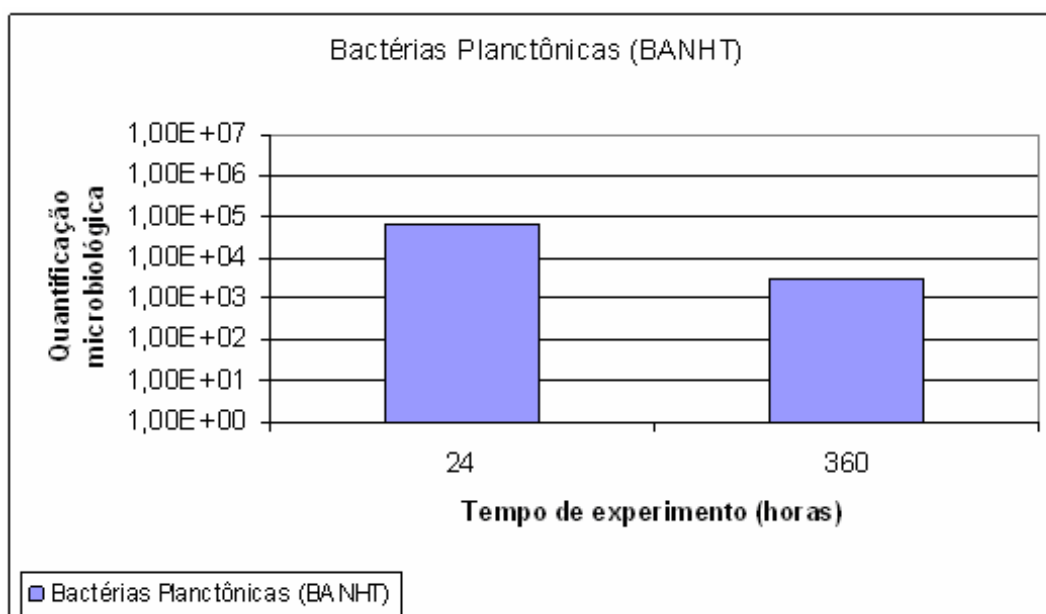


Figura 51 – Comportamento das BANHT no “looping”.

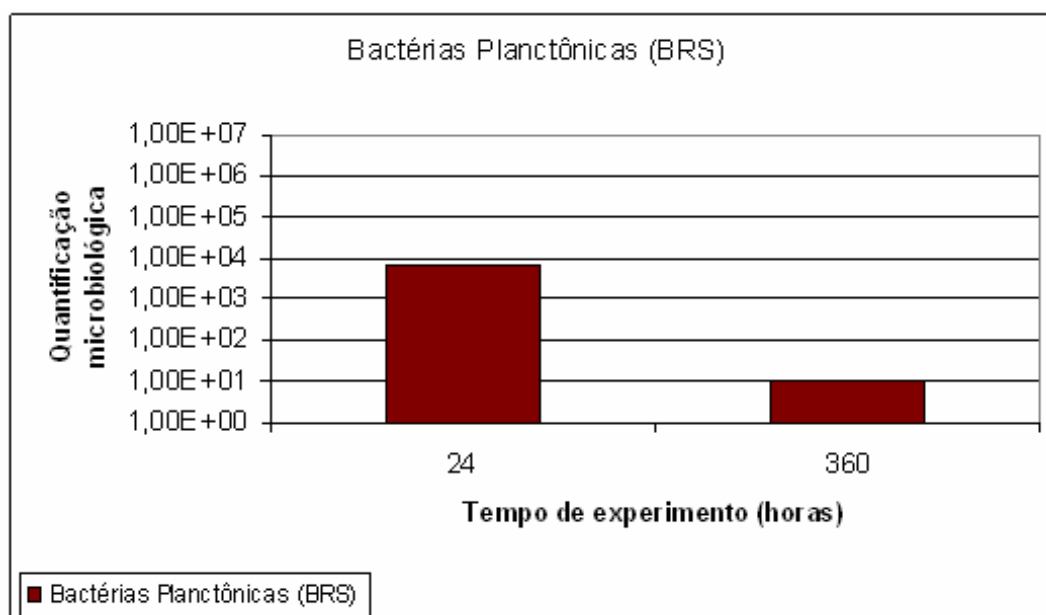


Figura 52 – Comportamento das BRS no “looping”

Na primeira etapa do ensaio dinâmico foram retirados cupons para análise de superfície por MEV e para quantificação microbiana. Pelos resultados obtidos, não foi detectada a presença de BPF, BFHT e BRS sésseis em nenhum dos tempos avaliados. O grupo das BANHT foi o único que demonstrou capacidade de adesão e viabilidade celular nas condições experimentais ensaiadas. A tabela 18 apresenta o resultado do monitoramento deste grupo ao longo do tempo dos processos. Através da figura 53 pode-se analisar mais claramente o comportamento do crescimento microbiológico ao longo do ensaio. Com 96 horas de exposição a concentração celular aderida à superfície metálica foi bastante baixa como pode ser observado na tabela 17 e na figura 53. Considerando que o processo de formação do biofilme é bastante dinâmico, e que neste período o biofilme ainda não estava fortemente aderido, e o fenômeno de destacamento é considerável, pode-se concluir que, possivelmente, no momento de retirada do cupom havia pouca formação de biofilme.

Tabela 17 – Monitoramento de BANHT (sésseis)

Tempo do experimento (hs)	Cinética de formação de biofilmes em condições dinâmicas (BANHT)
24	6,90E+01
96	1,00E+00
168	2,16E+01
264	2,76E+01
360	6,90E+02

Através da figura 53 observou-se também que não houve diferença de crescimento nas primeiras 264 horas de processo, sendo detectado um aumento no número de células cultiváveis apenas com 360 horas (15 dias). Este comportamento mostrou-se diferente daqueles observados em estudos onde a água do mar é utilizada como fluido (Penna, 2004). Nestes casos, o número de microrganismos planctônicos é maior o que favorece os mecanismos de transferência de massa e conseqüentemente o processo de adesão às superfícies.

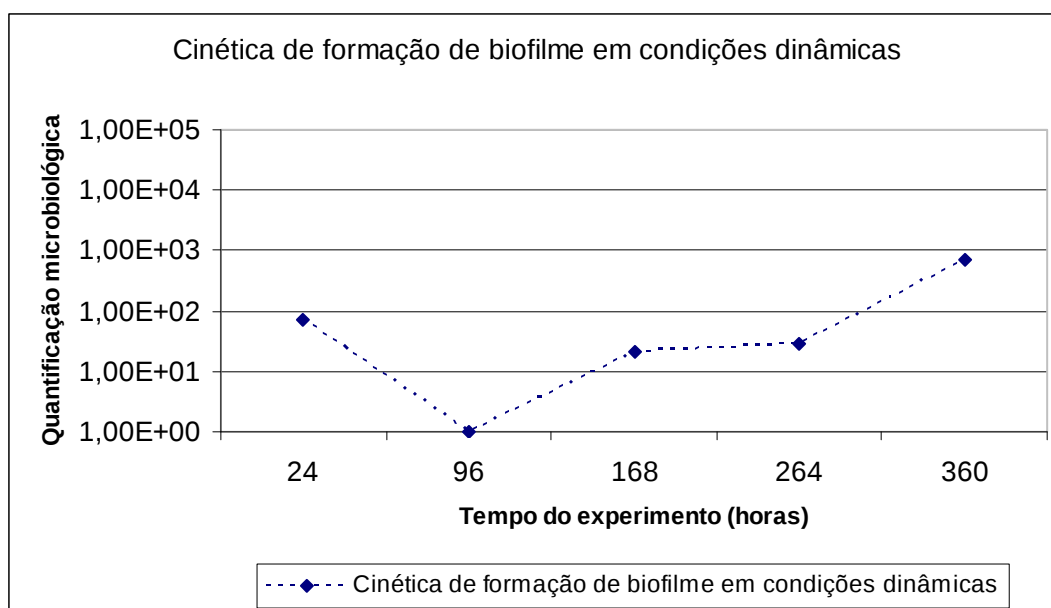
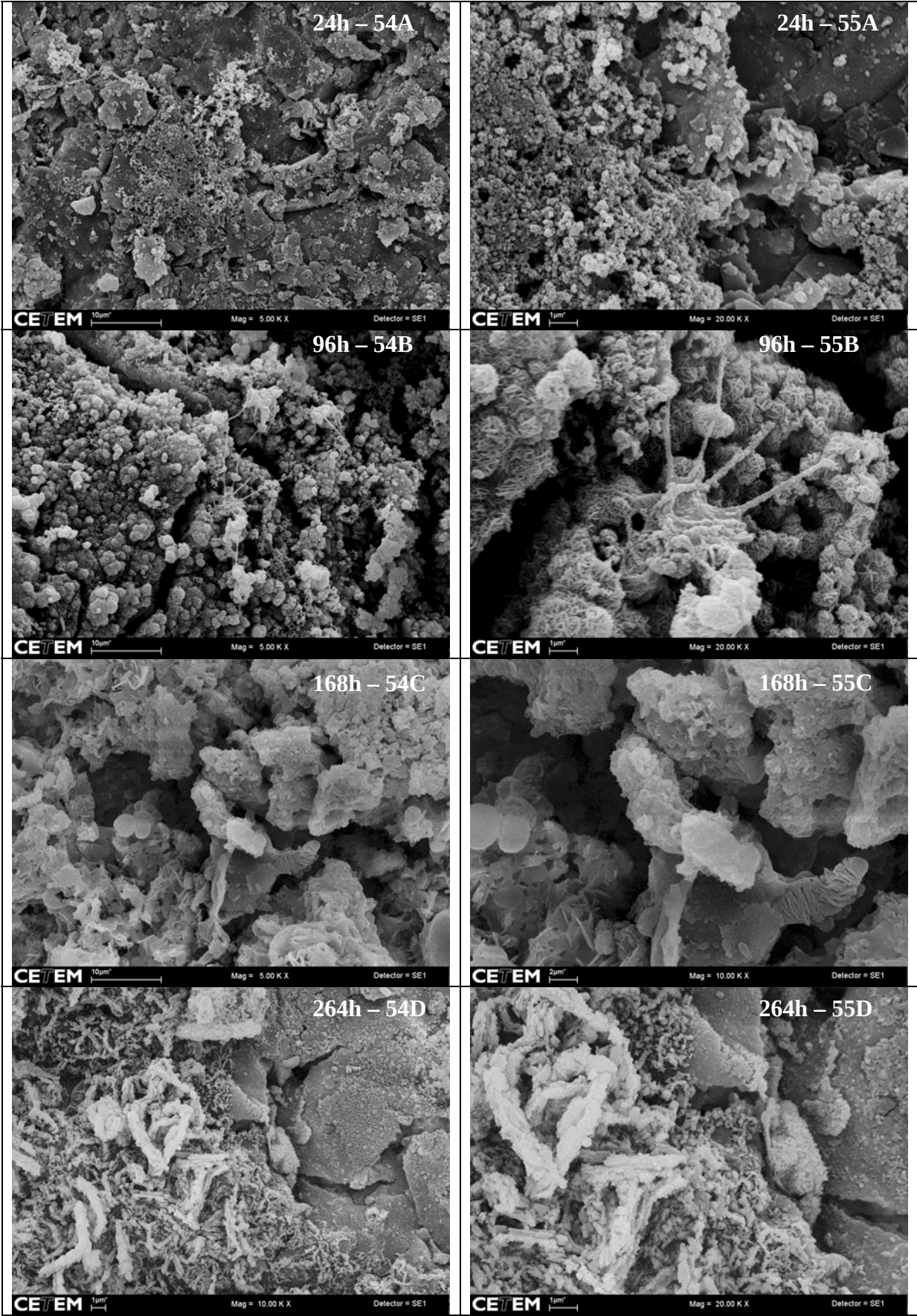


Figura 53 – Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas (BANHT)

A análise por microscopia eletrônica do ensaio de cinética de formação de biofilme sem THPS, utilizando o protocolo 2, mostra que após 24 horas de incubação em fluido oleoso, o cupom apresenta depósitos irregulares na sua superfície, possivelmente produtos de corrosão (Figura 54 A e 55 A).

Após 96 horas é possível se observar o início da formação de matriz extracelular, porém sem a presença de bactérias (Figura 54 B e 55 B). Esta mesma condição é também observada para 168 horas (Figura 54 C e 55 C), para 264 horas (Figura 54 D e 55 D). No entanto, é possível se observar que após 360 horas (Figura 54 E e 55 E) um filme com a presença de matriz extracelular e bactérias é formado. Indicando que entre 264 e 360 horas houve a formação do biofilme.



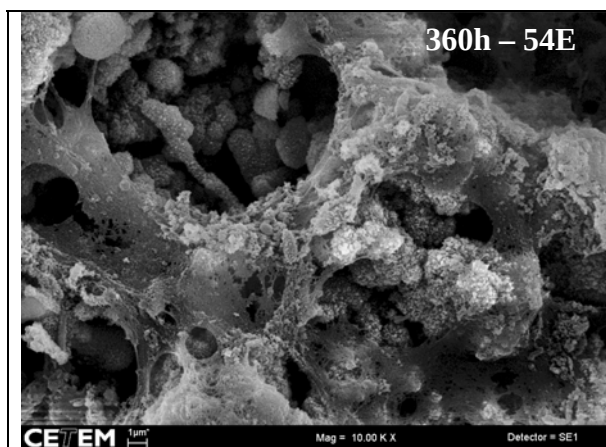


Figura 54 – Cronologia da formação do biofilme em condições dinâmicas sem THPS

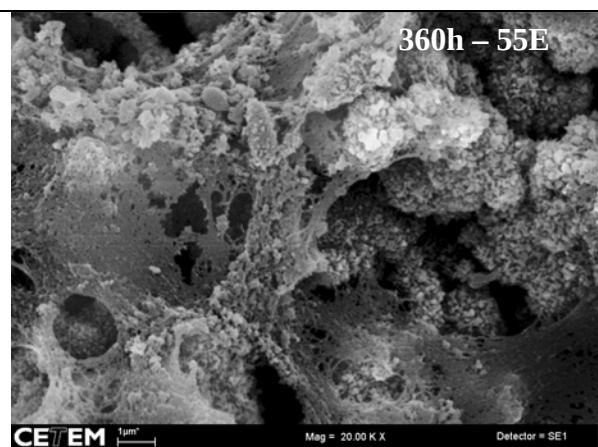


Figura 55 – Cronologia da formação do biofilme em condições dinâmicas sem THPS

O biofilme formado em superfícies é uma estratégia bacteriana universal para sobrevivência e posicionamento favorável em relação aos nutrientes disponíveis (Costerton & colaboradores, 1985). Nos ambientes extremamente oligotróficos do oceano e lençóis d'água profundos, com ambiente nutritivo muito escasso como é o caso do fluido oleoso, (Amy & Morita, 1984), essas células alteram suas superfícies (Kjelleberg & Hermansson, 1984) e seus padrões de síntese de peptídeos (Groat & colaboradores, 1986) em resposta à falta de nutrientes e não gastam seus escassos recursos metabólicos em síntese de exopolissacarídeos, a menos que sejam reativados pela estimulação nutricional.

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura foi observado que a produção de material polimérico não foi muito intensa se encontrando apenas as bactérias.

A adesão de bactérias a superfícies sólidas em ambientes aquosos é uma interação complexa entre a bactéria, o substrato e meio líquido. Fatores biológicos que influenciam a adesão bacteriana são conhecidamente proteínas de superfície, substâncias poliméricas extracelulares (SPE), apêndices como flagelos e fímbria, estado fisiológico, mobilidade e tamanho da célula, grau de hidrofobicidade e carga eletrostática da superfície celular (DeFlaun e colaboradores, 1990; Gannon e colaboradores, 1991; McCalou e colaboradores, 1995; McEldowney e Fletcher 1986; Weiss e colaboradores, 1995; van Schie & Fletcher, 1999).

As bactérias respondem rapidamente a mudanças nas condições ambientais como estratégia de sobrevivência. As respostas destas bactérias incluem adaptação à disponibilidade de nutrientes, proteção contra microrganismos que possam estar competindo pela mesma fonte de nutrientes e defesa contra compostos tóxicos potencialmente perigosos. As moléculas de “quorum sensing” ajudam a disparar e coordenar sinais contra estas mudanças. As bactérias secretam constantemente níveis baixos destas moléculas e as detectam através de receptores em suas superfícies. Porém, os receptores não disparam nenhuma mudança comportamental até que haja uma concentração bacteriana suficiente para permitir que as concentrações das moléculas excedam um ponto crítico inicial. Uma vez que isso ocorra, as bactérias respondem com a formação de biofilmes (Chicurel, 2000). Entretanto, a forma na qual estes sinais de “quorum sensing” regulam a formação do biofilme carece de esclarecimento. Diversos estudos revelaram que seus efeitos dependem das circunstâncias ambientais e variam extensamente entre as espécies.

A análise de EDS (Figura 56) realizada no cupom de 360 horas mostra que a região contendo material polimérico extracelular apresentou maiores teores de carbono e oxigênio, e menores teores de ferro em relação à região contendo produto de corrosão. Esta situação não se repetiu para o ensaio estático.

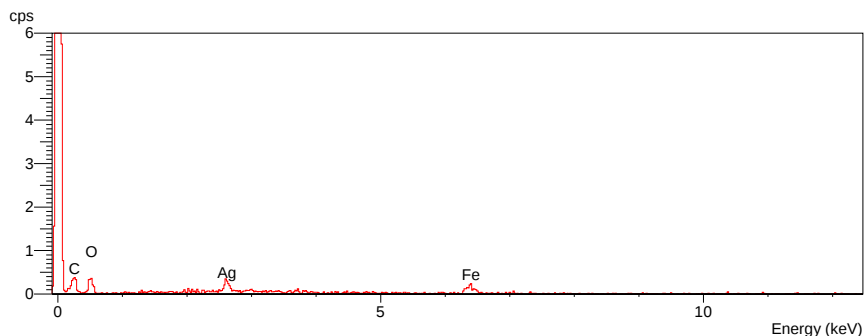


Figura 56 – EDS realizado no cupom de 360 horas.

No protocolo 3 onde foi realizada uma alteração utilizando uma pós-fixação com tetróxido de ósmio foi possível observar mais detalhe do biofilme na superfície metálica, pois o Tetróxido de ósmio protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. Essa observação não foi detectada apenas na análise de imagem mas também ao longo do processo de dessalinização e desidratação. Quando comparamos o protocolo 2 com 3, no primeiro observamos que a medida que passamos pelas etapas da bateria de dessalinização e desidratação o fluido oleoso vai sendo retirado ao longo destes, no protocolo 3 a medida que a amostra passa pelas baterias o fluido oleoso não se desprende do cupom.

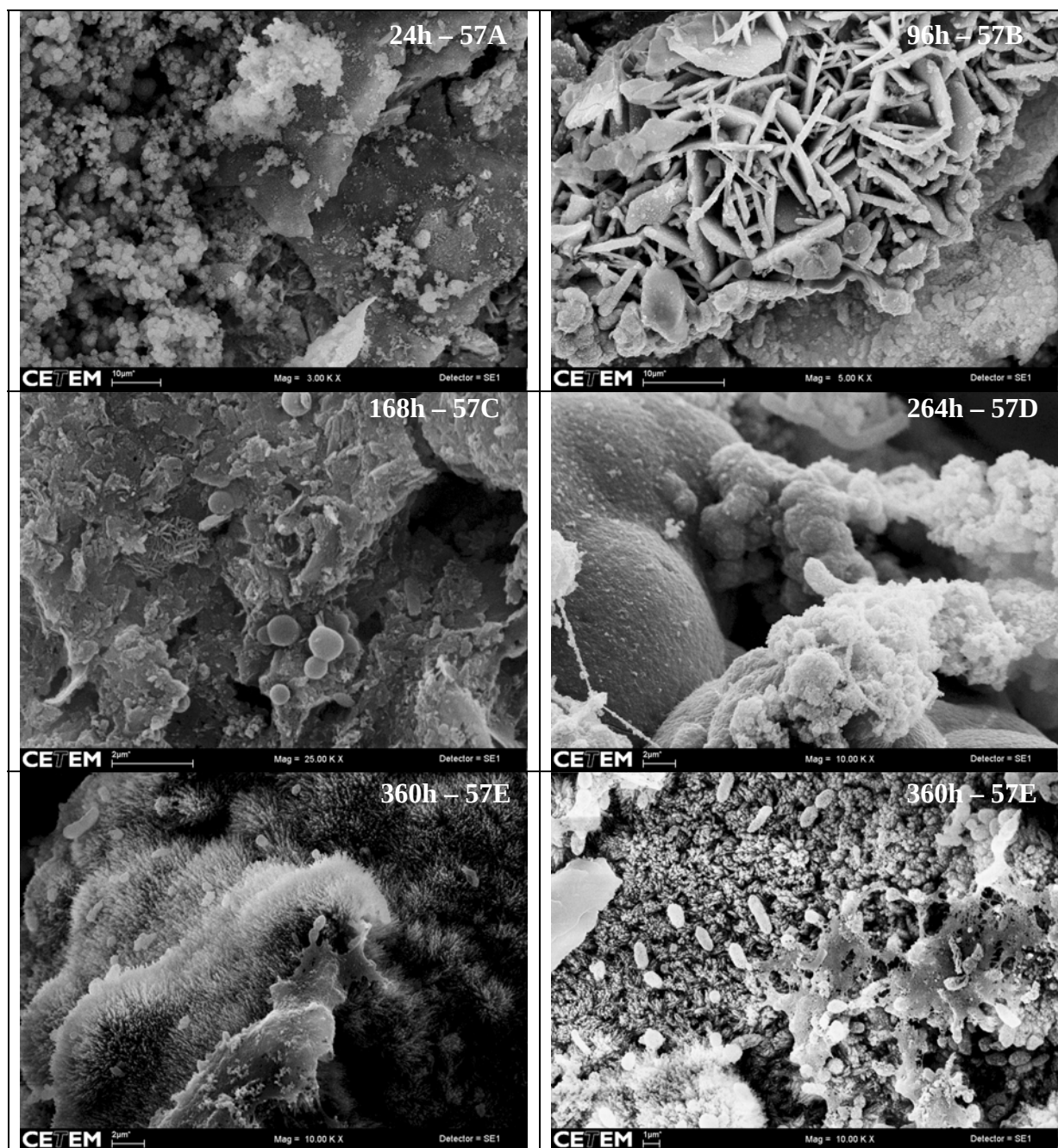
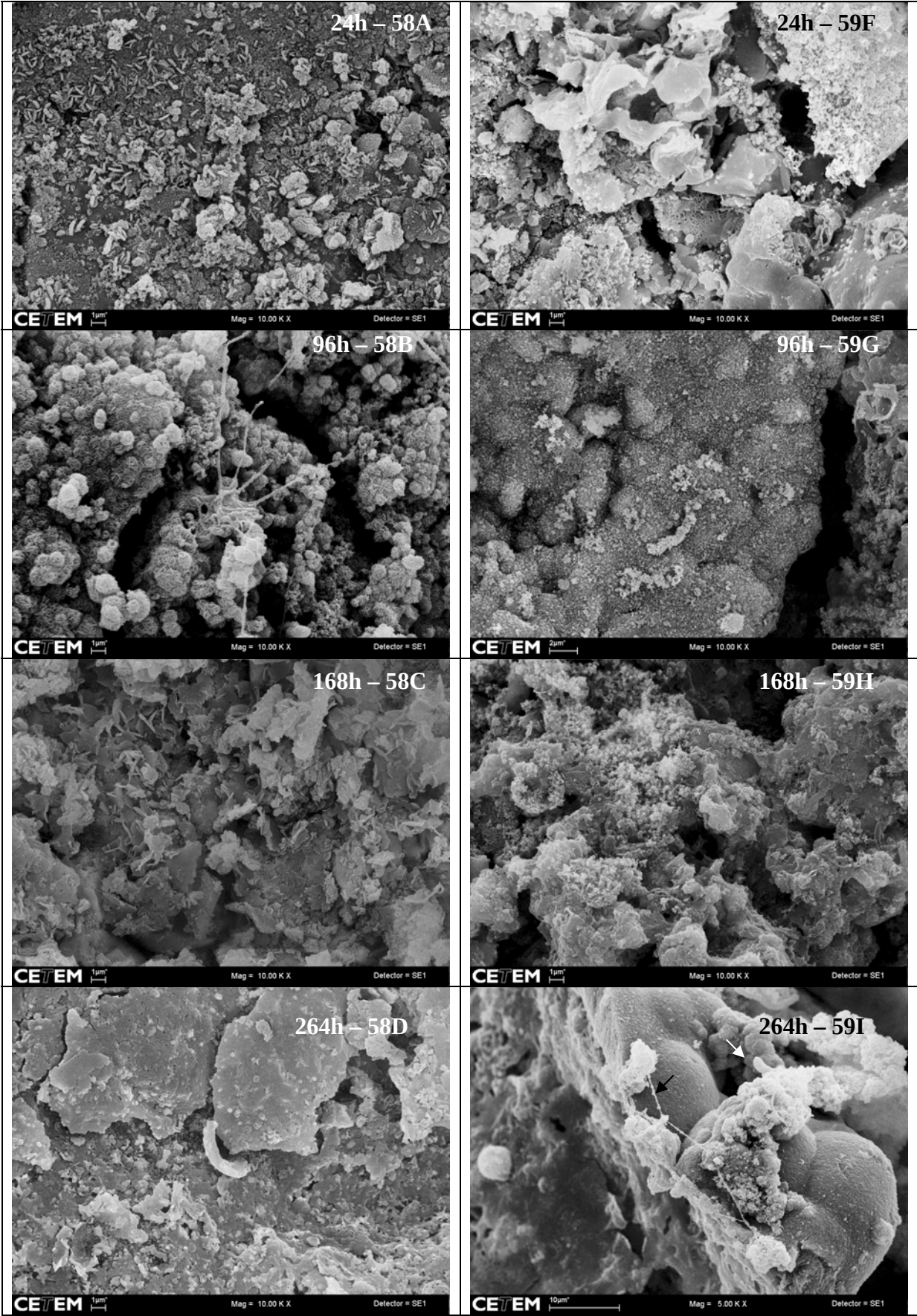


Figura 57 – Aspecto da formação do biofilme conforme o protocolo 3

O processamento das amostras com o protocolo 3 permitiu a observação de imagens com melhor definição e boa preservação do biofilme. Este fato pode ser observado na figura 58 onde as imagens a a d correspondem ao protocolo 2 e as imagens 59 de i a j correspondem ao protocolo 3.



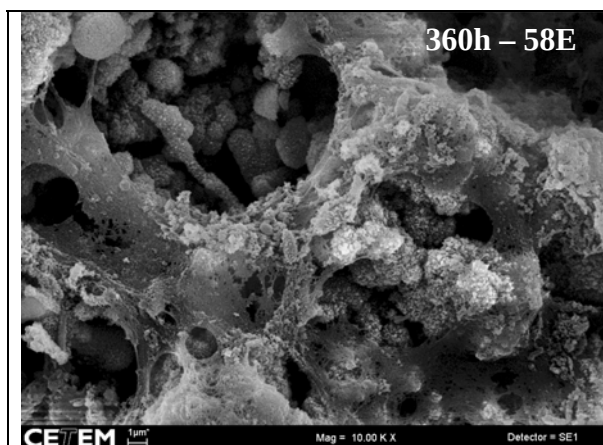


Figura 58 – Aspecto da formação do biofilme conforme o protocolo 2



Figura 59 – Aspecto da formação do biofilme conforme o protocolo 3

Ao compararmos a figura 58 D com a 59 I para 264 horas é possível observar material extracelular (seta preta) e bactéria (seta branca) quando utilizamos o protocolo 3. No caso de 360 horas com este protocolo foi possível visualizar um grande número de bactérias (Figura 59J) o que não ocorre para o protocolo 2.

A análise de EDS (Figura 60) realizada no cupom de 360 horas mostra a presença de oxigênio e ferro. A presença destes elementos podem formar o óxido de ferro.

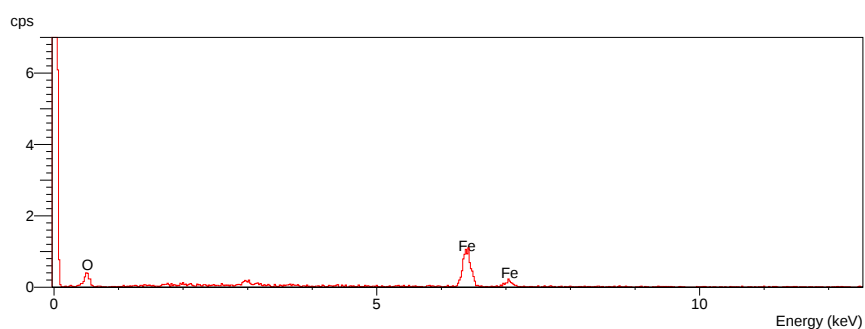


Figura 60 – EDS realizado no cupom de 360 horas.

O efeito da presença destes biofilmes na superfície metálica é a iniciação da corrosão por pites. Assim sendo, foi realizada a contagem dos pites formados nos cupons, expostos ao fluido oleoso para os mesmos períodos do monitoramento microbiológico e de imagem. A tabela 18 apresenta os resultados destas contagens.

Foram observadas diferenças, embora não significativas, ao longo dos ensaios, quanto a densidade de pites encontrados.

Os pites identificados são, na verdade, micropites com baixa densidade. A densidade de pites foi inferior ao menor índice estabelecido na norma ASTM G-01, referência de avaliação.

Tabela 18 – Densidade de pites da cinética de formação do biofilme

Tempo do experimento (hs)	Densidade dos pites nos cupons de cinética de formação do biofilme
24	3,40E+06
96	1,30E+06
168	3,00E+06
264	5,20E+06
360	5,80E+06

Analisando a figura 62 podemos observar uma pequena queda do número de pites no tempo de 96 horas de exposição. Este fato corrobora o perfil encontrado para o crescimento celular, estabelecendo a relação entre o crescimento celular (Figura 53) e a densidade de pites. Convém ressaltar que as BRS, principal grupo microbiano causador da CIM, não estavam presentes no biofilme o que possivelmente tornam a ação corrosiva menos intensa.

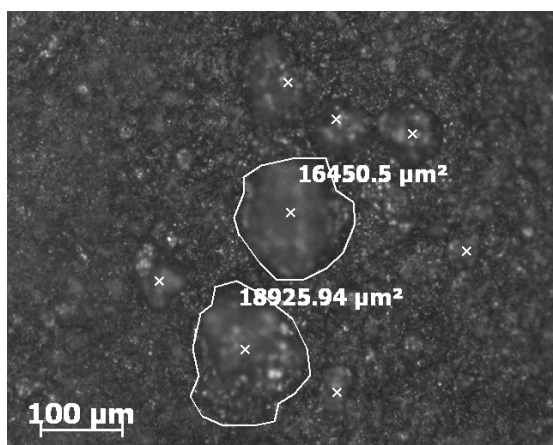


Figura 61 – imagem representativa da contagem de pites

Ainda, com relação à figura 62, podemos observar que a partir de 264 horas existe uma tendência da densidade de pites se manter constante, embora a cinética de formação do biofilme indique o aumento do número de bactérias.

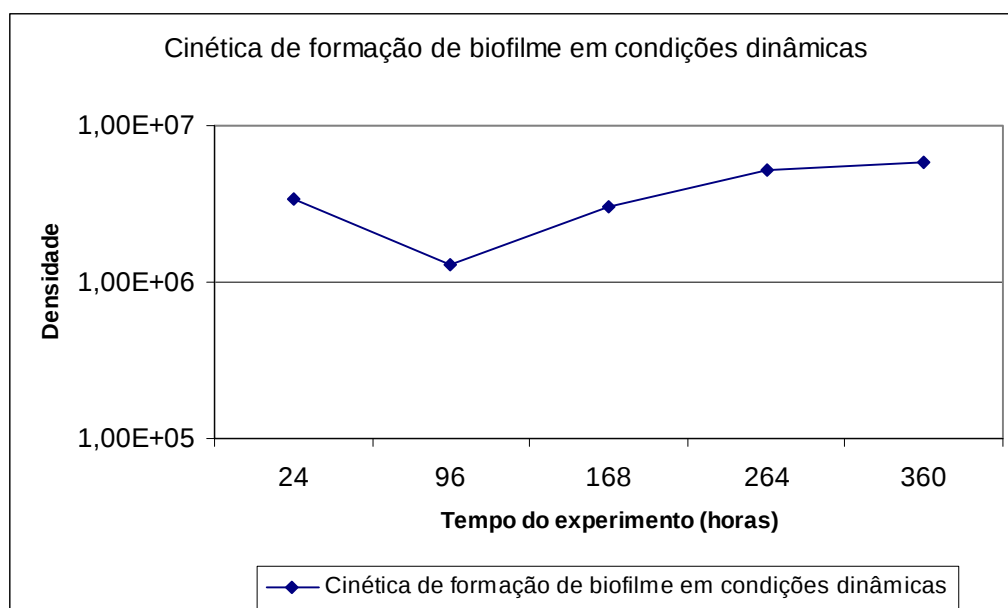


Figura 62 – Densidade de pites na cinética de formação do biofilme

5.2.2. Ensaio 2 – Influência da adição de THPS na formação do biofilme

Foi realizada a quantificação das bactérias planctônicas no início e no final do experimento, avaliando o crescimento de bactérias BANHT, BRS, BPF e BFHT.

Ao final do experimento não foi detectada a presença de BRS e o número de células cultiváveis de BANHT diminuiu uma ordem de grandeza em relação ao período anterior a adição do biocida (Tabela 19). Estes resultados demonstraram uma maior resistência do grupo das BANHT em relação as BRS. Convém ressaltar que este grupo apresenta uma maior abrangência de espécies bacterianas, quando comparado com o grupo da BRS, o que aumenta a probabilidade de existência de espécies mais resistentes a ação biocida. As figuras 63 e 64 representam graficamente os resultados obtidos.

Tabela 19 – Crescimento microbiológico de Planctônicas

Tempo de processo (horas)	BANHT	BRS
24	3,30E+03	1,1E+01
360	6,90E+02	ND

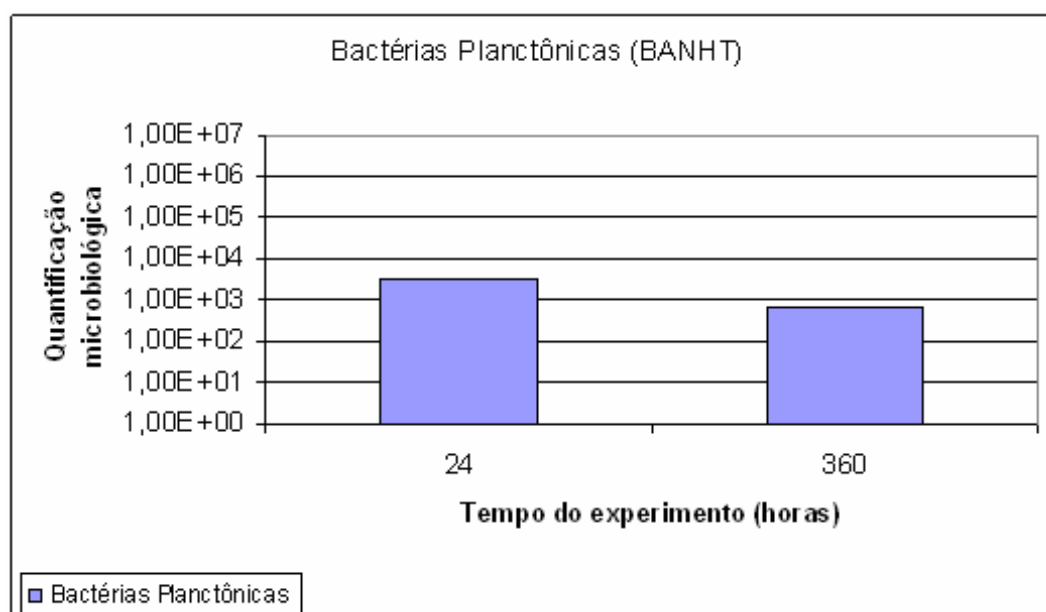


Figura 63 – Crescimento microbiológico planctônico (BANHT)

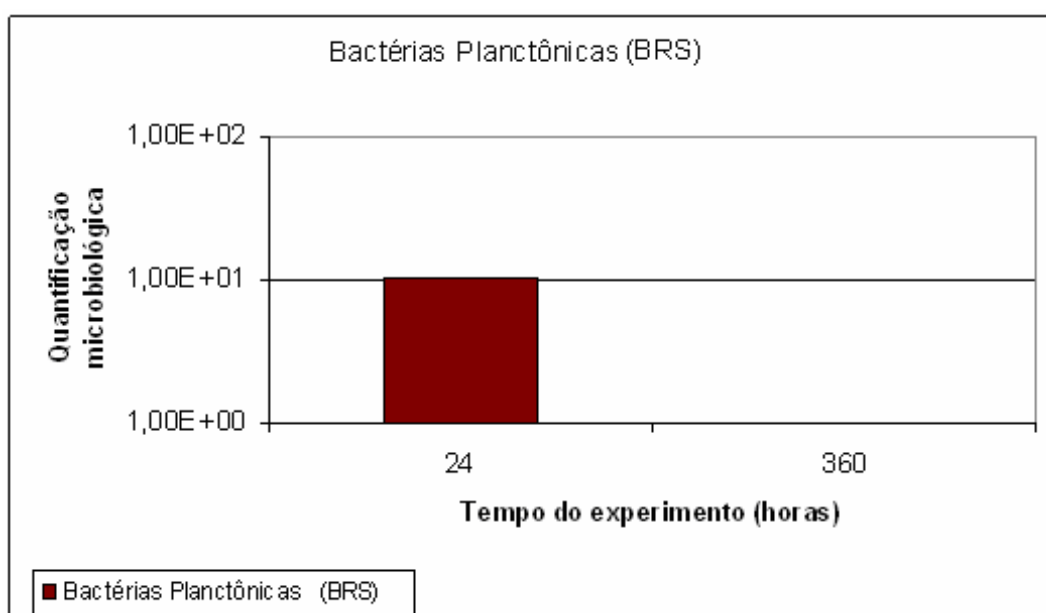


Figura 64 – Crescimento microbiológico planctônico (BRS)

Tabela 20 – Monitoramento de BANHT (sésseis)

Tempo do experimento (hs)	Influência da adição de THPS na formação de biofilme
24	2,79E+03
96	6,90E+01
168	6,30E+01
264	2,76E+01
360	2,85E+02

Os resultados obtidos (tabela 20) permitem avaliar que ocorreu, após 24 horas, uma adesão de células a superfície metálica, início da presença de bactérias sésseis. Ao longo do ensaio, ocorreu uma queda no crescimento e só após 360 horas houve um aumento do número de células viáveis, mostrando que o biocida foi mais ativo apenas 96 e 264 horas. Como reportado na literatura (Ruseska e colaboradores, (1982) uma vez formado o biofilme a ação biocida é menos efetiva devido aos diversos mecanismos de defesa realizados pelos microrganismos e a matriz extracelular. O valor mais alto no número de células viáveis no início do processo pode ser devido a não homogeneidade de distribuição do biocida adicionado ao fluido diminuindo a possibilidade de contato com os microrganismos (Figura 65).

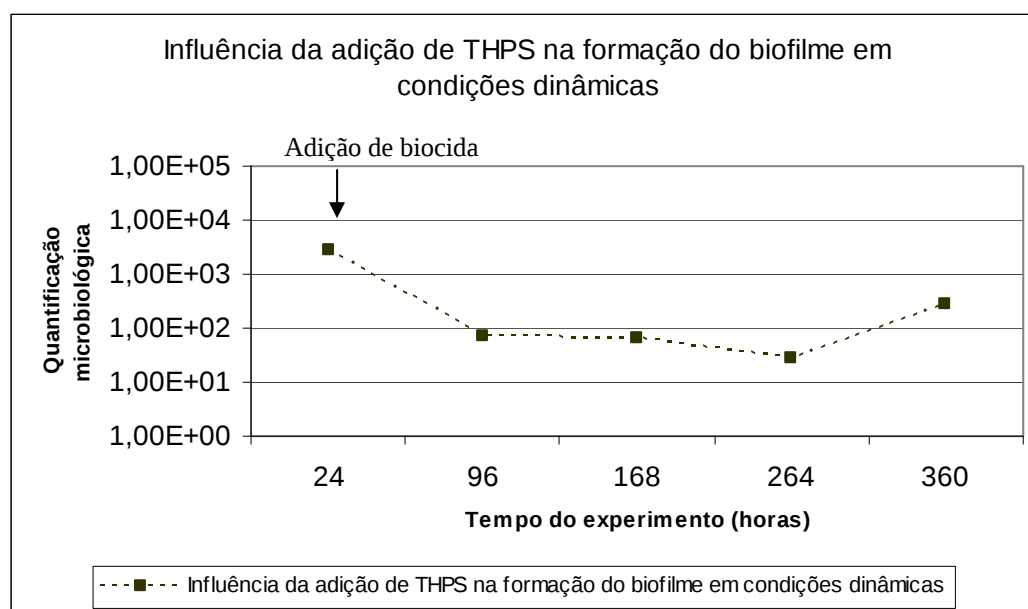
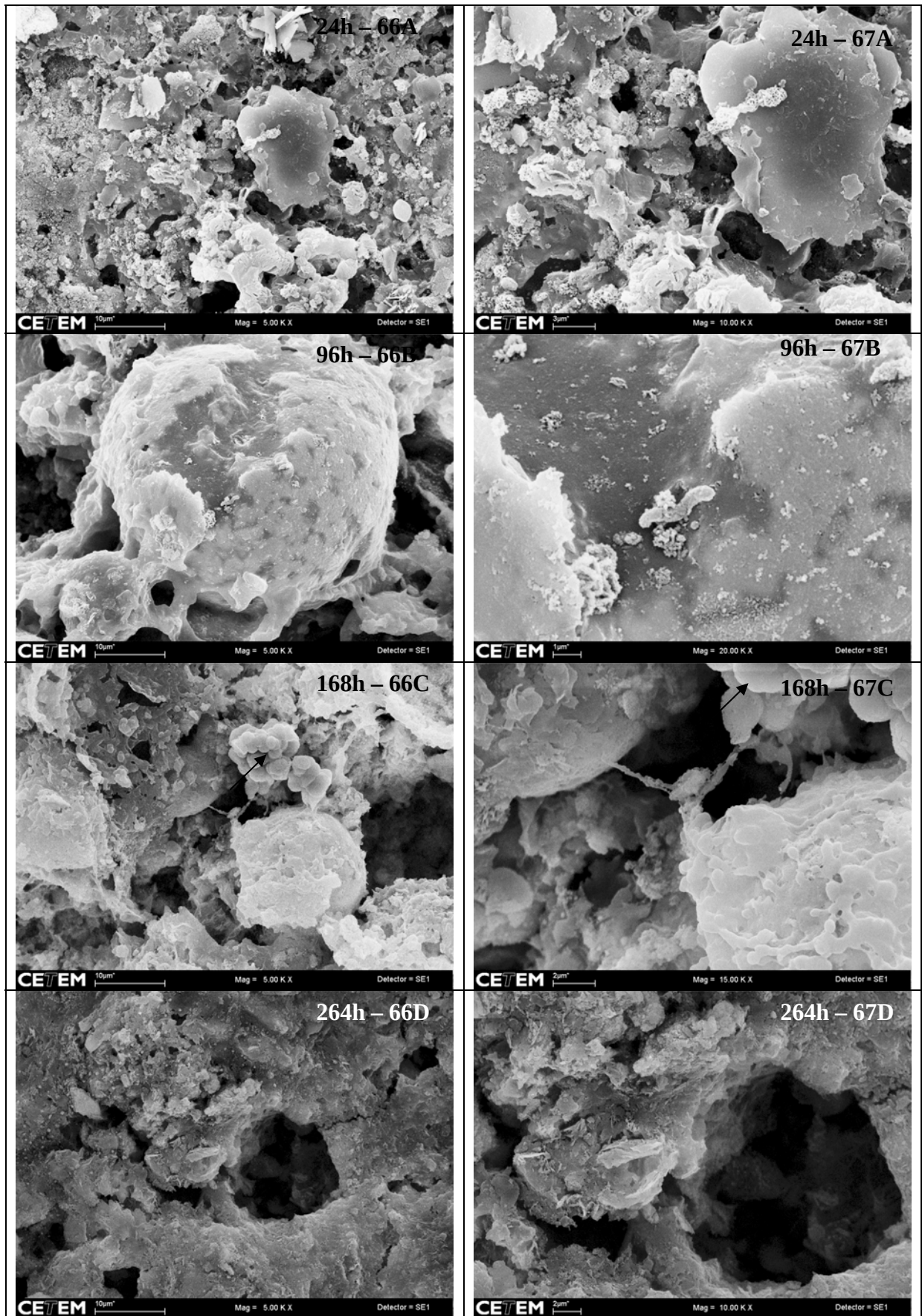


Figura 65 – Influência da adição de THPS na formação do biofilme (BANHT).

Com a adição de THPS ao sistema pode se observar através do ensaio microbiológico e da análise de imagens formação do biofilme. Na análise microbiológica é demonstrado que quando biocida é adicionado a concentração da população bacteriana decai (Figura 65) permanecendo constante até 264 horas quando começa a crescer. A análise dos biofilmes por MEV protocolo 2, mostram que após 24 horas de incubação não ocorreu formação de biofilme, apresentando uma superfície irregular contendo produto de corrosão (Figura 66 A e 67 A). Com 96 horas de incubação é detectada a presença de uma pequena quantidade de matriz extracelular e bactérias isoladas uma das outras na forma de vibrião (Figura 66 B e 67 B). Análise por

EDS (Figura 68) para os cupons de 168 horas mostram a presença de sulfeto de ferro como assinalado na figura (Figura 66 C e 67 C), um produto de corrosão. Outros produtos como óxidos, hidróxidos e carbonatos também podem estar presentes, misturado na matriz extracelular. O mesmo se sucede para 264 e 360 horas, onde apenas produto de corrosão e pouco material extracelular é observado. De um modo qual, neste ensaio, não foi possível visualizar um biofilme maduro, mas algum material polimérico e algumas bactérias soltas sem estar associadas a biofilme.

O sulfato tetrakis(hidroxi)metilfosfônio (THPS) é um sal quaternário fosfônio de cadeia curta. O THPS é considerado efetivo contra BRS planctônicas e sésseis e constitui uma nova base ativa biocida utilizado em sistemas industriais de refrigeração e sistemas de produção de petróleo. Com base em dados de toxicidade, considera-se que o THPS pode ter um efeito ambiental menos drástico do que outras bases ativas biocidas normalmente utilizados no combate aos microrganismos da CIM (Downward e colaboradores, 1997). O THPS apresenta um bom perfil ambiental em relação à citotoxicidade sobre organismos aquáticos, é prontamente biodegradado e não apresenta potencial para a ocorrência de bioacumulação.



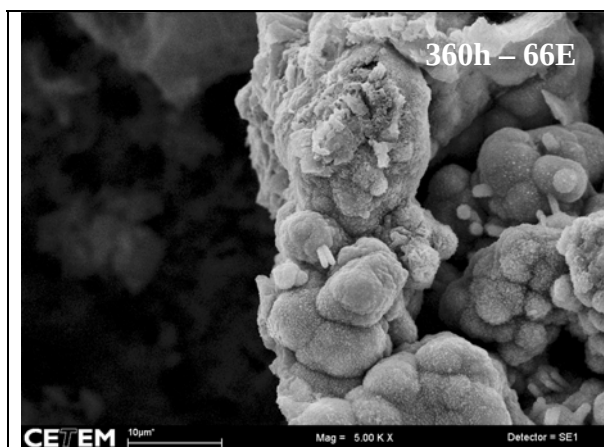


Figura 66 – cinética da formação do biofilme com adição de THPS em condições dinâmicas

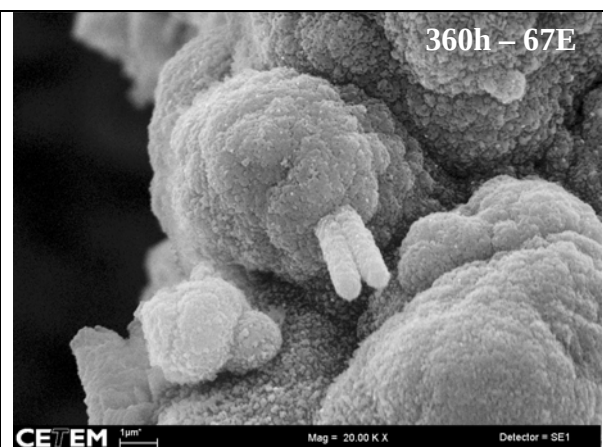


Figura 67 – cinética da formação do biofilme com adição de THPS em condições dinâmicas

Neste ensaio a presença de bactérias, foi observado a presença de enxofre por análise de EDS. Este fato mostra que o enxofre não garantiu a presença de BRS neste sistema.

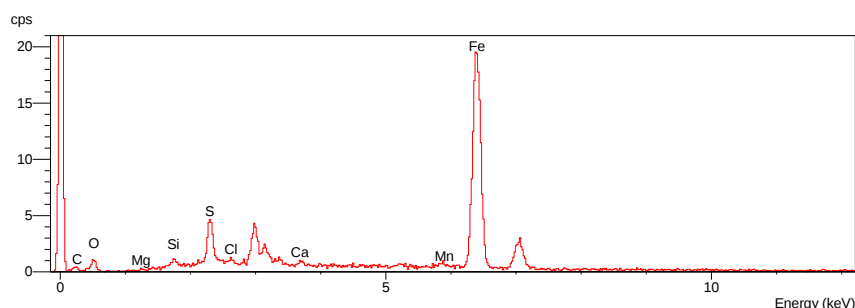


Figura 68 – Análise de EDS para 168 horas (Figura 66 C e 67 C)

De forma análoga ao ensaio anterior, sem THPS, foram realizadas as medidas de densidade de pites sobre a superfície metálica, conforme a norma ASTM G-01. A tabela 21 apresenta os valores encontrados para a densidade.

Tabela 21 – Densidade de pites nos cupons com adição de THPS

Tempo do processo (hs)	Densidade dos pites nos cupons para avaliação da adição de THPS na formação de biofilme
24	5,50E+06
96	4,50E+04
168	5,00E+05
264	4,50E+04
360	5,00E+06

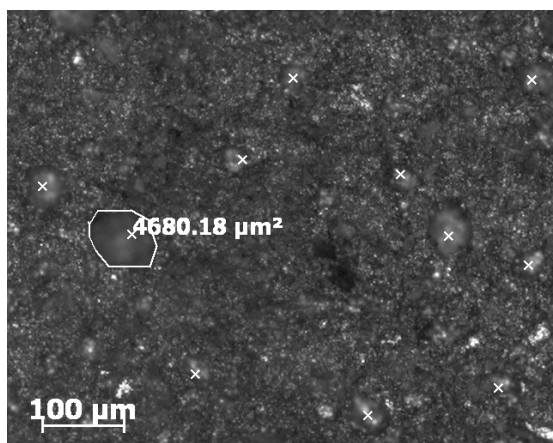


Figura 69 – Imagem representativa da contagem de pites aumento de 10X

Como pode ser observado na figura 70, após a adição de biocida ao sistema, a densidade de pites segue o mesmo perfil da figura 65 (microbiológico). É interessante observar que ocorre uma associação entre o crescimento biológico e a formação de pites, embora pequenos.

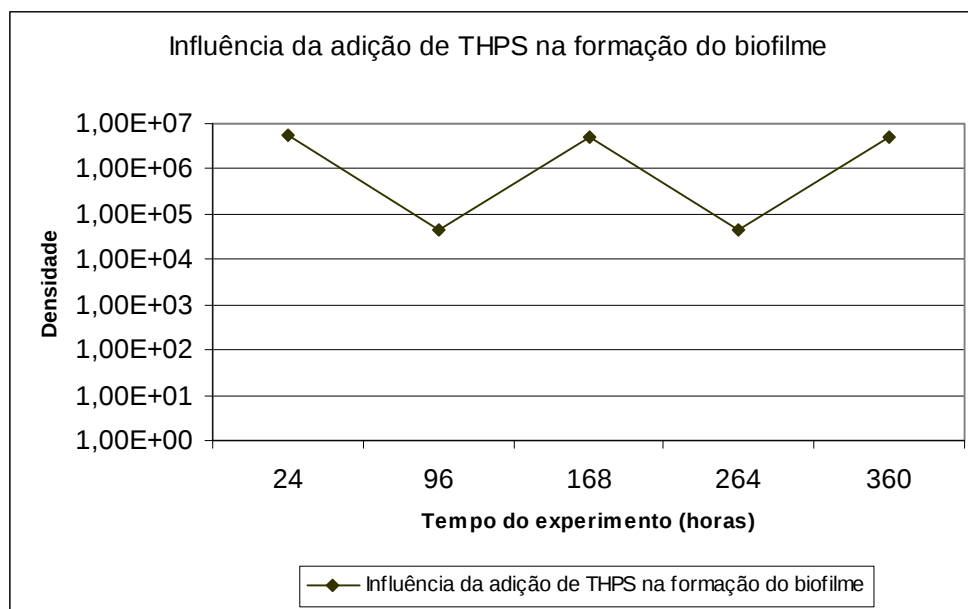


Figura 70 – Densidade de pites no cupom para avaliação da adição de THPS na formação do biofilme

5.2.3. Ensaio 3 – Influência da adição de THPS sobre o biofilme já formado

Os resultados obtidos para crescimento microbiológico das bactérias planctônicas foram iguais ao do ensaio 2, pois o fluido oleoso foi o mesmo, conforme apresentado na tabela 21 e figuras 63 e 64.

Tabela 22 – Monitoramento de BANHT (sésseis)

Tempo do experimento (hs)	Influência da adição de THPS sobre o biofilme já formado
24	2,79E+02
96	6,90E+01
168	1,05E+01
264	1,29E+02
360	2,79E+02

A tabela 22 e a figura 71 apresentam a influência da avaliação do agente biocida sobre o biofilme pré-formado há 360 horas. Observa-se um perfil semelhante com os resultados apresentados na figura 65. A ação biocida tem um máximo de efetividade com 168 horas de processo, sendo observado após este período um aumento do número de células cultiváveis.

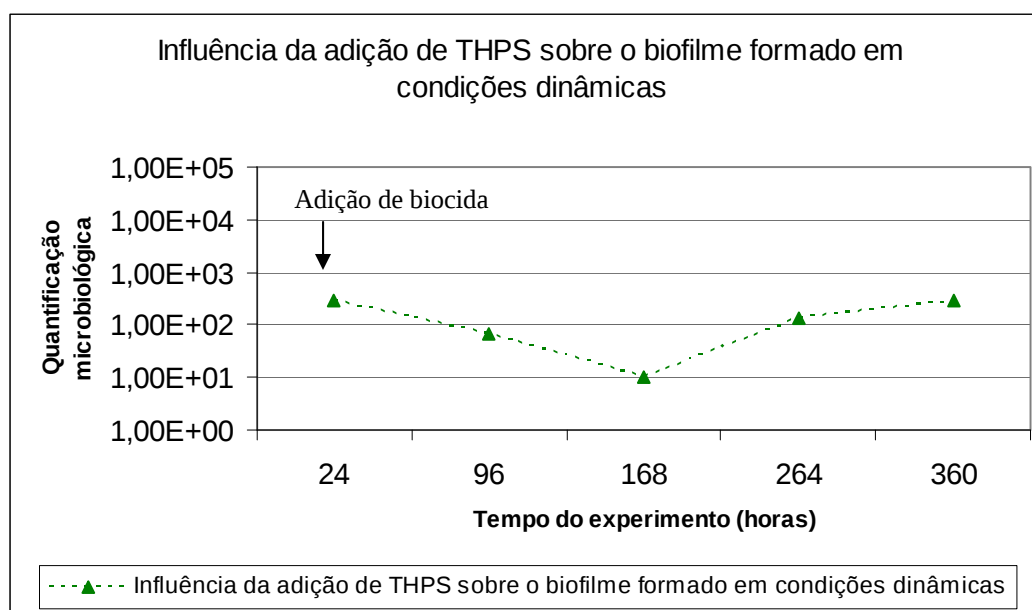
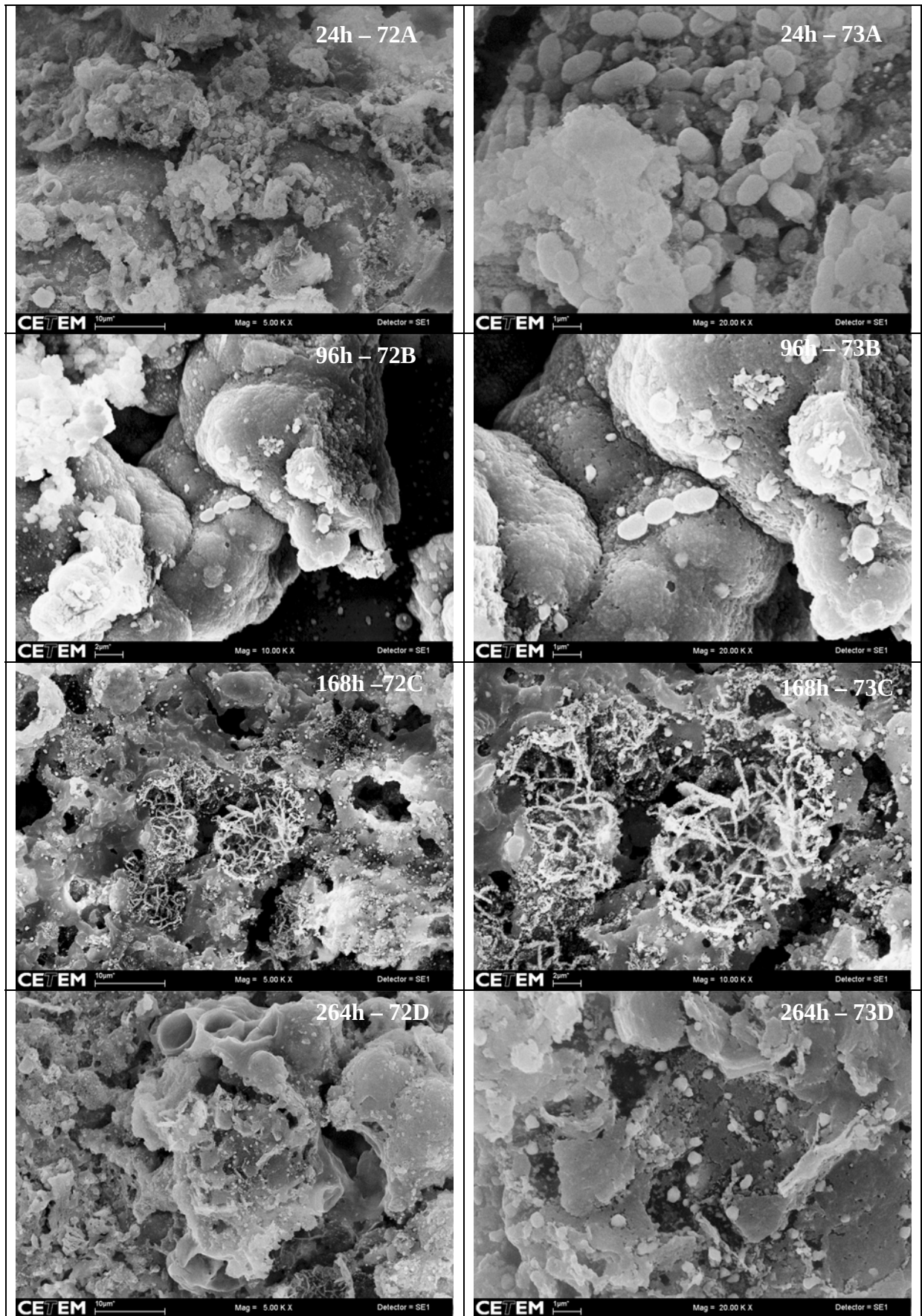


Figura 71 – Influencia da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas (BANHT)

A ação biocida sobre o biofilme pré-formado há 360 horas, observada por MEV revela inicialmente (24 horas) material polimérico e bactérias de formato arredondado cocos (BANHT) (Figura 72 A e 73 A), observa-se estas bactérias não se apresentam na forma de vibrio e sim de formas arredondas. Com 96 horas de exposição após a adição de biocida ao sistema analisamos uma redução de material polimérico e das bactérias. No tempo de 168 horas só observamos muito produto de corrosão (Figura 72 C e 73 C) e a partir deste tempo apesar da análise microbiológica apresentar crescimento biológico não foi encontrado bactérias no cupom com o protocolo de preparo de amostra realizado (Figura 72 D e E e Figura 73 D e E).



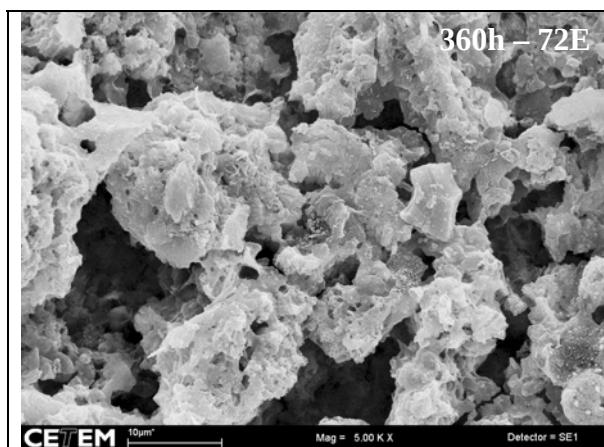


Figura 72 – Cinética da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas.

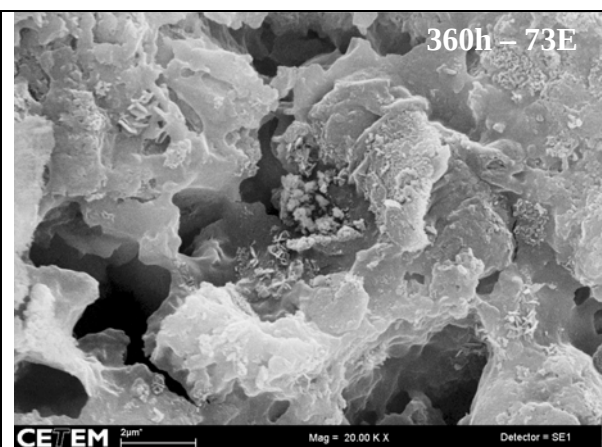


Figura 73 – Cinética da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas.

Os produtos da corrosão microbiológica são resultantes da interação direta ou indireta das bactérias com o substrato e à medida em que vão sendo formados passam a fazer parte do biofilme, juntamente com elementos da matriz polimérica e as bactérias. O principal produto de corrosão é o sulfeto de ferro, esse pode se apresentar com diferentes formas dependendo da relação estequiométrica entre o ferro e o enxofre e de acordo com seu grau de cristalização ou mecanismo de síntese (Rickard, 1969). Nas análises por MEV e de EDS foi encontrado este composto em seu estado totalmente amorfo. O sulfeto amorfo é encontrado com bastante frequência, anterior e posteriormente à adesão bacteriana, recobrando a superfície do cupom ou circundando as bactérias, uma forma muito encontrada foi em estruturas agulhadas (Figura 72 C e 73 C) que caracterizada uma organização cristalina avançada do sulfeto de ferro.

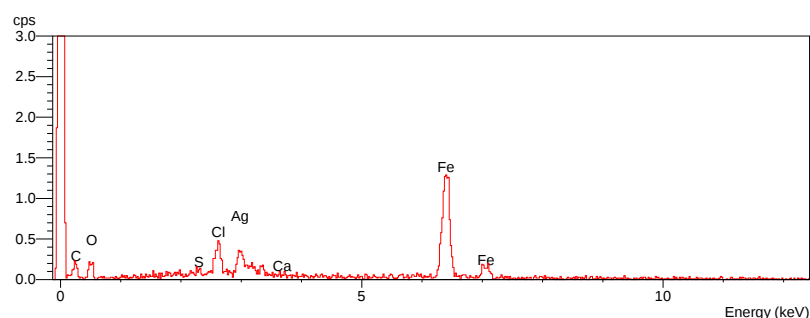


Figura 74 – Análise de EDS para 168 horas obtidas das regiões mostradas nas figuras 72C e 73C.

De modo análogo aos ensaios anteriores, foi realizada a medida de densidade de pites sobre a superfície metálica seguindo a norma ASTM G-01. Na tabela 23 estão os valores encontrados para a densidade.

Tabela 23 – Densidade de pites nos cupons com adição de THPS sobre o biofilme formado

Tempo do processo (hs)	Densidade dos pites na influência da adição de THPS sobre o biofilme formado
24	3,30E+06
96	2,60E+06
168	1,40E+06
264	3,40E+06
360	4,40E+06

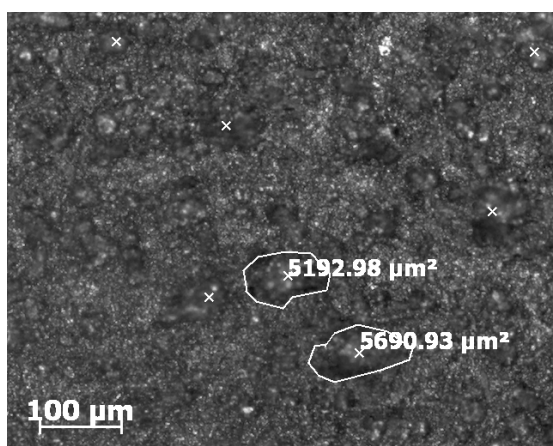


Figura 75 – Imagem representativa da contagem de pites

Como podemos observar na figura 76, após a adição de biocida ao sistema, a densidade de pites segue o mesmo perfil da figura 71 (microbiológico). Induzindo a conclusão que o crescimento biológico e a formação de pites estão associados.

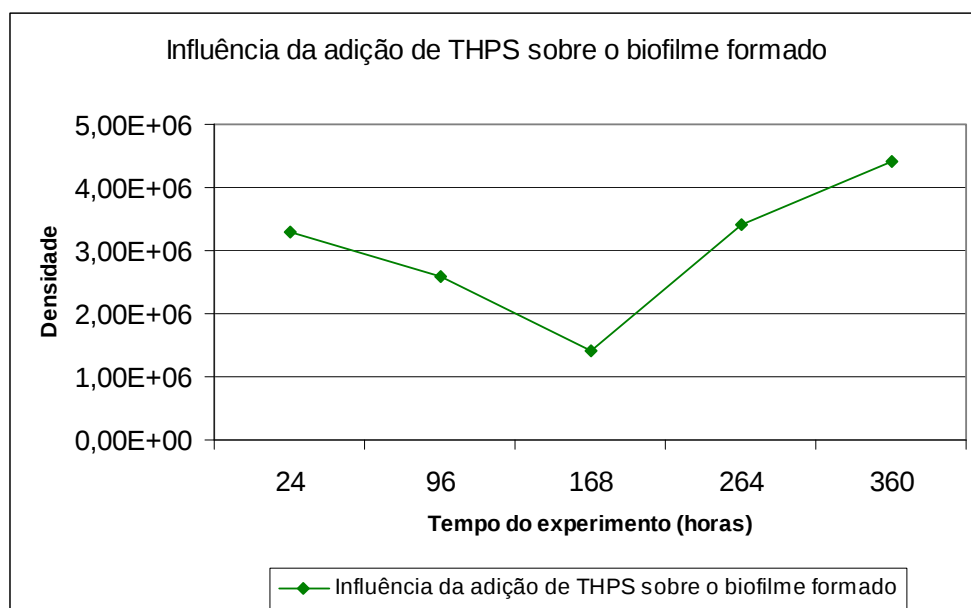


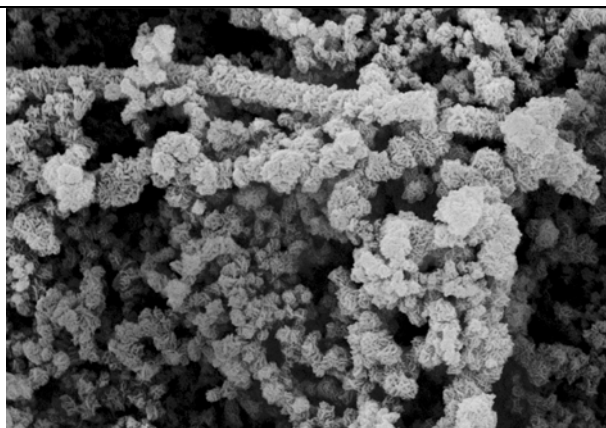
Figura 76 – Densidade de pites em avaliação da influencia de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas.

5.3. Anexo I apresenta as imagens significativas (obtidas por MEV) para cada ensaio realizado.

Imagens representativas de cada ensaio do sistema dinâmico realizado.

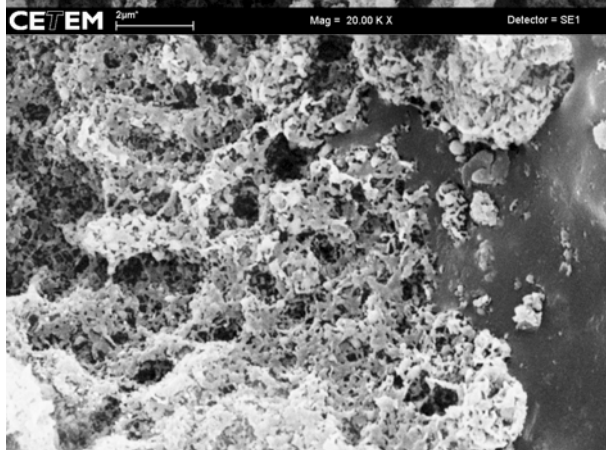
Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas – tempo 24horas.

Imagem mostra superfície irregular com produto de corrosão. Início da formação do biofilme.



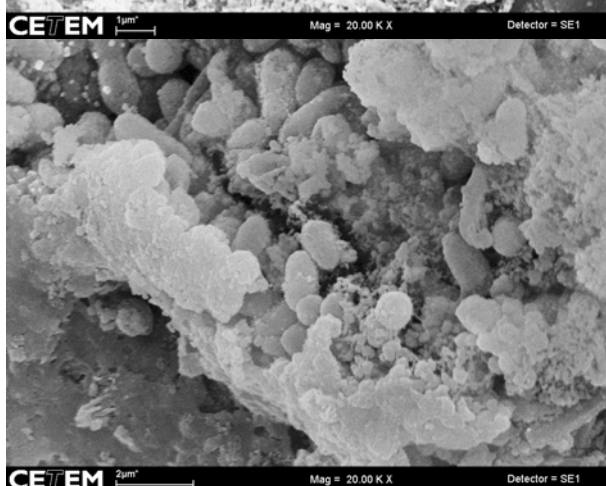
Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições dinâmicas – Tempo de 24 horas

Imagem apresenta formação de material polimérico, porém apresenta espaço descoberto.



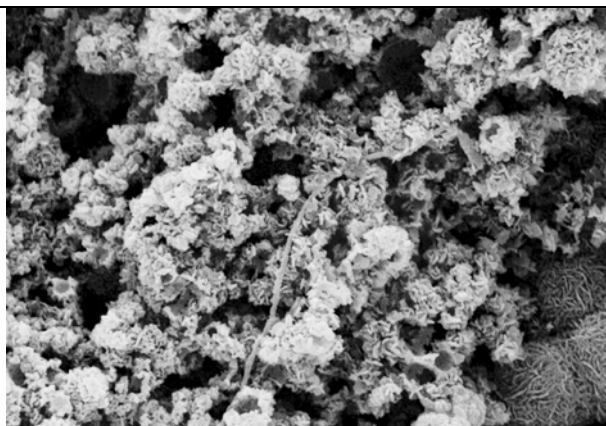
Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas – Tempo de 24 horas

Imagem com material polimérico e muitas populações de bactérias.



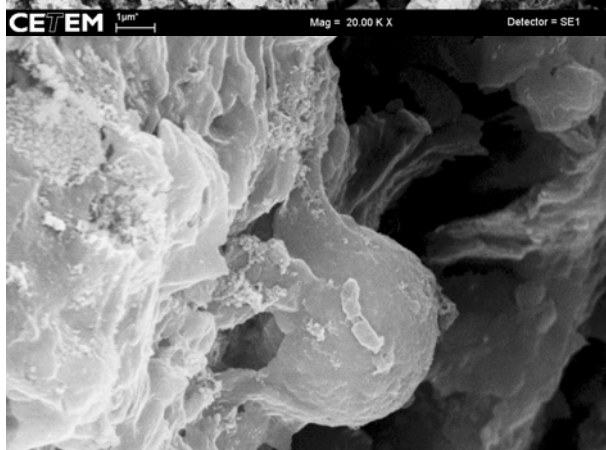
Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas – tempo 96 horas.

Imagem com pouco material polimérico e muito produto de corrosão como sulfeto de ferro amorfo.



Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições dinâmicas – Tempo de 96 horas.

Imagem representando muito pouco material polimérico e pouca quantidade de bactéria.



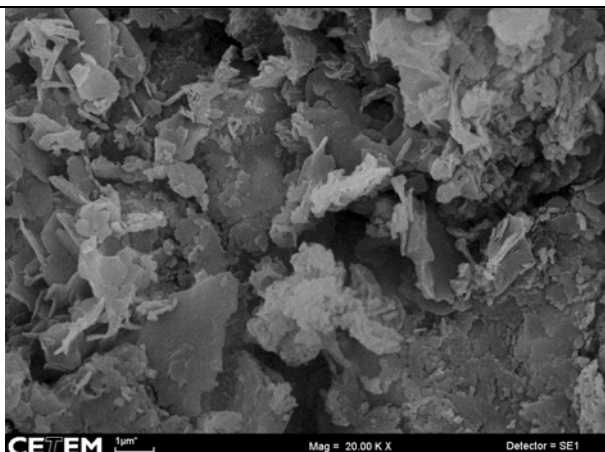
Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas – Tempo de 96 horas

Imagem representando muito pouco material polimérico e pouca quantidade de bactéria.



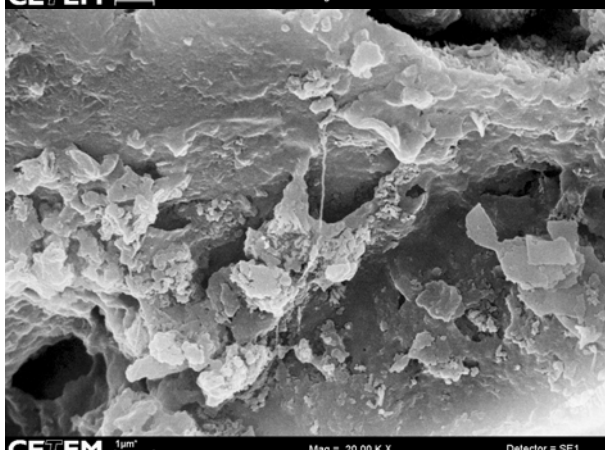
Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas – tempo 168 horas.

Imagem com muito produto de corrosão.



Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições dinâmicas – Tempo de 168 horas

Imagem com produto de corrosão, pouco material polimérico e buracos.



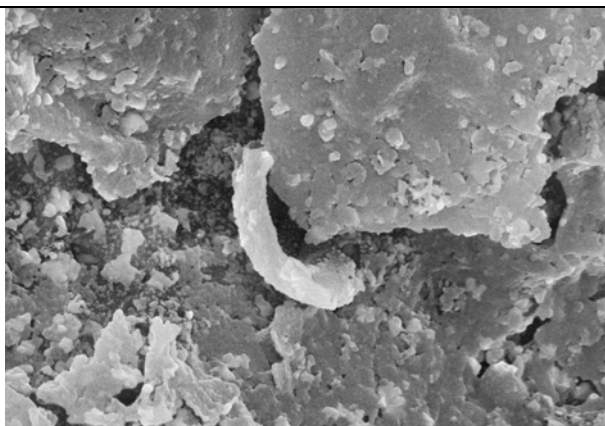
Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas – Tempo de 168 horas

Imagem com produto de corrosão. Sulfeto de ferro.



Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas – tempo 264 horas.

Imagem com superfície do cupom sem material polimérico e sem bactéria.



CETEM 1µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições dinâmicas – Tempo de 264 horas.

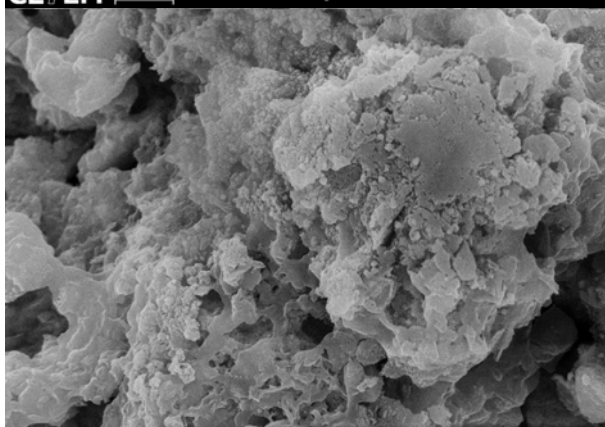
Imagem com cupom mostrando produto de corrosão ao fundo e material polimérico na frente.



CETEM 3µm Mag = 10.00 K X Detector = SE1

Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas – Tempo de 264 horas.

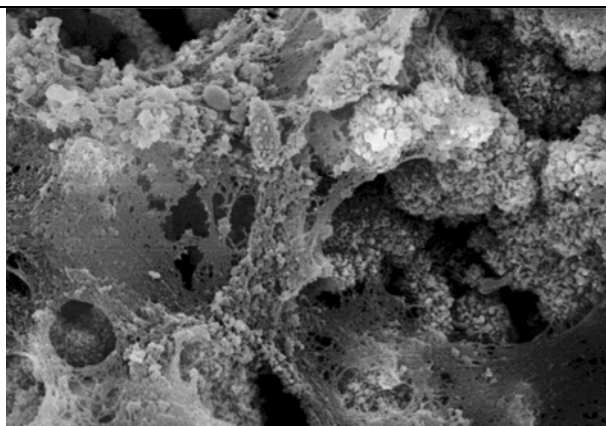
Imagem mostrando produto de corrosão distribuído de forma irregular na superfície.



CETEM 2µm Mag = 10.00 K X Detector = SE1

Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas – tempo 360 horas.

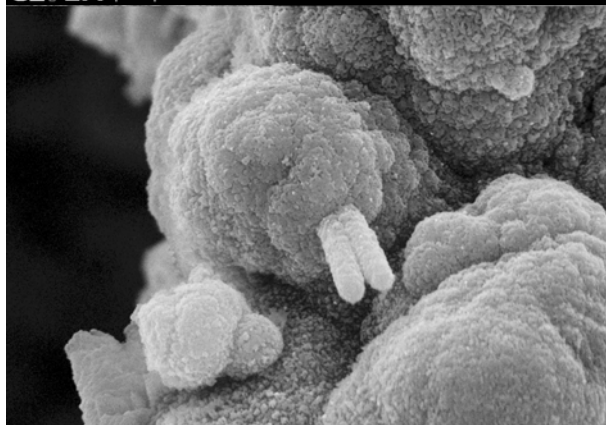
Imagem com biofilme maduro, muito material polimérico e bactérias.



CETEM 1µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições dinâmicas – Tempo de 360 horas.

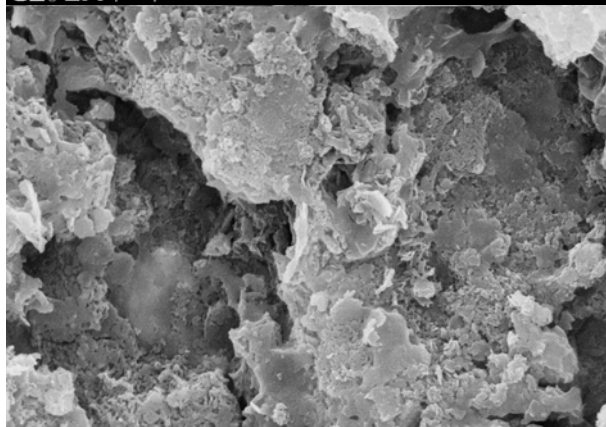
Imagem com produto de corrosão e bactéria envolta por sulfeto de ferro amorfo.



CETEM 1µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas – Tempo de 360 horas

Imagem com produto de corrosão, não foi encontrado biofilme.



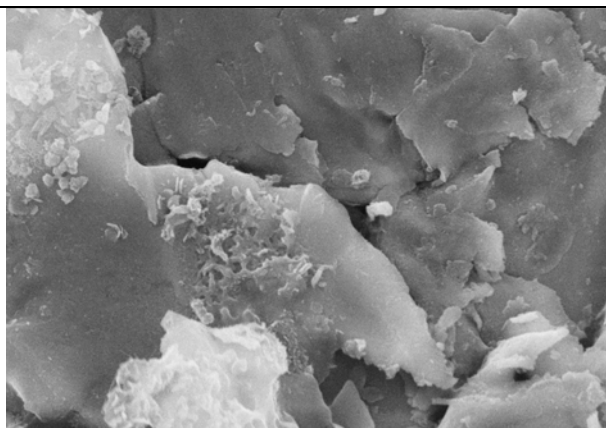
CETEM 1µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

5.4. Anexo II apresenta as imagens significativas (obtidas por MEV) para cada ensaio realizado.

Imagem representativas de cada ensaio do sistema estático.

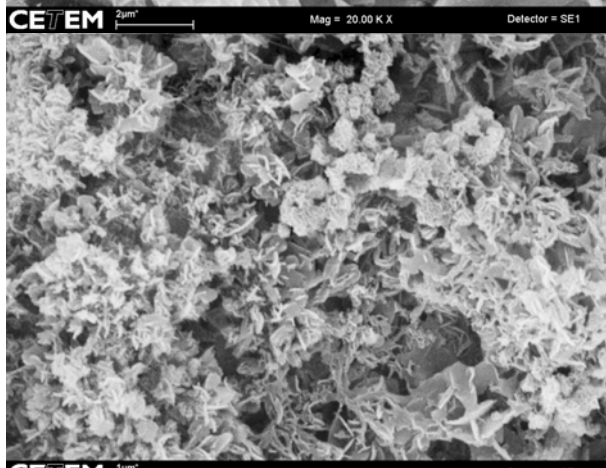
Cinética de formação de biofilme em condições estáticas – tempo 24 horas

Cupom com superfície irregular e com áreas muito vazias com pouco produto de corrosão, não foi encontrado população bacteriana e matriz extracelular.



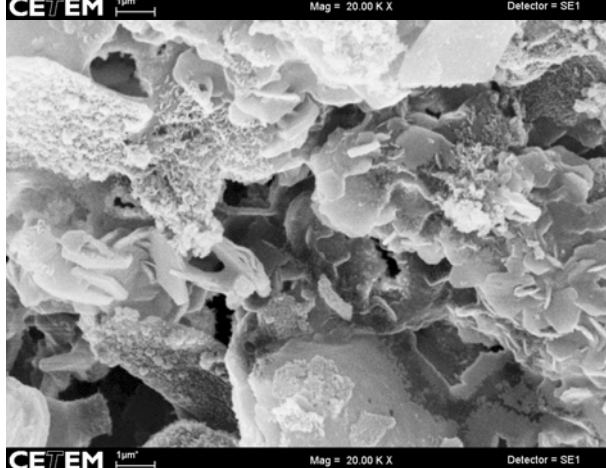
Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas – Tempo de 24 horas

Cupom com muito produto de corrosão característico do sulfeto de ferro.



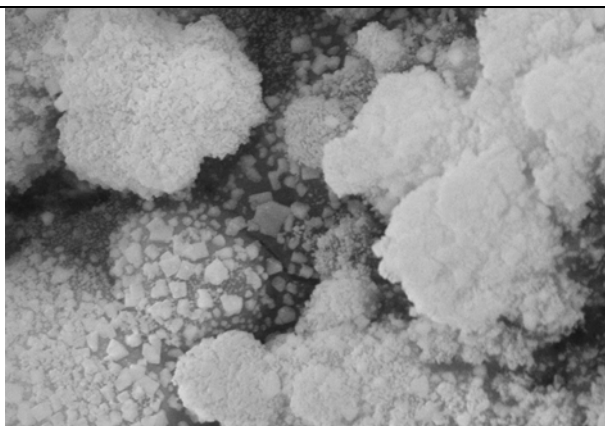
Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas – Tempo de 24 horas

Cupom com produto de corrosão em menor quantidade que no cupom de formação de biofilme (acima)



Cinética de formação de biofilme em condições estáticas – tempo 96 horas

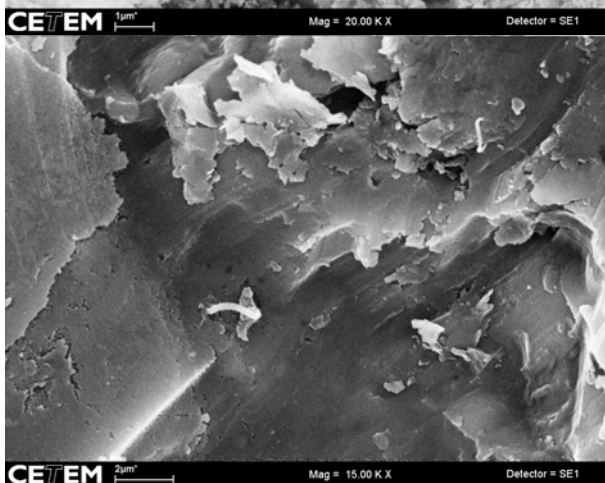
Cupom apresentando a superfície com muito produto de corrosão.

**Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas – Tempo de 96 horas**

Superfície do cupom com muito produto de corrosão em forma de espícula característico do sulfeto de ferro

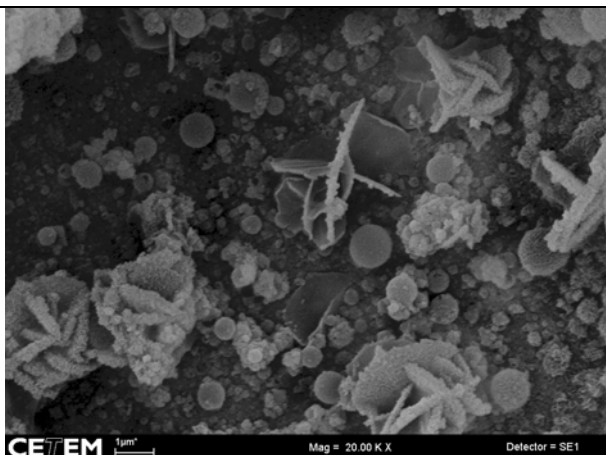
**Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas – Tempo de 96 horas**

Cupom com superfície lise, quase não se observa produto de corrosão e material extracelular e bactérias são vistas de forma isolada

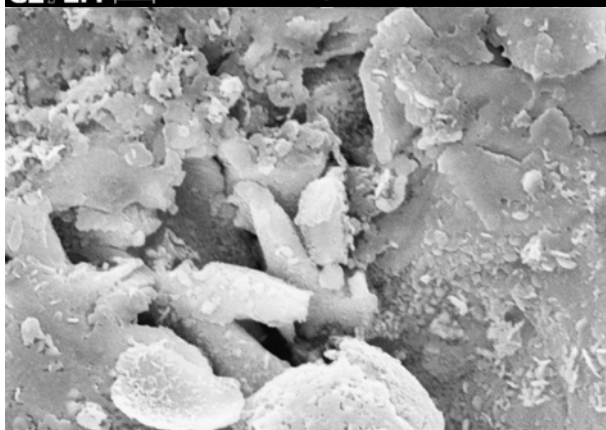


Cinética de formação de biofilme em condições estáticas – tempo 168 horas.

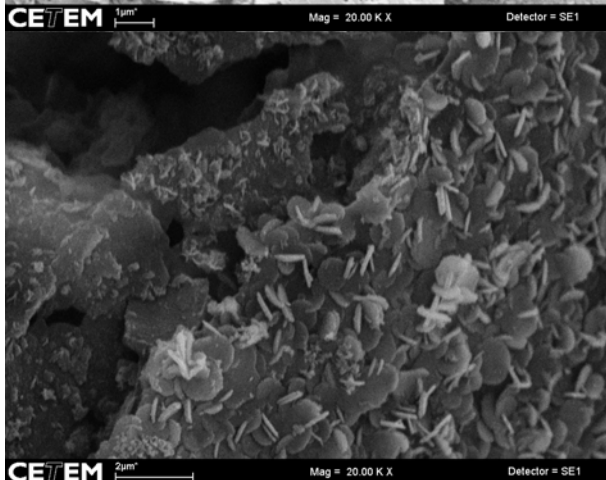
Cupom com muito produto de corrosão na forma de espícula e sulfeto amorfo (forma arredondada)

**Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas – Tempo de 168 horas**

Cupom com superfície irregular com produto de corrosão.

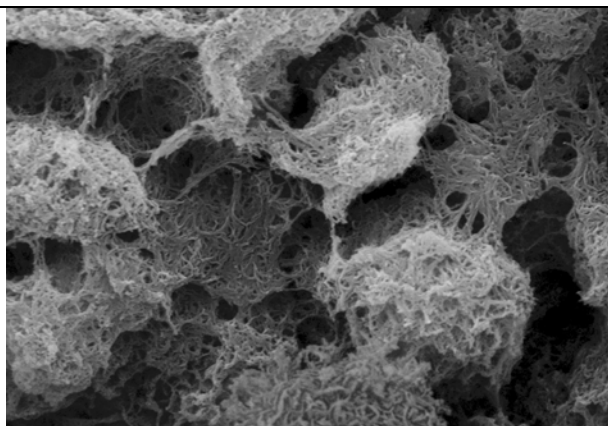
**Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas – Tempo de 168 horas**

Cupom com superfície repleta de produto de corrosão.



Cinética de formação de biofilme em condições estáticas – tempo 264horas

Cupom sem observação de bactéria, mas com presença de material polimérico.



CETEM 1µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas – Tempo de 264 horas

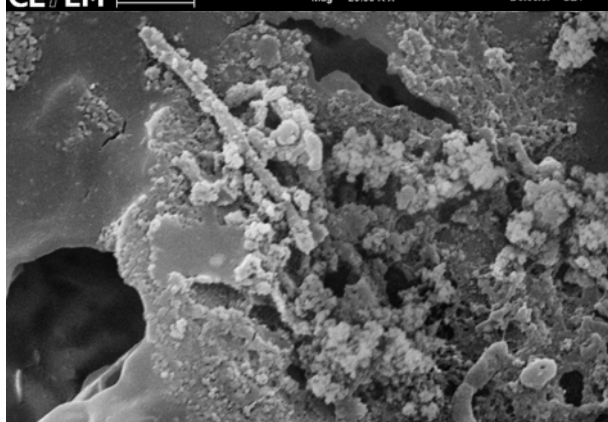
Cupom apresentando produto de corrosão característico do sulfeto de ferro depositado na superfície das bactérias .



CETEM 2µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas – Tempo de 264 horas

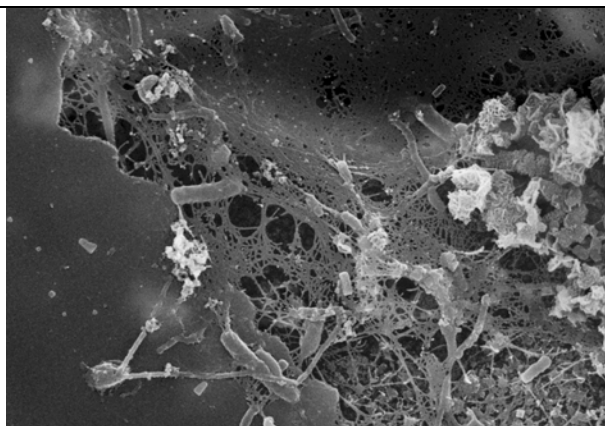
Cupom apresenta a presença de bactérias sem a formação de um biofilme maduro.



CETEM 2µm Mag = 20.00 K X Detector = SE1

Cinética de formação de biofilme em condições estáticas – tempo 360 horas.

Presença de biofilme maduro



Influência da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas – Tempo de 360 horas

Cupom com produto de corrosão e neste cupom não foi encontrado população bacteriana.



Influência da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas – Tempo de 360 horas

Cupom mostrando produto de corrosão como sulfeto de ferro sobre a superfície da bactéria.

