

4.

Materiais e Métodos

4.1.

Material

A composição química especificada dos aços utilizados está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição química dos materiais utilizados

| <i>Material</i> | <i>C máx.</i> | <i>Mn. máx.</i> | <i>P máx.</i> | <i>S máx.</i> | <i>Ti máx.</i> | <i>Nb+V+T máx.</i> |
|-----------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|--------------------|
| X80 | 0.22 | 1.85 | 0.025 | 0.015 | 0.04 | 0.15 |
| X65 | 0.22 | 1.65 | 0.025 | 0.015 | 0.06 | 0.15 |
| Gr. B | 0.22 | 1.20 | 0.025 | 0.015 | 0.06 | 0.15 |

Foram confeccionados cupons de teste em aço API 5L grau B; X-65 e X-80 a partir de tubos de diferentes diâmetros e espessuras, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Dimensões dos tubos utilizados para confecção dos corpos de prova

| <i>Nº do tubo</i> | <i>Dimensional do tubo</i> | <i>Dimensional da meia calha</i> | <i>Grau</i> | <i>Peso (Kg)</i> |
|-------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------|------------------|
| 9-4-48620 | 18" x 0,750" | 46 x 19,5 x 23 cm | X-80 | 20,6 |
| 10-4-1396 | 18" x 1,250" | 45 x 23 x 22 cm | X-65 | 33,3 |
| 11-4-8638 | 40" x 0,375" | 102 x 21x 50 cm | B | 23,5 |

O processo de obtenção dos corpos de prova foi através de usinagem no sentido longitudinal do tubo. As dimensões dos corpos de prova usinados são de 20mm de comprimento, 10mm de largura e 3,8mm de espessura. Para fixação dos mesmos foi feito um furo de 3 mm, conforme representado na Figura 22 e 23. Foi produzido um total de 41 corpos de prova para cada material. A área total considerada foi de 392mm².

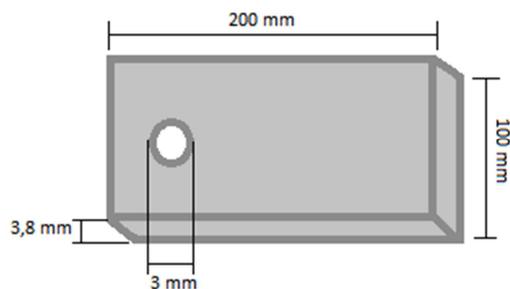


Figura 22 - Esquema do corpo de prova



Figura 23 -Foto do cupom

Os corpos de prova foram submetidos à abrasão (numa lixadeira empregando lixas desde #220 até #1200). O polimento final foi realizado em politriz empregando pasta de diamante de 3 μ m. Após o polimento, as amostras foram desengraxadas com álcool, secas com jato de ar seco e armazenadas em dessecador até o ensaio.

Um corpo de prova de cada aço foi separado para a análise química elementar do material. Este ensaio foi realizado pela técnica de espectrometria ótica, no laboratório de análise microestrutural do SEQUI na PETROBRAS.

Tabela 9 - Condições de coleta. Fonte temperatura : Weatherbase.com. Fonte Maré: BANCO NACIONAL DE DADOS OCEANOGRÁFICOS (BNDO)

| <i>Condição</i> | <i>Coleta 1</i> | <i>Coleta 2</i> | <i>Coleta 3</i> |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Dia</i> | 30/07/2013 | 12/09/2013 | 31/10/2013 |
| <i>Hora</i> | 08:15 | 07:40 | 07:30 |
| <i>Temperatura ambiente</i> | 23°-17° | 27°-19° | 28°-21° |
| <i>Maré</i> | 0.9 | 0.9 | 0.3 |
| <i>Observação</i> | | | Ressaca |

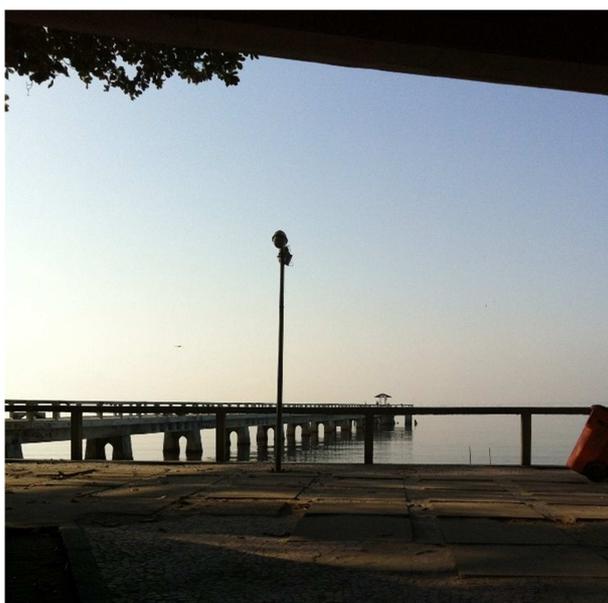


Figura 25 - Foto do píer no dia da primeira coleta (30/07/2013).

Foram avaliados dados meteorológicos, disponibilizados pela Diretoria de Hidrografia e Navegação (Marinha do Brasil), para avaliação das influências que as coletas receberam. Na semana anterior à primeira coleta observou-se a passagem de uma frente fria, com posterior estabilização de um centro de alta pressão. A passagem de uma frente fria é responsável pela agitação das águas, causando uma suspensão de sedimentos e nutrientes e a presença de um centro de alta pressão indica tempo sem nuvens e chuvas, o que pode causar uma fixação das bactérias na região.

Durante os dias próximos ao segundo dia de coleta não se observaram grandes variações, com o clima estável, dentro de uma zona de alta pressão. Enquanto que durante os dias próximos ao terceiro dia de coleta verificou-se a passagem de diversas frentes frias, o que pode ter desestabilizado as correntes na região, criando um cenário de ressaca no dia da coleta.

As marés observadas durante os dias de coleta não variaram durante as primeiras duas coletas. Na terceira coleta, além de apresentar uma maior baixa,

verificou-se que estava em um período de transição entre marés (maré de quadratura para sizígia), neste caso, podendo haver alguma influência na manutenção das bactérias no local.

Visando melhor controle dos parâmetros experimentais, foi utilizado um fluido de processo com base em água do mar sintética. De acordo com Machuca et al. (2013) a água do mar sintética é capaz de reproduzir a agressividade da água do mar natural. Desta forma, utilizou-se água do mar sintética na composição apresentada na Tabela 9 com adição de nutrientes orgânicos, tendo como referência a formulação do caldo nutriente (Tabela 11). O fluido, após seu preparo, foi distribuído em frasco tipo Schott e esterilizado por 20 minutos em autoclave a 121°C (1,1 kgf/cm²).

Tabela 10 – Composição química da água do mar sintética

| <i>Ordem de adição do reagente</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1 | H ₂ O | 10000 ml |
| 2 | NaF | 0,03 g |
| 3 | SrCl ₂ .6H ₂ O | 0,20 g |
| 4 | H ₃ BO ₃ | 0,30 g |
| 5 | Na ₂ SO ₄ | 40,0 g |
| 6 | CaCl ₂ | 11,13 g |
| 7 | MgCl ₂ .6H ₂ O | 107,8 g |
| 8 | KBr | 1,0 g |
| 9 | KCl | 7,0 g |
| 10 | NaSiO ₃ .9H ₂ O | 0,2 g |
| 11 | Na ₂ EDTA | 0,0089 g |
| 12 | NaCl | 235,0 g |
| 13 | NaHCO ₃ | 2,0 g |

Tabela 11 - Composição química do caldo nutriente

| <i>Ordem de adição do reagente</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | Água do Mar Sintética | 1000ml |
| 2 | Extrato de Carne | 3g |
| 3 | Peptona Universal | 5g |

4.3.

Meios de cultura

Foram utilizados meios de cultura para o crescimento dos grupos bacterianos e posterior quantificação. Utilizou-se a solução salino redutora para a preservação do biofilme e posterior raspagem do filme aderido nas superfícies dos corpos de prova para a formação da suspensão celular a fim de possibilitar a contagem microbiana. Foi também utilizada como solução de diluição para a contagem das bactérias redutoras de sulfato e produtoras de ácidos facultativas.

A composição da solução redutora encontra-se na Tabela 12, tendo sido preparada sob purga de nitrogênio para remoção do oxigênio dissolvido, com pH corrigido para 7,8.

Esta solução produzida foi distribuída em frascos de penicilina com 9ml, os quais foram tampados, lacrados e esterilizados por 20 minutos em autoclave a 121°C (1,1 kgf/cm²).

Tabela 12 – Composição da solução salina redutora

| <i>Ordem de adição do reagente</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| 1 | Água do Mar sintética | 1000ml |
| 2 | Trioglicolato de sódio | 0,124 g |
| 3 | Ácido ascórbico | 0,1 g |
| 4 | Solução de resazurina 0,025% m/v | 4,0 ml |

Foi utilizado o meio de cultura Postgate “E” modificado para contagem das bactérias redutoras de sulfato. Os componentes (Tabela 13) foram misturados e homogeneizados sob purga de nitrogênio. O pH foi ajustado para 7,8 e ao final do preparo, o meio foi distribuído em frascos de penicilina com 9ml, os quais foram tampados, lacrados e esterilizados por 20 minutos em autoclave a 121°C (1,1 kgf/cm²).

Tabela 13– Composição do meio de cultura Postgate E modificado

| <i>Ordem de adição do reagente</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| 1 | Água do Mar sintética | 1000ml |
| 2 | Agar-agar | 1,9 g |
| 3 | KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| 4 | Na ₂ SO ₄ | 1,0 g |
| 5 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,608 g |
| 6 | MgCl ₂ .6H ₂ O | 1,83 g |
| 7 | Extrato de levedura | 1,0 g |
| 8 | Ácido ascórbico | 0,1 g |
| 9 | Lactato de sódio 50% m/v | 7,0 ml |
| 10 | Solução de resazurina 0,025% m/v | 4,0 ml |
| 11 | NaCl | 5,0 g |
| 12 | FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| 13 | NH ₄ Cl | 1,0 g |

Para as bactérias produtoras de ácido, preparou-se o meio próprio (Caldo Vermelho de Fenol) conforme Tabela 14, sob purga de nitrogênio. O pH foi ajustado para 7,4 e, ao final do preparo, foi distribuído em frascos de penicilina com 9ml, os quais foram tampados, lacrados e esterilizados por 20 minutos em autoclave a 121°C (1,1 kgf/cm²).

Tabela 14 - Composição para meio de vermelho de fenol

| <i>Ordem de adição do reagente</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Água destilada | 1000ml |
| 2 | Peptona protease | 10 g |
| 3 | Extrato de carne | 1 g |
| 4 | Cloreto de sódio | 5 g |
| 5 | Vermelho de fenol | 0,018 g |

A composição do meio de cultura para bactérias precipitantes do ferro encontra-se na tabela 14 e a solução utilizada para a diluição encontra-se na tabela 15. Os componentes do meio foram misturados em condições ambientais e o pH ajustado para 6,6. Convém salientar que o referido meio de cultura tem em sua composição o agar-agar que lhe confere uma característica semi-sólida, importante para a técnica de plaqueamento que será utilizada posteriormente. O meio de cultura foi então distribuído em frascos Schott e a solução de diluição distribuída em frascos de penicilina com 9ml, os quais foram tampados, lacrados e esterilizados por 20 minutos em autoclave a 121°C (1,1 kgf/cm²).

Tabela 15 - Composição de meio BPF

| <i>Ordem de adição do reagente</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|------------------------------------|--|-------------------|
| 1 | Água do mar sintética | 1000ml |
| 2 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,5g |
| 3 | NaNO ₃ | 0,5g |
| 4 | K ₂ HPO ₃ | 0,5g |
| 5 | CaCl ₂ | 0,1g |
| 6 | C ₆ H ₁₁ FeNO ₇ | 10g |
| 7 | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5g |
| 8 | Agar-agar | 15g |

Tabela 16 - Composição da Solução A/B

| <i>Solução</i> | <i>Reagente</i> | <i>Quantidade</i> |
|----------------|--------------------------------------|-------------------|
| A | KH ₂ PO ₄ | 34g |
| B | MgCl ₂ .6H ₂ O | 81g |
| A/B | Solução A | 1,25 ml |
| | Solução B | 5 ml |
| | Água | 993,75 ml |

No caso específico dos meios utilizados para crescimento dos grupos bacterianos para posterior inoculação no fluido de processo, estes foram distribuídos em frascos do tipo antibiótico com 45mL. No caso do meio para BPF, este foi preparado sem a adição de agar-agar, sendo estocado em condições de abrigo da luz, à temperatura ambiente.

4.4.

Ensaio

Os ensaios dinâmicos foram executados em um *loop* de acrílico, em sistema fechado, conforme Figura 26. O circuito tem capacidade de 1,5L e consiste de uma célula cilíndrica com diâmetro de 10 cm. O fluido de processo foi circulado com auxílio de uma bomba magnética, modelo MD-10 da Emerson, cuja vazão máxima desempenhada é igual a 11 L/min ($1,83 \cdot 10^{-4}$ m³/s), com diâmetros

de sucção e descarga de 14mm. A conexão da bomba à célula cilíndrica foi feita por tubos poliméricos com diâmetro de 8,62mm e a velocidade de escoamento do fluido prevista foi de 0,02m/s.

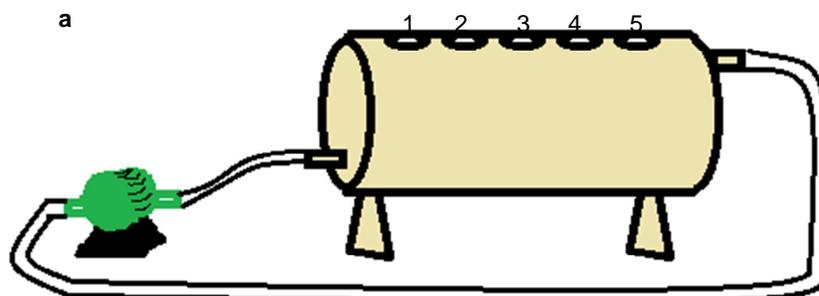


Figura 26 - (a) Desenho esquemático do sistema dinâmico fechado. (b) Imagem do sistema real.



Figura 27 - Loop contendo o fluido de processo e frascos tipo antibiótico contendo as bactérias a serem inoculadas

O sistema fechado operou com fluxo turbulento, dado pelo número de Reynolds de $2,58.10^3$. Para tal afirmação considerou-se a viscosidade cinemática teórica (ν) de $0,9019 \text{ mm}^2/\text{s} \pm 0,0031$ e a massa específica, (ρ) de $1,0188 \text{ g/cm}^3 \pm 0,0004$.

Foram realizados, ao longo deste trabalho, três ensaios contendo microrganismos, visando a simulação da água do mar natural e um quarto ensaio sem adição de microrganismos, conforme apresentado na Tabela 17. As Tabelas 17 e 18 detalham as análises executadas para cada ensaio.

Tabela 17 - Descrição dos ensaios

| Ensaio | | Descritivo |
|--|---|--|
| Ensaio com cultura mista de microrganismos | 1 | Aços expostos a fluido de processo com adição de 0,2% de inóculo de meio de cultura específico (BPA; BRS; BPF) cultivado com bactérias obtidas da primeira coleta. |
| | 2 | Aços expostos a fluido de processo com adição de 0,2% de inóculo de meio de cultura específico (BPA; BRS; BPF) cultivado com bactérias obtidas da segunda coleta. |
| | 3 | Aços expostos a fluido de processo com adição de 0,2% de inóculo de meio de cultura específico (BPA; BRS; BPF) cultivado com bactérias obtidas da terceira coleta. |
| Ensaio sem adição de microrganismos | 4 | Aços expostos a fluido de processo esterilizado com adição de biocida. |

A adição de microrganismos foi realizada através de inóculos de meios de cultura contendo além de bactérias, nutrientes e produtos metabólitos excretados. Todos os ensaios envolveram a circulação de volume de 1,5L de fluido de processo, com característica descrita na Tabela 11.

Tabela 18 – Análises do fluido de processo realizadas

| Ensaio | Análises do Fluido | | | | | | | |
|--------|--------------------|----|----------------|-------|----|-----|-----|-----|
| | Tempo | pH | O _d | Temp. | CL | Cot | QtM | QqM |
| 1 | 15 min | x | | | x | x | x | |
| | 7 dias | x | | | x | | x | |
| | 14 dias | x | | | x | | x | |
| | 21 dias | x | | | x | | x | |
| | 35 dias | x | | | x | | x | |
| | 40 dias | x | | | x | x | x | |
| 2 | 15 min | x | x | x | x | x | x | |
| | 7 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 14 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 21 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 28 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 35 dias | x | x | x | x | x | x | |
| 3 | 15 min | x | x | x | x | x | x | |
| | 7 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 14 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 21 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 28 dias | x | x | x | x | | x | |
| | 35 dias | x | x | x | x | x | x | |
| 4 | 15 min | x | | | x | | | x |
| | 7 dias | x | | | x | | | x |
| | 14 dias | x | | | x | | | x |
| | 21 dias | x | | | x | | | x |
| | 28 dias | x | | | x | | | x |
| | 35 dias | x | | | x | | | x |

Od: Oxigênio Dissolvido

Temp.: Temperatura

CL: Cromatografia Líquida

Cot: Carbono Orgânico Total

QtM: Avaliação Microbiana Quantitativa

QqM: Avaliação Microbiana Qualitativa

Tabela 19 – Análises do aço realizadas

| Ensaio | Aços | Análises dos Aços | | | | |
|--------|-------------------------------|-------------------|-----|-----|-----------------|-------------|
| | | Tempo | QtM | MEV | Análise de Pite | Car. Micro. |
| 1 | API 5L grau B; X-65 e X-80 | 7 dias | x | x | x | x |
| | | 14 dias | x | x | x | x |
| | | 21 dias | x | x | x | |
| | | 28 dias | x | x | x | |
| | | 35 dias | x | x | x | |
| 2 | API 5L grau B; X-65 e X-80 | 7 dias | x | x | x | x |
| | | 14 dias | x | x | x | x |
| | | 21 dias | x | x | x | |
| | | 28 dias | x | x | x | |
| | | 35 dias | x | x | x | |
| 3 | API 5L grau B; X-65 e X-80 | 7 dias | x | x | x | x |
| | | 14 dias | x | x | x | x |
| | | 21 dias | x | x | x | |
| | | 28 dias | x | x | x | |
| | | 35 dias | x | x | x | |
| 4 | API 5L grau B; X-65 e X-80 | 7 dias | | | x | |
| | | 14 dias | | x | x | |
| | | 21 dias | | | x | |
| | | 28 dias | | x | x | |
| | | 35 dias | | | x | |

QtM: Avaliação Microbiana Quantitativa
 MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
 Análise de Pite: Análise de Pite por Microscopia Ótica
 Car. Micro.: Caracterização Microestrutural

Os testes foram realizados à temperatura controlada em estufa bacteriológica. Devido à influência do motor da bomba utilizada para a circulação do fluido de processo, a estufa foi controlada para $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de modo que o fluido se mantivesse a temperatura constante de $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Cada ensaio continha cerca de 10 corpos de prova de cada material. Os corpos de prova foram expostos ao fluido em suportes confeccionados em material polimérico em forma de haste (Figura 28), sendo inseridos na célula cilíndrica pela parte superior. Neste suporte, os corpos de prova foram arranjados de tal forma que o fluxo do fluido de processo fosse tangencial a superfície dos cupons testados (Figura 29).

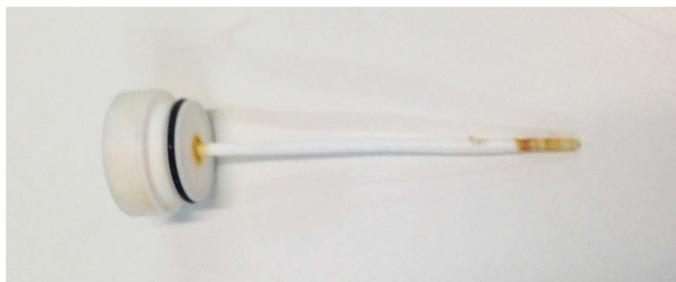


Figura 28- Suporte do sistema em material polimérico.

A célula cilíndrica continha cinco pontos (Figura 11), referentes a cada retirada, para colocação de suportes, onde os corpos de prova eram inseridos.

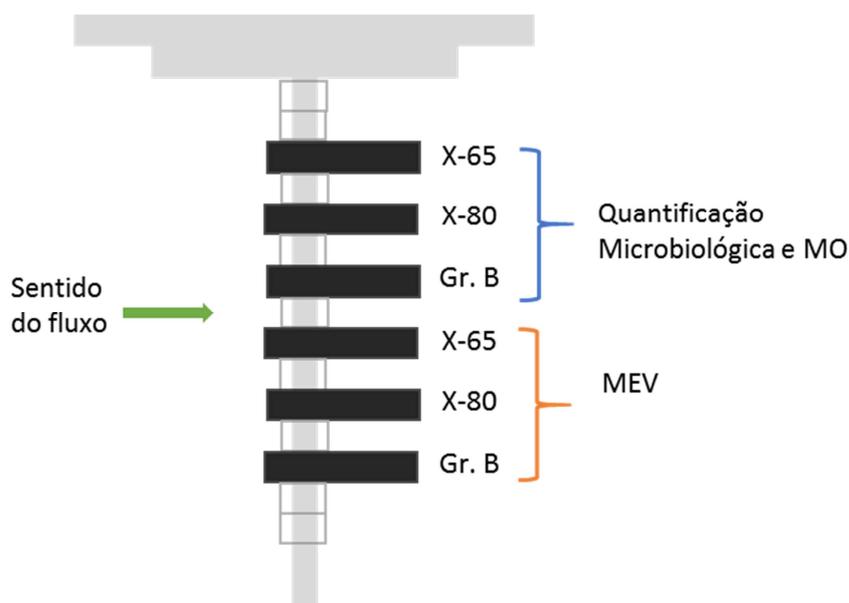


Figura 29 - Esquema de localização dos corpos de prova no suporte.

Foram feitas retiradas de corpos de prova para cada ensaio nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Para cada retirada dois corpos de prova de cada material eram removidos do experimento. A retirada foi realizada em capela devido à formação de ácido sulfídrico durante o experimento.

De modo a evitar perdas de volume com a retirada das amostras, após a coleta, era adicionado fluido de processo no mesmo volume do fluido removido.

Os corpos de prova retirados foram submetidos à quantificação microbiológica (QMt), quantificação dos pites formados por microscopia ótica, caracterização morfológica do biofilme formado por microscopia eletrônica de

varredura (MEV) e caracterização microestrutural (Car. Micro.). Os corpos de prova utilizados para a quantificação microbiológica foram os mesmos utilizados para contagem de pites e avaliação microestrutural. Ainda foram retiradas alíquotas do fluido para quantificação química e microbiológica.

Para o quarto ensaio, sem adição de microrganismos, o fluido de processo foi utilizado após sua filtração a vácuo em peneira de 0,22 μm , e adição posterior de azida de sódio na proporção de 0,1% no tempo 0 e 0,1% após 7 dias de ensaio. Este ensaio objetivou verificar o comportamento dos aços em estudo em um sistema limpo, contendo apenas bactérias aeróbicas provenientes de contaminação do sistema.

4.5.

Análises químicas

Foram realizadas análises de pH utilizando um pHmetro digimed DM-22 e oxigênio dissolvido (O_d) por meio de um medidor portátil (DO 5510) após a retirada de cada alíquota, para os tempos de 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias. De modo a garantir as condições de incubação, foi feita uma medida da temperatura (Temp) foi realizada para cada retirada de amostra.

4.5.1.

Análise de carbono orgânico total

Ao início e final de cada ensaio foram retiradas alíquotas de 40 ml para a execução de análises de Carbono Orgânico Total (Cot). A análise foi realizada no laboratório de Química do CENPES, PETROBRAS.

4.5.2.

Análise por cromatografia de íons

A técnica de cromatografia de íons (CL) separa as espécies iônicas de interesse. Na cromatografia de íons, a separação é obtida quando os componentes da amostra são carregados pela fase móvel (ou efluente), migram e interagem com a fase estacionária. Os componentes que tiverem maior afinidade com a fase estacionária migrarão mais lentamente comparados aos de maior afinidade com a fase móvel.

Antes de cada análise, as amostras foram processadas do seguinte modo:

- a. Passagem por um sistema de microfiltros MILLIPORE com membrana de porosidade 0,22 μm com o objetivo de retirar material particulado e células microbianas existentes.
- b. Para as amostras que continham íons em concentração muito mais alta que o íon de interesse, foi realizada a diluição da mesma para 100 ml.
- c. Após a preparação acima descrita, injetou-se alíquota de 1mL no equipamento.

Os teores dos ânions de interesse foram determinados utilizando-se um cromatógrafo de íons da Metrohm de especificação 761Compact IC equipado com uma coluna de ânions de especificação Metrosep A SUPP 5 e um detector condutimétrico 732 IC da Metrohm, sendo usada como fase móvel uma solução contendo 3,2 mM/L de carbonato de sódio e 1,0 mM/L de bicarbonato de sódio a uma vazão de 0,70 mL/min. Foi instalado no referido equipamento, um módulo de supressão química a fim de evitar um prévio processo de filtração para retenção de íons cloreto, que tendem a interferir na identificação e quantificação de outros analitos de interesse, além de minimizar os custos de cada análise. Como reagente do sistema de supressão química utilizou-se uma solução de 100 mM/L de ácido sulfúrico.

4.6.

Deteccão e quantificação de bactérias

A deteção e a quantificação das bactérias dos grupos BRS, BPF e BPA foi realizada no fluido de processo (bactérias planctônicas) e nos biofilmes aderidos as superfícies metálicas (bactérias sésseis). Foi realizada, para os ensaios com cultura mista de microrganismos, uma avaliação microbiana quantitativa (QM_t) e, para o ensaio sem adição de microrganismos, análise qualitativa (QM_q).

Para as bactérias planctônicas foi recolhida alíquota de cerca de 20ml do fluido de processo, em frasco tipo antibiótico, após 15 min do início dos ensaios e em cada retirada de corpos de prova prevista (7, 14, 21, 28 e 35 dias).

Para as bactérias sésseis, houve a remoção do biofilme aderido nos corpos de prova. Em cada retirada, os corpos de prova eram imediatamente imersos em solução redutora para a lavagem, visando a remoção das bactérias planctônicas que ficam no entorno dos corpos de prova mas não estão aderidas, não podendo ser consideradas sésseis. Após este procedimento, os corpos de prova contendo biofilme eram transferidos para um becker contendo 27ml de solução redutora para a devida remoção do biofilme e formação da suspensão celular. Esta remoção foi executada utilizando espátulas de material polimérico, visando não danificar a superfície metálica do corpo de prova (Figura 28) e, posteriormente, tratado com ultrassom por 5s. Realizou-se a remoção do biofilme em ambos os lados dos corpos de prova.



Figura 30 – Imagem demonstra a ação de raspagem mecânica do biofilme

O fluido coletado e a suspensão celular foram inoculados em meios específicos para cada grupo bacteriano estudado. A quantificação das BRS e BPA foi realizada através da técnica de diluições sucessivas para obter o número mais provável (NMP) de bactérias presentes na amostra, inoculando-as em “kits” previamente preparados com os meios característicos até a diluição de 10^7 . A quantificação da BPF foi realizada pela técnica de plaqueamento pelo método “pour plate”, realizada em duplicata até a diluição de 10^5 para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).



Figura 31 - Kits para NMP

A manipulação das amostras foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada.

Após a inoculação, os “kits” e as placas foram incubados em estufa bacteriológica a $30\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 dias para BRS e BPA e 5 dias para as BPF.

O quarto ensaio, realizado sem a adição proposital de microrganismos, teve seu fluido de processo avaliado qualitativamente (QM_q) quanto à presença de BRS, BPA e BPF planctônicas. Houve, desta forma, a retirada de alíquota de 15 ml do fluido de processo, recolhida em frasco tipo antibiótico, após 15 min do início do ensaios e em cada retirada de corpos de prova prevista (7, 14, 21, 28 e 35 dias). A qualificação foi feita através de inoculação de 5 ml do fluido de processo em 45 ml de meio específico para cada grupo bacteriano estudado em frasco tipo antibiótico. Após a inoculação, os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a $30\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 dias para BRS e BPA e 5 dias para as BPF.

4.7.

Quantificação de pites (MO)

Os corpos de prova, após o processo de quantificação microbiológica, foram lavados com água destilada e depois acetona PA, posteriormente secos e foi aplicada camada de verniz incolor para preservação da superfície. Após a secagem dos corpos de prova, os mesmos foram armazenados em dessecador para posterior quantificação de pites por microscopia ótica.

O preparo para a quantificação de pites consistiu na remoção do verniz, através de imersão em acetona PA, e tratamento com ultrassom por cerca de 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a retirada dos produtos de corrosão através de decapagem ácida com solução de Clarke pelo período de 5 a 10 minutos, objetivando-se a remoção de todo o produto de corrosão formado. Após a decapagem, os corpos de prova foram lavados com água destilada e posteriormente imersos em acetona PA, secos e levados ao microscópio ótico Zeiz Axiolmager M2m motorizado, utilizando a objetiva de 100X e a aquisição das imagens foi realizada por meio de uma câmera digital AxioCam HR, com auxílio do programa Axion Vision 4.7. , para analisar a morfologia da corrosão ocasionada durante os testes.

Utilizou-se a norma “Standart Guide for Examination and Evaluation of Pitting Corrosion” (ASTM G 46). Foram analisadas quinze (15) áreas de $1,47 \cdot 10^{-6} \text{m}^2$, quanto à quantidade, com objetiva de 10X, avaliando seu tamanho, e maior profundidade com objetiva de 20X.

Após a quantificação dos pites, as amostras referentes de 7 e 14 dias foram polidas com pasta de diamante de $1 \mu\text{m}$, desengorduradas, e atacadas com nital 2% para revelação da microestrutura. Novamente foi realizada avaliação dos corpos de prova no microscópio ótico Zeiz Axiolmager M2m motorizado com aumento de 1000X com câmera digital AxioCam HR. Utilizou-se lentes de objetiva 5X, 10X, 20x, 50x e 100X.

4.8.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDS).

Após a retirada do sistema, os cupons destinados à análise por MEV foram dessalinizados fixados e em seguida desidratados. A dessalinização consistiu em lavagens sucessivas em soluções contendo água do mar sintética e água destilada em diferentes proporções, começando da mais concentrada até chegar a menos, nas proporções de água destilada para água do mar de 30%v/v, 50% v/v, 70% v/v, 90% v/v e 100% v/v. A cada lavagem o corpo de prova era imerso durante 10 minutos em cada solução. Este procedimento foi realizado para remoção dos sais contidos nos cupons, que poderiam interferir na análise, devendo ser realizado de forma gradativa visando evitar danos às células dos microrganismos presentes, devido a variações bruscas na pressão osmótica.

A fixação foi realizada pela imersão dos corpos de prova por 3 horas em solução de 5% glutaraldeído em tampão de cacodilato. Para a etapa de desidratação, a amostra é imersa em soluções apresentando concentrações crescentes de acetona em água destilada de 30% v/v, 50% v/v, 70% v/v e 90% v/v e 100% v/v (MOTA, 2009). Após esta primeira etapa, a secagem da amostra é concluída no aparelho de ponto crítico de CO_2 , modelo Leica EM CPD300 (Figura

30). Este aparelho ocasiona a desidratação completa da amostra. A amostra imersa em acetona PA é inserida no equipamento e, após ajuste adequado de temperatura, este fluido é substituído por CO₂ líquido. Processa-se, então, um aumento gradativo de temperatura até que a temperatura de ponto crítico do CO₂ seja atingida. Com isto, há a garantia de que todo o líquido presente na amostra foi eliminado. Então realiza-se a despressurização do sistema de forma gradativa para não ocasionar deformações nas células existentes no biofilme.



Figura 32 - Foto do ponto crítico utilizado no preparo das amostras

Após estes procedimentos, as amostras foram encaminhadas para a metalização com prata (Ag) no equipamento Sputter Coater Bal-Tec SCD 005 com alvos de prata (Ag) na amperagem de 30mA por 250s. A metalização com a prata tem o objetivo de permitir a visualização do pico de enxofre durante a análise de EDS, tendo em vista que outros metais, como o ouro, se superpõem ao pico do enxofre, impossibilitando a sua visualização.

Posteriormente, for realizada análise de MEV e EDS utilizando microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Leica S440, equipado com sistema de microanálise por dispersão de energia (EDS) Link ISIS L300 com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II, de resolução de 133 eV para 5,9 keV e software para operação automática inclusive do MEV.



Figura 33 - Foto do microscópio eletrônico de varredura

Este procedimento foi realizado para as amostras dos ensaios com cultura mista de microrganismos nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias e para o ensaio sem adição de microrganismos para os tempos de 14 e 28 dias.