

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DO RIO DE JANEIRO



**Karla de Avellar Mota**

**Microscopia de biofilmes em substrato metálico formado em sistemas estático e dinâmico na presença de fluido oleoso**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos da PUC-Rio como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Ivani de Souza Bott  
Co-orientador: Walter Barreiro Cravo Junior

Rio de Janeiro  
Abril de 2009



**Karla de Avellar Mota**

**Microscopia de biofilmes em substrato metálico formado em sistemas estático e dinâmico na presença de fluido oleoso**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos da PUC-Rio como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof<sup>a</sup>. Ivani de Souza Bott**

Orientadora

Departamento de Engenharia dos Materiais – PUC-Rio

**Prof. Walter Barreiro Cravo Junior**

Co-orientador

Departamento de Engenharia dos Materiais – PUC-Rio

**Prof. Sidnei Pacionik**

Departamento de Engenharia dos Materiais – PUC-Rio

**Flávia Maciel Fernandes Guedes**

Petrobras

**Márcia Teresa S. Lutterbach**

INT

**Prof. José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico – PUC- Rio

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2009

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

## **Karla de Avellar Mota**

Graduou-se em Biologia (Licenciatura e Bacharelado) na Faculdade Técnico Educacional Souza Marques em 2003. Possui Especialização em Educação Ambiental pela Universidade Gama Filho. Trabalho na PUC-Rio no Laboratório de Biocorrosão, onde desenvolve pesquisa na área de Biocorrosão.

## **Ficha Catalográfica**

Mota, Karla Avellar

Microscopia de biofilmes em substrato metálico formado em sistemas estático e dinâmico na presença de fluido oleoso/ Karla de Avellar Mota; orientadora: Ivani de Souza Bott; co-orientador: Walter Barreiro Cravo Junior – Rio de Janeiro: PUC, Departamento de Materiais, 2009.

128 f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Materiais.

Inclui referências bibliográficas.

1. Materiais – Teses. 2. Biocida. 3. Biofilme. 4. Bactérias redutoras de sulfato. 5. Microscopia eletrônica de varredura. 6. Água de injeção. 7. Sulfato de tetra-hidroximetil-fosfônico (THPS). I. Bott, Ivani de Souza. II. Junior, Walter Barreiro Cravo. III PONTIFÍCIA Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Materiais. IV. Título.

CDD: 620.11

Para meus pais, irmãos, avó, tia e meu querido noivo Jeronimo, pelo amor, carinho e paciência ao longo desta caminhada.

## Agradecimentos

A Jesus Cristo que está presente em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Professora Ivani de Souza Bott pelo estímulo e parceria para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Walter Barreiro Cravo Junior que me ajudou muito na parte técnica e profissional ao longo desta jornada.

A Petrobras pelos auxílios concedidos, de diferentes formas, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Ao meu noivo (prestes a ser promovido a esposo!), Jeronimo, por todo o seu amor, cumplicidade, apoio, conselhos, paciência e amizade. Obrigada, meu amor, por me entender nestes dias que tivemos que renunciar alguns de nossos momentos para que eu pudesse concluir este trabalho. Obrigada por sempre acreditar que eu posso ir mais além e por tentar me convencer disso quando me encontro desanimada.

Aos meus irmãos, Luiz Américo e Renata, pois são além de irmãos meus grandes amigos.

Aos meus pais, Antonio e Fátima, que foram meus pilares morais.

A minha avó Neuza e a minha tia Rosa, pois sempre estiveram ao meu lado me apoiando nesta caminhada.

Aos meus colegas da PUC-Rio, em especial Danielle, Thaís, Saulo, Renato, Lucas, Mayara e Bianca; que me agüentaram ao longo deste trabalho; equipe do laboratório de biocorrosão do DCMM.

Aos professores que participaram da Comissão examinadora.

Aos técnicos da FIOCRUZ Luciano, Genésio, José, Rômulo e Levi por terem me ajudado sempre que precisei e pelo carinho que sempre me trataram.

A professora Márcia Attias e a técnica Noemia por me tirarem do sufoco toda vez que precisava usar o ponto crítico.

Ao Eng. Otávio F. M. Gomes e ao Geólogo Rheiner do CETEM pelo treinamento e pela confiança em mim para operar o MEV.

## Resumo

Mota, Karla de Avellar; Bott, Ivani de Souza; Junior, Walter Barreiro Cravo. **Microscopia de biofilmes em substrato metálico formado em sistemas estático e dinâmico na presença de fluido oleoso.** Rio de Janeiro, 2009. 128p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a morfologia de biofilmes, formados em superfície de aço API 5L X80 submetida a um fluido com baixo BSW (Basic Sediment Water), ou seja, baixo teor de água em óleo, através de análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), determinar a cinética e quantificar os grupos bacterianos de formação destes biofilmes, e avaliar a biocorrosão causada por estes microrganismos. Foram realizadas alterações no protocolo original de preparo de amostras, com a finalidade de obter melhor definição das morfologias avaliadas. Realizaram-se estudos dinâmicos (looping) e em condições estáticas, com e sem a adição de agente biocida. Utilizando-se como fluido de processo o óleo coletado no terminal da Petrobras em Barra do Furado que tem como característica um BSW de aproximadamente 1% de água. Para alcançar os objetivos descritos foram quantificadas bactérias sésseis (bactérias facultativas heterotróficas, bactérias precipitantes do ferro, bactérias anaeróbias heterotróficas e bactérias redutoras de sulfato) através da técnica do número mais provável (NMP). A intensidade do processo corrosivo foi avaliada através da análise dos pites formados nos cupons por microscopia óptica. A seqüência de fixação com alteração do protocolo inicial, permitiu uma melhor preservação estrutural do biofilme obtendo-se assim imagens com melhor resolução, tendo em vista que a fixação primária com glutaraldeído fixa principalmente proteínas pelo estabelecimento de ligações divalentes com grupamento amino, e a pós-fixação em tetróxido de ósmio reage com os lipídios. Quanto a cinética, observou-se também que na presença de fluido oleoso, a formação do biofilme só é detectada após 15 dias de exposição. A adição do agente biocida inibiu o crescimento do biofilme, não sendo detectada a presença de células cultiváveis após 7 dias em contato com o fluido contendo o agente químico.

## Palavras-chave

Corrosão Induzida Microbiologicamente (CIM); bactérias redutoras de sulfato (BRS); biofilme; fluido oleoso; microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## Abstract

Mota, Karla de Avellar; Bott, Ivani de Souza; Junior, Walter Barreiro Cravo (Advisors). **Microscopy of Biofilms Formed on a Metallic Substrate in the Presence of Oily Fluids in Static and Dynamic Systems**. Rio de Janeiro, 2009. 128p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

This study aims to evaluate the morphology of biofilms formed on the surface of API 5L X80 steel exposed to a low BSW (Basic Sediment Water) fluid comprising oil of a low water content. The analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM) in order to determine the formation kinetics, to quantify and identify the bacterial groups present as the film formed, and to evaluate the biocorrosion caused by these organisms. Modifications were made to the original sample preparation protocol, in order to better define the film morphologies. Studies were undertaken applying either static or dynamic (looping) conditions, both with and without the addition of biocides. The process fluid used was oil collected from the Petrobras Barra do Furado Terminal, characterized by its 1% BSW. The evaluation was performed quantifying the sessile bacteria present in the film (heterotrophic bacteria, iron bacteria, anaerobic bacteria e sulphate reducing bacteria) via the Most Probable Number (MPN) technique. The intensity of the corrosion process was determined by the analysis of pits formed in the testpieces, by optical microscopy. The application of a sample fixation sequence, in addition to modifications of the initial sample preparation protocol, permitted the improved preservation of the biofilm structures, thereby permitting higher resolution images. The primary fixing agent, containing glutaraldehyde, principally fixes proteins, by establishing divalent bonds with amino groups, while the post-fixation stage with osmium tetroxide involves reactions with lipid groups. With regard to the film deposition kinetics, it was observed that biofilm formation could only be detected after 15 days' exposure to the oily fluid. The addition of a biocide, inhibited the growth of the film, no cultivatable cells being present after 7 days contact with the treated fluid.

## Keywords

Microbially influenced corrosion (MIC); sulphate reducing bacteria (SRB); biofilm; oily fluid; scanning electron microscopy (SEM).

## Sumário

1	Introdução	16
2	Objetivo	19
3	Revisão Bibliográfica	20
3.1	Corrosão	20
3.1.1	Corrosão localizada induzida por microrganismo	22
3.2.	Biofilmes	25
3.2.1	Capacidade de adaptação das bactérias ao ambiente	25
3.2.2.	Estrutura e fisiologia de biofilmes	27
3.2.3.	Fase inicial na formação de biofilmes	29
3.2.4.	Substância polimérica extracelular (SPE)	33
3.3.	Bactérias participantes da CIM	35
3.4.	Biocidas	38
3.4.1.	Biocidas e a resistência das bactérias	38
3.5.	Métodos de caracterização por microscopia de biofilme	39
3.5.1.	Microscopia ótica	40
3.5.2.	Microscopia de força atômica	40
3.5.3.	Microscopia confocal a laser	41
3.5.4.	Microscopia eletrônica	41
3.5.5.	Protocolo de preparo de amostras para MEV	43
4.	Materiais e Métodos	47
4.1.	Material	47
4.2.	Fluido de processo	48
4.3.	Ensaio dinâmico	49
4.4.	Ensaio estático	54

4.5. Meios de cultura e soluções	54
4.5.1. Solução redutora para presevação de biofilme bacteriano	54
4.5.2. Meio Postgate E - modificado para bactérias redutoras de sulfato (BRS)	55
4.5.3. Meio de cultura para bactérias precipitantes de ferro (BPF)	56
4.5.4. Meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas (BANHT)	57
4.5.5. Meio de cultura para bactérias facultativas heterotróficas (BFHT)	57
4.5.6. Solução de tampão cacodilato	58
4.5.7. Solução de glutaraldeido	58
4.5.8. Solução de Clarke	58
4.5.9. Solução de tetróxido de ósmio	58
4.6. Biocida	58
4.7. Detecção e quantificação das bactérias	59
4.8. Análise por microscopia eletrônica de varredura(MEV) e energia dispersiva de raio X(EDS)	62
4.9. Contagem de pites	65
5. Resultados e discursões	66
5.1. Ensaio Estático	66
5.1.1. Ensaio 1 - Avaliação da cinética de formação do biofilme	66
5.1.2. Ensaio 2 - Influência da adição de THPS na formação do biofilme	73
5.1.3. Ensaio 3 - Influência da adição de THPS sobre o biofilme já formado	79
5.2. Ensaio Dinâmico	85
5.2.1. Ensaio 1 - Avaliação da cinética de formação do biofilme	85
5.2.2. Ensaio 2 - Influência da adição de THPS na formação do biofilme	98
5.2.3. Ensaio 3 - Influência da adição de THPS sobre o biofilme já formado	105

5.3. Anexo I - Imagens representativas de cada ensaio do sistema dinâmico	112
5.4. Anexo II - Imagens representativas de cada ensaio do sistema estático	116
6. Conclusão	121
7. Referências Bibliográficas	122

## Lista de Figuras

Figura 1 - Formas de corrosão	22
Figura 2 – Esquema da formação de um micro-ambiente anaeróbio em um biofilme de consórcio bacteriano	27
Figura 3 – Representação esquemática da estruturas do biofilme bacteriano	29
Figura 4 – Esquema de adsorção de moléculas orgânicas numa superfície limpa formando um filme condicionante	30
Figura 5 – Esquema representativo das etapas sequenciais de adesão de bactérias a um substrato sólido	30
Figura 6 - Esquema representativo de uma bactéria envolta por substâncias poliméricas extracelulares	34
Figura 7 – Curva de crescimento bacteriano	36
Figura 8 – Ciclo do enxofre	36
Figura 9 – Esquema de produção dos elétrons secundários e retroespalhado	42
Figura 10 – Vista lateral do cupom de prova	47
Figura 11 – Vista do topo do cupom de prova	47
Figura 12 – Análise da viscosidade do óleo	48
Figura 13 – Sistema “Looping”	49
Figura 14 – Rotâmetro inserido no sistema	50
Figura 15 – Válvula de controle da vazão	50
Figura 16 – Bomba magnética NH-30PX-T	51
Figura 17 – Suporte do cupom no “loop”	51
Figura 18 – Retirada do suporte do “looping” contendo o cupom	53
Figura 19 A – Cupom na solução de tampão cacodilato	53
Figura 19 B – Cupom na solução redutora	53
Figura 20 – Rosca para manter o sistema fechado	53

Figura 21 – Sistema estático	54
Figura 22 – Imagem ilustrativa da coleta de amostra para contagem de bactérias planctônicas	59
Figura 23 A – Mostra a ação mecânica realizada em um cupom do sistema dinâmico	60
Figura 23 B – Mostra a ação mecânica realizada em um cupom do sistema estático	60
Figura 24 – Solução de Tween 80 gotejada sobre o cupom antes da ação mecânica	60
Figura 25 – Suspensão celular de bactérias sésseis	61
Figura 26 – Inoculação nos Kits contendo meios de cultura específicos para crescimento de BRS e BANHT	61
Figura 27 – Inoculação em placas de Petri contendo meios de cultura específicos para o crescimento de BPF e BFHT	62
Figura 28 A – Bateria de dessalinização	63
Figura 28 B – Bateria de desidratação	63
Figura 29 – Aparelho de ponto crítico	63
Figura 30 – Metalizador	64
Figura 31 – Microscópio Eletrônico de Varredura	64
Figura 32 – Crescimento microbiológico na cinética de formação do biofilme	67
Figura 33 – Imagens de MEV da cinética de formação de biofilme em Condições estáticas	69
Figura 34 – Imagens de MEV da cinética de formação de biofilme em condições estáticas (maior aumento)	69
Figura 35 – EDS realizado no cupom de 360 horas	71
Figura 36 – Imagem representativa da contagem de pites	72
Figura 37 – Densidade de pites na cinética de formação do biofilme	72
Figura 38 – Crescimento microbiológico avaliado na influencia da adição de THPS na formação do biofilme em condições estáticas	74

Figura 39 – Cinética após a adição de THPS de formação do biofilme em condições estáticas	75
Figura 40 – Cinética após a adição de THPS de formação do biofilme em condições estáticas (maior aumento)	75
Figura 41 – Análise de EDS para avaliação da adição de THPS na Formação do biofilme em condições estáticas	76
Figura 42 – Imagem representativa da contagem de pites	78
Figura 43 – Densidade de pites na avaliação da adição de THPS na formação do biofilme	78
Figura 44 – Crescimento microbiológico avaliado na influencia da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas	79
Figura 45 – Imagens da avaliação da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas	81
Figura 46 – Imagens da avaliação da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições estáticas (maior aumento)	81
Figura 47 – Análise de EDS no cupom de 360 horas	83
Figura 48 – Imagem representativa da contagem de pites	83
Figura 49 – Densidade de pites na avaliação da adição de THPS sobre o biofilme formado	84
Figura 50 – Suporte utilizado no sistema dinâmico e o cupom	85
Figura 51 – Comportamento das BANHT no “looping”	86
Figura 52 – Comportamento das BRS no “looping”	86
Figura 53 – Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas (BANHT)	88
Figura 54 – Cronologia da formação do biofilme em condições dinâmicas sem THPS	89
Figura 55 – Cronologia da formação do biofilme em condições dinâmicas sem THPS (aumento maior)	89
Figura 56 – EDS realizado no cupom de 360 horas	91
Figura 57 – Aspecto da formação do biofilme conforme o protocolo 3	93
Figura 58 – Aspecto da formação do biofilme conforme o protocolo 2	94

Figura 59 – Aspecto da formação do biofilme conforme o protocolo 3	94
Figura 60 – EDS realizado no cupom de 360 horas	95
Figura 61 – Imagem representativa da contagem de pites	96
Figura 62 – Densidade de pites na cinética de formação do biofilme	97
Figura 63 – Crescimento microbiológico planctônico (BANHT)	98
Figura 64 – Crescimento microbiológico planctônico (BRS)	98
Figura 65 – Influencia da adição de THPS na formação do biofilme (BANHT)	99
Figura 66 – Cinética de formação do biofilme com adição de THPS em condições dinâmicas	101
Figura 67 – Cinética de formação do biofilme com adição de THPS em condições dinâmicas (maior aumento)	101
Figura 68 – Análise de EDS para 168 horas	103
Figura 69 – Imagem representativa da contagem de pites	103
Figura 70 – Densidade de pites no cupom para avaliação da adição de THPS na formação do biofilme	104
Figura 71 – Influencia da adição de THPS sobre o biofilme formado em Condições dinâmicas (BANHT)	105
Figura 72 – Cinética da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas	106
Figura 73 – Cinética da adição de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas (maior aumento)	106
Figura 74 – Análise de EDS para 168 horas obtidas das regiões Mostradas nas figuras 72C e 73C	108
Figura 75 – Imagem representativa da contagem de pites	109
Figura 76 – Densidade de pites em avaliação da influencia de THPS sobre o biofilme formado em condições dinâmicas	110

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição química dos aços API X80 (% em peso)	48
Tabela 2 – Dada do processo	49
Tabela 3 – Composição da solução salina redutora	55
Tabela 4 – Composição do meio de cultura Postgate E modificado	56
Tabela 5 – Composição do meio de cultura BPF	56
Tabela 6 – Composição do meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas totais	57
Tabela 7 – Composição do meio de cultura para bactérias facultativas heterotróficas totais	57
Tabela 8 – Característica do THPS	59
Tabela 9 – Crescimento de bactérias planctônicas	66
Tabela 10 – Monitoramento da BANHT	67
Tabela 11 – Densidade de pites nos cupons em condições estáticas	71
Tabela 12 – Monitoramento da BANHT	73
Tabela 13 – Densidade de pites	77
Tabela 14 – Monitoramento de BANHT	79
Tabela 15 – Densidade de pites	83
Tabela 16 – Crescimento microbiológico de bactérias planctônicas	85
Tabela 17 – Monitoramento de BANHT (sésseis)	87
Tabela 18 – Densidade de pites da cinética de formação do biofilme	96
Tabela 19 – Crescimento microbiológico de planctônicas	97
Tabela 20 – Monitoramento de BANHT (sésseis)	98
Tabela 21 – Densidade de pites nos cupons com adição de THPS	103
Tabela 22 – Monitoramento de BANHT (sésseis)	104
Tabela 23 – Densidade de pites nos cupons com adição de THPS sobre o biofilme formado	109