

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**EFEITO DE BIOCIDAS SOBRE BIOFILMES BACTERIANOS ENVOLVIDOS  
EM PROCESSOS DE BIOCORROSÃO EM PLATAFORMAS MARÍTIMAS DA  
PETROBRAS**

**GUARANI DE HOLLANDA CAVALCANTI**

**Rio de Janeiro  
Abril-2001**

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**EFEITO DE BIOCIDAS SOBRE BIOFILMES BACTERIANOS ENVOLVIDOS EM  
PROCESSOS DE BIOCORROSÃO EM PLATAFORMAS MARÍTIMAS DA  
PETROBRAS**

**GUARANI DE HOLLANDA CAVALCANTI**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências nas áreas de biologia celular e microbiologia.

Orientadora: Dra. Cláudia Mara Lara Melo Coutinho

Rio de Janeiro  
Abril, 2001

## FICHA CATALOGRÁFICA

C376 Cavalcanti, Guarani de Hollanda

Efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas da PETROBRAS / Guarani de Hollanda Cavalcanti. – Rio de Janeiro, 2006.

xi, 142 f. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2001.

Bibliografia: f. 126-142.

1. Bactérias redutoras de sulfato. 2. Biocidas. 3. Corrosão.  
4. Microscopia eletrônica. I. Título.

CDD: 668.65

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Esta Dissertação intitulada:

**EFEITO DE BIOCIDAS SOBRE BIOFILMES BACTERIANOS ENVOLVIDOS EM  
PROCESSOS DE BIOCORROSÃO EM PLATAFORMAS MARÍTIMAS DA  
PETROBRAS**

apresentada por

**GUARANI DE HOLLANDA CAVALCANTI**

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Renato Crespo Pereira  
Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense -UFF

Dr. Luiz Edmundo Vargas de Aguiar  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis - CEFETQ

Dra. Maria de Nazareth S. L. Meirelles  
Depto. Ultra-estrutura e Biologia Celular - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Dra. Leila Campos (suplente)  
Depto. Bacteriologia - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Dra. Tania C. Araújo-Jorge (revisora e suplente)  
Depto. Ultra-estrutura e Biologia Celular - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Tese defendida e aprovada em 27 de abril de 2001.

Este trabalho foi realizado através do convênio interinstitucional firmado entre a PETROBRAS – Petróleo Brasileiro S.A. e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em dezembro de 1998. O objetivo deste convênio foi o de desenvolver o projeto de cooperação tecnológica intitulado: “Bactéria Redutora de Sulfato (BRS) em Processos de Corrosão Influenciada por Microrganismos (CIM): Estudos de Formação, Desorganização e Controle do Crescimento de Biofilmes”. A orientação do mesmo foi feita pela Dra. Cláudia Mara Lara Melo Coutinho, professora da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil e pesquisadora colaboradora no Laboratório de Biologia Celular, do Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular (DUBC) do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A partir de 2001, com o retorno do grupo para o Laboratório de Biologia Celular, de onde se originou, a tese foi nele finalizada. As análises ultra-estruturais dos biofilmes foram realizadas no DUBC, FIOCRUZ. As análises microbiológicas e a microanálise de raios-X foram realizadas em laboratório da Biotecnologia e Ecossistemas do CENPES, PETROBRAS e no Laboratório de Ultra-estrutura Celular e Parasitologia Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), respectivamente. Durante o período da tese, contamos com o apoio técnico e financeiro do Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ) e da PETROBRAS – Petróleo Brasileiro S.A. / Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES).

Data de matrícula no programa de Mestrado no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular: 27 de abril de 1998.

Dedico este trabalho:

À memória do meu grande amigo Cláudio Alexandre Cavalcanti Pezzella (Frangão).

Aos meus pais, Pedro e Ana, por terem sempre acreditado em meu futuro como biólogo.

## AGRADECIMENTOS

À Cláudia Mara Lara Melo Coutinho, por ter me dado a grande oportunidade de crescer profissionalmente, por ter sido mãe, irmã e uma grande amiga durante todos esses anos de convivência. Obrigado por confiar em mim. Pode contar comigo para tudo que você precisar, sempre estarei pronto a te ouvir.

À Tania Araújo-Jorge, pela oportunidade de ingressar no DUBC e por toda ajuda fornecida até hoje. Obrigado, pois mesmo sem ter tempo, devido ao seu trabalho, você sempre arrumou um tempinho para mim. Tenho uma grande admiração profissional por você.

Ao Maurílio José Soares, por ter me introduzido no mundo da microscopia eletrônica. Obrigado por ter tido paciência nos vários momentos em que interrompi o seu trabalho para tirar alguma dúvida ou para falar de meus problemas. Até que rimos bastante no período em que dividimos a mesma sala.

À minha amiga flamenguista Solange Lisboa de Castro. Sol, tenho por ti um imenso respeito e amizade. Obrigado.

À Nazareth Meirelles, por ser uma pessoa muito especial para todos que a conhecem e para a história do DUBC e da microscopia eletrônica no Brasil.

Aos demais pesquisadores do DUBC: Helene, Nazinha, Suzana, Miriam, Renato, Andréia Henriques e Vinícius. Obrigado por tudo o que vocês fizeram por mim e fazem pelo DUBC.

À Fátima Cristina Magalhães, por ser um exemplo de profissional e de pessoa. Agradeço por sua amizade e pela força que você me passa. Admiro sua dedicação em melhorar esse mundo em que vivemos e a luta por seus ideais. Precisamos ter alguém como você para nos guiar. Por favor, nunca perca as esperanças!

À Iwona Beech, por ser uma das maiores pesquisadoras na área de biofilmes, BRS e biocorrosão e, ao mesmo tempo, ser uma pessoa muito simpática e simples. Fico muito feliz por ter sua amizade e espero contar com sua presença em numerosos “beerfilms”. XXX!

A Mônica, Gina, Edilson, Herval e Juliana do CENPES. Agradeço muito a vocês por terem me dado a grande oportunidade de enriquecer esse trabalho com os ensaios de microbiologia. Sinto-me feliz por dividir com vocês, atualmente, o mesmo ambiente de trabalho.

Ao Luiz Edmundo, por ter me apresentado ao Museu da Vida numa época em que cheguei a pensar em sair da FIOCRUZ. Graças a você, permaneci na instituição e acabei ingressando no mestrado após um ano de Museu.

Ao Leonardo Andrade, amigo de faculdade que se tornou fera em microscopia eletrônica. Leo, muito obrigado pela ajuda com as microanálises de raios-X. Conte comigo para o que você precisar e saiba que terei prazer em retribuir a boa vontade com que você me recebeu.

Ao Marcelo Pelajo. Muito obrigado pela ajuda com as análises de microscopia confocal. Agradeço também pelos conselhos e idéias relacionadas ao nosso trabalho e a sua boa vontade em nos ajudar.

Ao grande amigo Maurício Paiva. Cara, nos divertimos bastante durante todo esse tempo! Espero que você realize todos os seus sonhos e continue divertindo as pessoas por onde você passa. Aproveite o seu dom de fazer amizades, leve-as a sério, pois elas são, com certeza, uma das grandes coisas que levamos desta vida. Ah! Obrigado pela grande ajuda com as pranchas, sem você eu teria demorado mais um século para terminar essa tese.

Ao Ricardo, por sua amizade e por ser um dos caras mais humanos e inteligentes que conheci até hoje. Você é para mim um grande exemplo de biólogo. Meu ídolo do DUBC!

À Mariana, por ser a amiga mais valiosa que tenho (8 milhões de dólares com os ajustes da inflação). Meeeery, muito obrigado por ter me aturado durante esse tempo no DUBC. Obrigado por todos os seus conselhos, por mais que eu não os seguisse, eu juro que pelo menos refletia sobre eles. Ah! Você é inteligente p'ra caramba, CDF! Eu tinha que te zoar um pouquinho, né? HAHAAAAHA!

Ao irmãozinho Cabofriense Artur. "O ser humano é uma coisa sinistra, cumpadi, tem mais de 100 bichinhos p'reu sangrar..." Valeu figura, você me ajudou muito enquanto estava no DUBC e principalmente na fase final da minha tese, quando nos divertíamos nos finais de semana mergulhando em Cabo Frio. Um abraço!

À Cláudia Mendes. Meeeeeeeeennnnnd's, obrigado por dividir comigo a mesa, a orientadora, a amizade e principalmente os probleminhas de nossas teses. Estou muito feliz por você. Conseguimos!!! Um beijão!

Ao Mestre e Professor Xandele. O mundo não seria o mesmo se não existissem personagens como Monteiro Lobato, Forest Gump e você! Ronaldinho, obrigado pelos conselhos e por toda ajuda que você me deu. Foi muito bom ter descoberto mais um grande amigo.

À Carol e à Rosane, por terem agüentado um Chato Legal cantarolando e emitindo ruídos durante muito tempo num espaço restrito como o LBCM. Adoro vocês, muito obrigado por tudo. Graças a vocês eu não morri de fome e consegui terminar de escrever essa tese com uma saúde invejável.

Ao Bruno, o melhor jogador de futebol da Fundação Oswaldo Cruz. Bruno, você também é craque no seu trabalho no DUBC. Nem tenho como agradecer por todos os favores que você me fez. Muito obrigado!

Ao Grande Técnico Seninha, por ter dividido comigo o prazer de processar todas aquelas amostras do CENPES. Sem você eu estaria perdido. Agradeço profundamente a sua colaboração e espero que você consiga atingir todos os seus objetivos pessoais e profissionais.

À Carla Pinto Gonçalves, pela ajuda direta na minha tese como estagiária de iniciação científica. Aprendi bastante com você e te agradeço por isso.

À Cida, Sônia e Lourdes, por toda ajuda burocrática e pela amizade. Muito obrigado!

Ao Genésio, José, Marquinhos, Luciano, Adalberto e Levi, por todo apoio técnico e pela amizade.

Aos demais amigos do DUBC: Erick, Luciana, Tânia, Betinha, Dayse, Ellen, Alan, Tatiana, Juliana, Renatas, Daniele, Dráusio, Wagner, Bernardo, Márcio, Cláudio, Raio, Gabriel, Fátima, Cláudia Calvet, Emily, Maria Alice, Kelly, Denise, Eunice, Cláudia, Andréia Pereira, Bianca, Romário, Valéria e àqueles que, por esquecimento, eu não tenha mencionado, por fazerem do nosso ambiente de trabalho um local descontraído e agradável.

Ao Genilton, Heloísa, Rodrigo e Guga, pelo aprendizado em processamento de imagens e revelações fotográficas.

À Eliete, Cleide e Fabíola, por toda ajuda relacionada à área de ensino.

À Galera da Biodescoberta do Museu da Vida: Fabíola, Roberta, Cris, Elen, Carla, Magali, Luiz Antônio e Miguel. Obrigado pela força antes e durante o mestrado. Que o Museu da Vida se transforme naquilo em que sempre idealizamos.

À Sociedade de Promoção da Casa de Oswaldo Cruz (SPCOC), por ter intermediado o convênio entre a FIOCRUZ e a PETROBRAS.

Aos irmãos Diogo e Diana. Fico muito feliz em saber que estamos cada vez mais próximos a cada dia que passa. Apesar de nossas divergências, amo vocês.

Aos amigos calouros da PETROBRAS: Talita, Bias, Adriana, Márcia, Ana Paula, Ana Falcão, Lúcia, Nei, Cláudio, Priscilas, Flávia e Raphael, por estarem juntos comigo nos momentos finais da tese. A grande meta é ser feliz!

Aos grandes amigos: Geneal, Digão, Morgan, Ronaldo, The Flash, Jorge Maluco, Alexandre, Gustavo, Artur e Fábio. A amizade é fundamental para que possamos vencer juntos os desafios impostos pela vida.

A todos que por ventura eu tenha esquecido de mencionar. Não fiquem tristes! Agradeço a todos vocês!!!

## **ABREVIACÕES USADAS**

**BANHT** – Bactéria(s) anaeróbica(s) heterotrófica(s) total(is)

**BRS** – Bactéria(s) redutora(s) de sulfato

**CIM** – Corrosão influenciada por microrganismos

**DTPA** – cido dietilenotriaminopentacético

**EDS (energy dispersive spectroscopy)** – espectroscopia por energia dispersiva de raios-X

**ESI (electron spectroscopic image)** – Imagem eletrônica espectroscópica

**E<sub>0</sub>** – Potencial redox

**e<sup>-</sup>** - elétron

**eV** – Eletrovolts

**GA** – Glutaraldeído

**GC** - Conteúdo de guanina e citosina no DNA

**H<sub>2</sub>S** – Sulfeto de hidrgnio ou gás sulfídrico

**ME** – Microscopia eletrônica

**MET** – Microscopia eletrônica de transmissão

**MEV** - Microscopia eletrônica de varredura

**mV** - milivolt

**NMP** – Número mais provável

**PCH I** – Plataforma de Cherne I

**PCH II** – Plataforma de Cherne II

**PGP** – Plataforma de Garoupa

**PNA I** – Plataforma de Namorado I

**PNA II** – Plataforma de Namorado II

**ppb** – partes por bilhão

**ppm** – partes por milhão

**p/v** – peso por volume

**QAT** – Sal quaternário de amnio

**SPE** – Substâncias poliméricas extracelulares

**THPS** – Sulfato de tetrakishidroximetil fosfnio

**v/v** – volume por volume

**VR** – Vermelho de rutênio

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
Ficha catalográfica	i
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Abreviações usadas	viii
Índice	ix
Resumo	x
Summary	xi
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Biofilmes bacterianos	2
2. Bactérias redutoras de sulfato	9
3. O envolvimento de bactérias redutoras de sulfato em processos de corrosão	12
4. Controle do crescimento de biofilmes na indústria do petróleo	17
5. Objeto de nosso estudo	29
6. Objetivos	34
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
1. Meios de cultura e soluções	36
2. Corpos-de-prova utilizados	37
3. Sistema estático de fluxo d'água	38
4. Ensaio de campo: tratamento do oleoduto PCH II / PCH I	42
5. Sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop")	43
6. Processamento para microscopia eletrônica	46
7. Microanálise de raios-X	48
8. Microscopia confocal de varredura a laser	48
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
1. Sistema estático de fluxo d'água	50
2. Sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop")	72
3. Tratamento do oleoduto PCH II / PCH I	97
4. Potencial da microscopia confocal para estudo de biofilmes	106
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>111</b>
Conclusões	124
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>126</b>

## RESUMO

Estudamos o efeito de soluções químicas (biocidas, inibidores metabólicos, inibidores de corrosão e de incrustação) no controle do crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) sésseis e planctônicas e na desorganização de biofilmes bacterianos encontrados em oleodutos e tubulações do sistema de injeção de água do mar de plataformas de petróleo da PETROBRAS. Bactérias coletadas nesses locais foram cultivadas em laboratório, em condições estáticas e dinâmicas de fluxo d'água, na ausência e presença de cinco diferentes produtos. Posteriormente, amostras tratadas e não tratadas foram analisadas quanto a parâmetros microbiológicos, ultra-estruturais e por microanálise de raios-X. Além dos ensaios laboratoriais, foram analisados resíduos coletados de um oleoduto da PETROBRAS, antes e após o tratamento com bases ativas. Adicionalmente, padronizamos a técnica de microscopia confocal de varredura a laser para o estudo *in situ* de biofilmes bacterianos aderidos à superfície metálica de corpos-de-prova.

Dentre as soluções químicas testadas no controle microbiano, a solução de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) foi a de melhor desempenho nos testes estáticos, seguido pela solução de glutaraldeído coadjuvado com sais quaternários de amônio (GA-QAT). O DTPA também foi utilizado no oleoduto em campo, obtendo bons resultados. Em sistema dinâmico, glutaraldeído (GA) dosado isoladamente ou coadjuvado com QAT apresentou eficiência baixa ou média contra bactérias sésseis, a depender dos tempos de contato com a solução de tratamento. Todos os produtos testados foram mais efetivos contra bactérias planctônicas do que sésseis.

As análises ultra-estruturais indicaram que as soluções de GA e de GA-QAT nas concentrações testadas não apresentaram poder de remoção dos biofilmes aderidos aos corpos-de-prova em condições estáticas e dinâmicas de fluxo d'água. Já a solução de DTPA foi capaz de alterar a ultra-estrutura das células e do biofilme aderido ao metal, tanto em testes estáticos laboratoriais, como no tratamento do oleoduto. Microanálises de raios-X sugeriram que o DTPA é capaz de dissolver incrustações de sulfato de bário encontradas associadas a biofilmes bacterianos nos oleodutos. Esta técnica também permitiu caracterizar o sulfeto de ferro como sendo o principal produto de corrosão, encontrado geralmente adsorvido à matriz extracelular dos biofilmes ou em contato com a superfície de bactérias sésseis e planctônicas.

A metodologia de análise dos corpos-de-prova por microscopia confocal mostrou-se útil para a avaliação da presença e densidade do biofilme aderido ao metal e também para a detecção de profundidades de pontos de corrosão abaixo desses biofilmes. Essa técnica, portanto, poderá ser aplicada para avaliações futuras do controle da biocorrosão nas tubulações de plataformas de petróleo.

## SUMMARY

We studied the effect of chemical solutions (biocides, metabolic, corrosion and incrustation inhibitors) in the control of planktonic and sessile sulphate-reducing bacteria (SRB) growth and also in the disassembly of biofilms present in oil field pipelines of seawater injection systems of PETROBRAS' offshore platforms. Bacteria collected from field were cultured in laboratory under static and dynamic water flow systems, in the absence and presence of five different products. Later on, treated and non-treated samples were analysed by microbiological and ultrastructural techniques and by X-ray microanalysis. Besides laboratory assays, residues collected from an oil field pipeline of Campos' Basin were analysed before and after biocide treatment. Additionally, we standardised the laser scanning confocal microscopy technique for the *in situ* study of bacterial biofilms attached to the surface of metallic coupons.

Among the tested products aiming the microbial control, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) presented the best performance under static tests, proceeded by glutaraldehyde (GA) solution conjugated with quaternary salts of ammonium (QAT). In dynamic system, GA alone or conjugated with QAT presented low or medium efficiency profile against sessile bacteria, depending on the time of contact with the cells. All the tested products were more effective against planktonic bacteria as compared to sessile ones. DTPA was also used in the oil field pipeline, obtaining good results.

Ultrastructural studies indicated that GA and GA-QAT solutions were not efficient to remove biofilms attached to the coupons in both static and dynamic systems. However, DTPA solution was capable to alter the ultrastructure of the cells and of the biofilm attached to the metal, either in laboratory static tests or in the pipeline treatment. Through the X-ray microanalysis, we characterised iron sulphide as the main corrosion product. This compound was generally found adsorbed to extracellular matrix elements or even adsorbed to planktonic and sessile bacterial surface.

The methodology to analyse coupons by confocal microscopy was quite useful to evaluate the presence and density of the biofilm attached to the metal, and also to detect depths of corrosion pits found below those biofilms. This technique, therefore, can be applied for future evaluations related to biocorrosion control in oil field pipelines of petroleum offshore platforms.

# **INTRODUÇÃO**

## 1. Biofilmes bacterianos

### 1.1. Capacidade adaptativa de bactérias e formação de biofilmes

Uma extraordinária característica das bactérias é sua capacidade de rápido crescimento em condições ambientais apropriadas e quando nutrientes estão disponíveis. Ainda mais extraordinária é a habilidade desses microrganismos permanecerem viáveis em condições adversas. Muitas bactérias desenvolveram mecanismos altamente sofisticados que lhes permitem manter a viabilidade celular durante períodos de escassez de nutrientes, voltando a crescer rapidamente quando estes se tornam disponíveis. Algumas espécies formam, por exemplo, esporos dormentes, enquanto outras formam corpos de frutificação e agregados celulares em resposta à falta de nutrientes (revisto em Siegele e Kolter, 1992). Pode-se dizer que as bactérias constituem a forma de vida de maior sucesso na Terra, em termos de biomassa total e em relação à variedade e extensão de habitats colonizados. Isso se deve principalmente à plasticidade fenotípica, ou seja, à habilidade do genótipo bacteriano em responder fenotipicamente a estímulos ambientais. Uma importante estratégia fenotípica que vem sendo extensivamente estudada é a organização das bactérias sob a forma de biofilmes (Brown e Williams, 1985; revisto em Costerton e cols., 1995).

Em ambientes aquáticos, as bactérias podem ser encontradas livremente em suspensão (existência planctônica) ou aderidas a um substrato inerte ou superfície viva (existência sésil). Organizações complexas de várias espécies e até gêneros diferentes podem ocorrer dentro de populações bacterianas planctônicas e sésseis. As condições ambientais, em grande parte, ditam se os organismos irão existir em um estado planctônico ou sésil (Geesey, 1993).

As bactérias aderidas a superfícies sólidas formam uma camada lodosa escorregadia, constituindo os biofilmes bacterianos. Esses biofilmes estão presentes na maioria das superfícies molhadas ou úmidas, encontradas na natureza e também em ambientes industriais e médicos. Os biofilmes bacterianos atingem dimensões compatíveis para observação a olho nu e, possivelmente, essas comunidades microbianas tenham sido as primeiras a serem estudadas na área da Microbiologia. Em 1684, Antonie van Leeuwenhoek raspou a placa bacteriana de seus dentes e observou, com seu microscópio primitivo, a presença dos "*animalculi*". Suas observações foram confirmadas por outros pesquisadores, mas a compreensão da natureza e da importância desses minúsculos organismos demorou a ser esclarecida. A partir do século XIX, o químico francês Louis Pasteur provou que a vida não era fruto da geração espontânea e desenvolveu métodos para controlar o crescimento microbiano. Já o físico alemão Robert Koch criou critérios experimentais que serviram como base para o estudo de microrganismos infecciosos e desenvolveu o primeiro método para o crescimento de culturas puras de microrganismos (revisto em Madigan e cols., 1997; revisto

em Costerton e cols., 1999). Entretanto, somente a partir da década de 70 o modo de existência sésil das bactérias sob a forma de biofilmes foi compreendido como sendo o maior componente da biomassa bacteriana (Geesey e cols., 1977). Estudos mais recentes vêm demonstrando que a adesão bacteriana ocorre de uma forma bastante organizada obedecendo a princípios de especificidade e sinalização celular (revisto em Costerton e cols., 1999).

## **1.2. Definição, estrutura e fisiologia de biofilmes bacterianos**

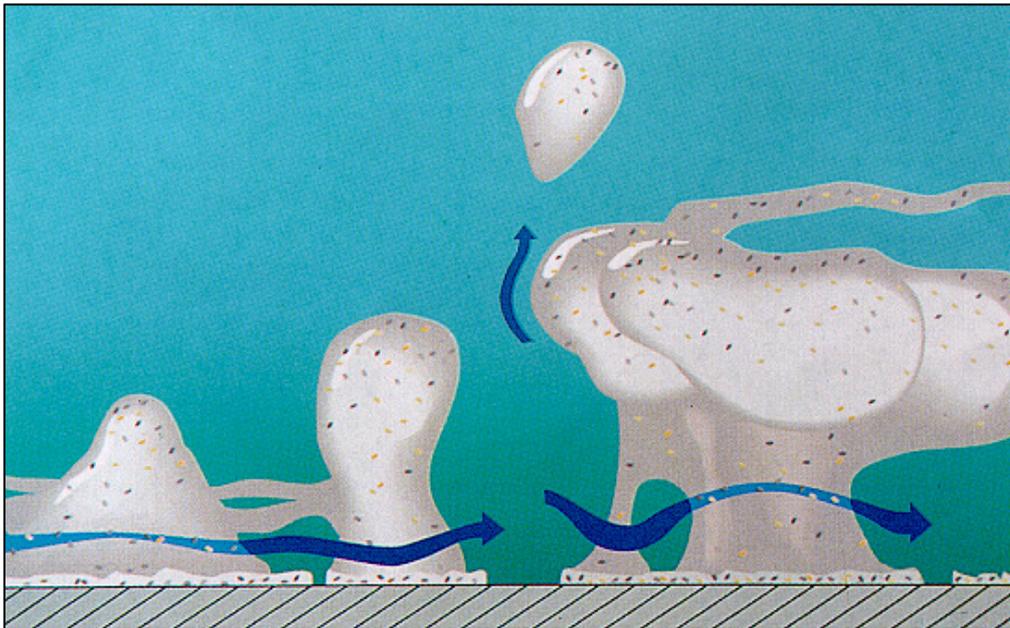
Os biofilmes bacterianos são estruturas constituídas por comunidades de bactérias aderentes entre si e/ou a superfícies inertes ou vivas (existência sésil), envolvidas por matriz extracelular altamente hidratada (Costerton e cols., 1994, 1995, 1999; Coutinho e cols., 1994). A superfície do biofilme é bastante adsortiva devido a sua natureza polieletrólítica, capaz de reter quantidades significantes de compostos orgânicos e inorgânicos do meio (Characklis, 1981; Nivens e cols., 1995). Aproximadamente 80% - 90% da massa total dos biofilmes é constituída por água. As bactérias representam cerca de 70% do peso seco, enquanto o restante é atribuído aos elementos de matriz extracelular (Marsh e Bradshaw, 1995).

Nos estágios iniciais de formação do biofilme, as bactérias sésseis encontram-se justapostas, podendo formar microcolônias de espécies simples ou mistas (Costerton e cols., 1995). A microcolônia é a organização básica do biofilme em crescimento, podendo ser comparado ao tecido como organização fundamental na formação dos órgãos de organismos superiores. O ambiente interno de cada microcolônia é condicionado pelos elementos de matriz extracelular e pela atividade metabólica de suas células. Os biofilmes possuem um alto grau de organização, onde as bactérias se beneficiam da justaposição estável e da cooperatividade fisiológica para constituir uma comunidade coordenada funcionalmente (Costerton e cols., 1987, 1995). Sabe-se, por exemplo, que essas populações microbianas aderidas se beneficiam dos nutrientes e são mais ativas metabolicamente do que as planctônicas (Ferris e cols., 1989).

A arquitetura dos biofilmes é formada por estruturas cônicas simples e por outras em forma de cogumelo (Figura 1). Essas estruturas formam poros e canais de água, pelos quais podem circular os nutrientes entre as microcolônias (DeBeer e cols., 1994; Costerton, 1995; Costerton e cols., 1995, 1999; Stoodley e cols., 1999). As células em diferentes regiões de um biofilme podem exibir diferentes padrões de expressão genética (Davies e cols., 1998; Costerton e cols., 1999).

A formação de biofilmes sobre superfícies é uma estratégia bacteriana universal para sobrevivência e posicionamento favorável em relação aos nutrientes disponíveis (Costerton e cols., 1987). Constitui, também, uma forma protegida de crescimento que permite a

**Figura 1**  
**Representação esquemática da estrutura do biofilme bacteriano**  
(Extraído de Costerton e cols., 1999)



O modelo acima representado contempla aspectos estruturais e fisiológicos de um biofilme bacteriano aderido a uma superfície sólida. A figura mostra estruturas cônicas e em forma de cogumelo, perfuradas na sua extremidade inferior por canais pelos quais circulam fluido e nutrientes. As bactérias organizam-se em microcolônias imersas em grande quantidade de matriz extracelular. Porções mais superficiais do biofilme se desprendem, com conseqüente limitação do crescimento do biofilme e colonização de novas regiões da superfície.

sobrevivência das bactérias em ambientes hostis (Costerton e cols., 1999).

### **1.3. Adesão bacteriana e componentes da matriz extracelular**

A adesão bacteriana varia desde dentes e intestino humano, a superfícies metálicas de tubos condensadores expostos a um fluxo turbulento de água (Characklis, 1981). As bactérias aderem a um substrato sólido através de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), fabricadas e orientadas pela célula, que se estendem desde a superfície dos microrganismos para formar uma matriz extracelular emaranhada e altamente hidratada (Costerton e cols., 1987, 1995). A matriz extracelular pode atuar como uma resina de troca iônica, extraindo moléculas orgânicas e íons inorgânicos do meio ambiente e produzindo uma concentração de nutrientes favorável dentro do biofilme (Costerton e cols., 1987). Atribui-se o nome glicocálice às SPE intimamente associadas à parede celular e ao corpo das células bacterianas. O glicocálice possui um limite definido e permanece aderido à célula em suspensão após procedimentos de centrifugação (que permite separar células de suas SPE presentes no sobrenadante de cultura), a não ser que sejam empregados tratamentos severos para sua remoção (revisto em Fassel e Edmiston Jr., 1999).

SPE são compostas, principalmente, por polissacarídeos entre outros constituintes como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Sutherland, 1985; Whitfield, 1988; Allison, 1998; Beech, 1999a). Os polissacarídeos que constituem SPE, em sua maioria, possuem cargas negativas, podendo também não possuir carga ou, raramente, serem carregados positivamente (Neu e Poralla, 1990). O composto catiônico vermelho de rutênio tem sido amplamente utilizado para preservar e mostrar detalhes ultra-estruturais dos exopolímeros bacterianos (revisto em Fassel e Edmiston Jr., 1999). SPE encontram-se densamente concentradas ao redor das microcolônias bacterianas e são responsáveis por imobilizá-las na superfície, assim como por facilitar o arranjo espacial e a comunicação entre esses grupos celulares através dos canais de água formados por elas. Essas substâncias atuam como uma barreira de difusão entre as células e o meio e funcionam como um fator de proteção das bactérias contra, por exemplo, o efeito letal de biocidas, de antibióticos e de agentes surfactantes, ataque de bacteriófagos, entre outros (Costerton e cols., 1987, 1994, 1995; Sutherland e cols., 1999). A penetração e a reatividade dos agentes antimicrobianos variam com o tamanho da malha e com as características químicas das SPE (Lawrence e cols., 1994; Costerton e cols., 1995; Sutherland e cols., 1999).

#### 1.4. Formação e organização de biofilmes bacterianos

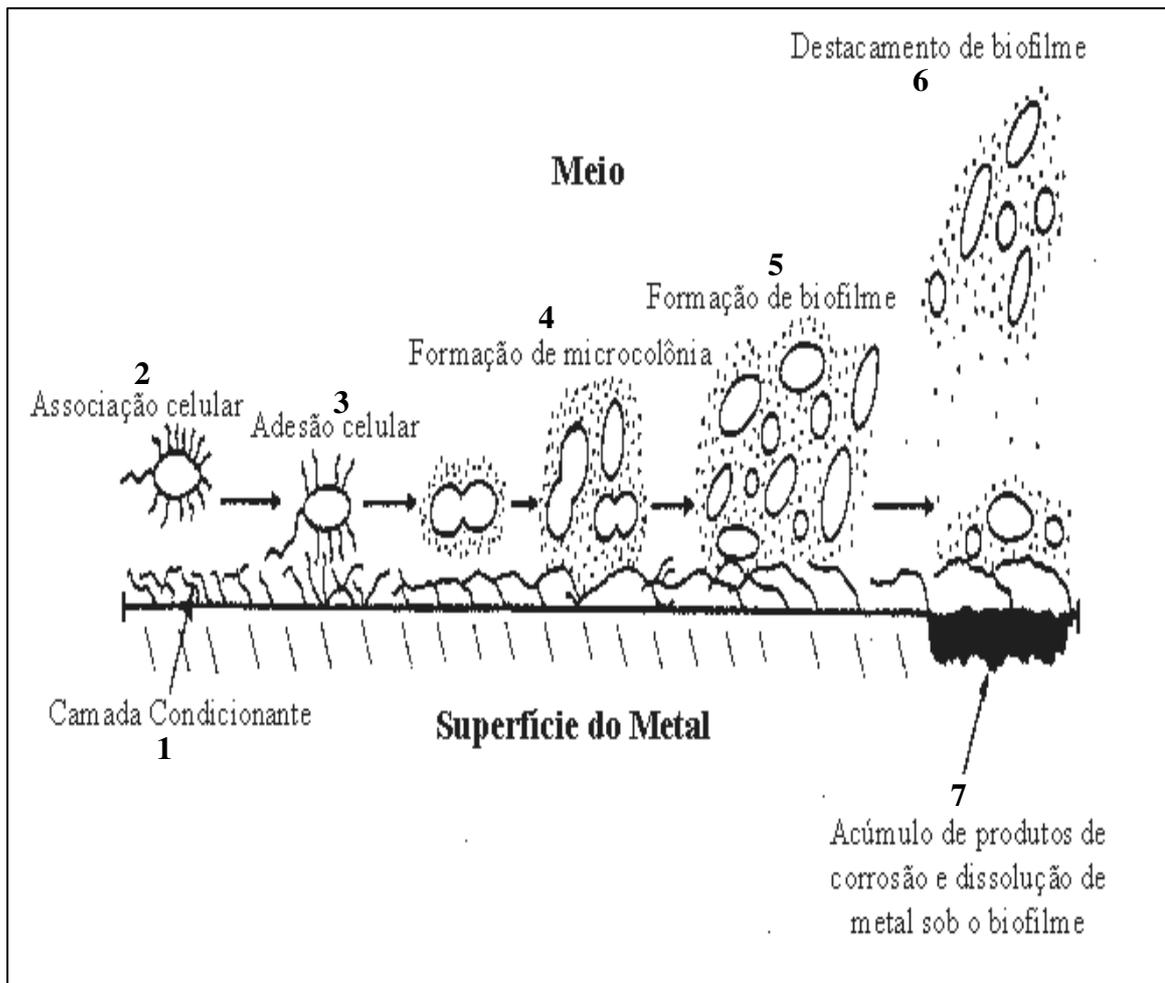
A partir do momento em que um material inerte é imerso em um ambiente líquido, sua superfície sofre grandes mudanças, a começar pela adsorção de compostos químicos inorgânicos. Em ambientes biologicamente ativos, há aderência de moléculas orgânicas (camada condicionante) e de bactérias, dando início ao processo de formação do biofilme bacteriano. O biofilme bacteriano pode atingir dimensões macroscópicas através da aderência de outros microrganismos (algas, fungos e protozoários) e/ou de macrorganismos (cracas, mexilhões, etc.) adquirindo a denominação de "biofouling". O termo "fouling" (incrustação, acumulação de resíduos, depósitos, sujeira, etc.) está relacionado à formação indesejável de depósitos orgânicos e/ou inorgânicos em superfícies, podendo causar problemas como, por exemplo, diminuição do fluxo de calor através de uma superfície e o aumento de sua taxa de corrosão (Characklis, 1981).

O processo de formação de um biofilme bacteriano pode ser subdividido em vários estágios (Figura 2), obedecendo à seguinte ordem (Characklis, 1990; Coutinho e cols., 1993; Coutinho e cols., 1994; Beech e cols., 1996; Geesey, 1993; Allison e cols., 1999):

1. Formação da camada condicionante por moléculas orgânicas que se transferem do líquido para a superfície sólida.
2. Colonização ou adesão da superfície por bactérias planctônicas e começo da existência sésil pela excreção de produtos de matriz extracelular, que ancoram as células à superfície de uma forma geralmente irreversível.
3. Replicação de diferentes espécies de bactérias sésseis sobre a superfície do metal.
4. Crescimento das microcolônias e eventual estabelecimento de relações próximas entre elas na superfície. Nesta fase, o biofilme aumenta em espessura e as condições em sua base são alteradas.
5. Desprendimento de porções do biofilme.
6. Recolonização de áreas adjacentes e expostas da superfície por bactérias planctônicas ou por bactérias sésseis.

Durante os primeiros estágios de desenvolvimento, um biofilme é composto das espécies bacterianas pioneiras que se aderem à camada de condicionamento adsorvida à superfície e essas bactérias encontram-se distribuídas de forma heterogênea. Em questão de minutos, algumas das espécies aderidas produzem SPE que envolvem as células e se estendem da superfície celular até o substrato em contato com o meio. Neste estágio do desenvolvimento, o biofilme costuma ser menor que 10µm em espessura e costuma apresentar uma matriz descontínua de exopolímeros intercalada com células (Geesey, 1993). Como as células sésseis do biofilme continuam replicando e excretando mais SPE, o biofilme forma

**Figura 2**  
**Formação de um biofilme bacteriano sobre a superfície metálica**  
(Extraído e adaptado de Beech e cols., 1996)



Em um ambiente aquoso e biologicamente ativo, a adsorção de moléculas orgânicas sobre o metal forma uma camada condicionante e é seguida pela associação (reversível) e adesão (irreversível) bacterianas. As bactérias crescem aderidas ao substrato e formam microcolônias que, em conjunto, constituem os biofilmes. Porções do biofilme podem se destacar, o que limita seu crescimento e resulta na colonização de novas áreas da superfície metálica. A presença continuada de certos tipos de biofilme sobre o metal pode provocar corrosão localizada, o que caracteriza o processo da biocorrosão.

uma camada confluyente de crescente espessura sobre a superfície. Com o passar do tempo, espécies de bactérias planctônicas e partículas inorgânicas entranham-se no biofilme e contribuem para o crescimento de uma comunidade de grande complexidade. Nesse estágio, o biofilme é considerado maduro. Sua morfologia e consistência variam dependendo dos tipos de bactérias presentes e das condições do meio que o envolve. O tempo necessário para a formação de um biofilme maduro pode variar de alguns dias até várias semanas. Com o aumento da espessura do biofilme, fica prejudicada a difusão de gases dissolvidos e outros nutrientes vindos do meio para o substrato. Nesse caso, as condições podem se tornar inóspitas para as bactérias localizadas na base do biofilme, e que se encontram distantes dos canais de água; como consequência, essas bactérias acabam morrendo. A competição por nutrientes também faz com que sejam perdidas muitas das vantagens da vida protegida dentro dos biofilmes. As células mais superficiais tendem a se desprender, indo colonizar novas áreas. O deslocamento das bactérias para novas áreas também serve para dispersar o genótipo e, portanto, para expandir a diversidade genética. Com a necessidade nutricional e com a base do biofilme abalada devido à morte de bactérias, o estresse causado pelo fluxo do meio e mecanismos de sinalização celular denominados "quorum sensing" (sensibilidade à densidade celular, ou ao quorum) atuam em conjunto para que ocorra o desprendimento de partes do biofilme, expondo áreas descobertas na superfície. O "quorum sensing" é causado por um acúmulo de moléculas de baixo peso molecular que, uma vez atingindo uma concentração limiar crítica, constituem sinais para que células individuais "sintam" que o limite da densidade populacional bacteriana foi atingido e iniciem uma resposta coordenada pela população (Fuqua e cols., 1994). Allison e cols., em 1998, mostraram que N-acil homoserina lactonas têm participado do processo de desprendimento de células por "quorum sensing" em biofilmes formados por *P. fluorescens*. As áreas que se tornam expostas após o desprendimento são, subseqüentemente, recolonizadas e novas bactérias e suas SPE dão continuidade ao biofilme existente. Esse fenômeno de instabilidade ocorre mesmo quando as condições físicas no líquido permanecem constantes.

### **1.5. Métodos microscópicos para estudo de biofilmes**

O conhecimento sobre os biofilmes tem sido adquirido através de observações microscópicas e por análises bioquímicas e taxonômicas destrutivas, ou seja, que alteram sua estrutura. A microscopia óptica convencional pode fornecer informações sobre a extensão da superfície coberta (colonizada), distribuição dos microrganismos e atividade fisiológica. Entretanto, seu uso é limitado quando se estuda biofilmes maduros, onde a natureza tridimensional da comunidade mascara a observação dos microrganismos constituintes

(Fletcher, 1994). A microscopia eletrônica trouxe um avanço considerável para a Microbiologia e é uma técnica muito utilizada para o estudo dos biofilmes. Devido ao seu alto poder de resolução (0,2 nm) é possível obter informações detalhadas sobre a distribuição e ultra-estrutura das células. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV), além das análises ultra-estruturais convencionais, oferecem, como apoio metodológico, análises de imagens espectroscópicas (ESI) e microanálises de raios-X (EDS), respectivamente. Estas técnicas representam eficientes ferramentas para a localização e identificação de elementos químicos presentes nas moléculas das SPE, na estrutura das bactérias e em outros elementos do biofilme bacteriano.

Um grande avanço na instrumentação microscópica com potencial para estudo de biofilmes bacterianos é o microscópio óptico confocal de varredura a laser (Costerton e cols., 1995). O confocal é um microscópio de epifluorescência de alta tecnologia que permite a realização de cortes ópticos (~3µm) horizontais e verticais, onde são excluídos aqueles que se encontram fora de foco. Através do confocal podemos documentar a morfologia e fisiologia do biofilme sob condições *in situ* (Palmer e Sternberg, 1999), em termos de espessura, área de superfície colonizada, densidade bacteriana e tempo de colonização do substrato sólido. A organização tridimensional do biofilme pode ser estudada correlacionando-a com outras informações, tais como: composição de espécies, relação com o substrato, estado fisiológico das bactérias, entre outros. A observação direta de populações microbianas e atividade biológica são necessárias para proporcionar informação exata em dinâmicas de agregação celular, processos metabólicos, resistência a agentes microbianos ou predadores dentro de uma estrutura de biofilme funcional. Análises de biofilmes microbianos podem ser realizadas através da utilização de uma grande variedade de sondas fluorescentes.

## **2. Bactérias redutoras de sulfato**

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) foram descritas pela primeira vez, em 1895, por Beijerinck (revisto em Postgate, 1984) e constituem um grupo taxonomicamente diverso de procariotos anaeróbios estritos, que utilizam preferencialmente o sulfato (ou outros oxianions como o sulfito e o tiosulfato) como aceptor terminal de elétrons. O sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) funciona como um agente oxidante para a degradação de compostos orgânicos, assim como os organismos aeróbios usam o oxigênio na respiração convencional (Postgate, 1984; Gibson, 1990; Barton e Tomei, 1995; Hamilton, 1998).

As BRS contribuem para inúmeras funções essenciais em muitos ambientes anaeróbios. Além de sua importância no ciclo do enxofre, essas bactérias são importantes reguladoras de vários processos em solos alagados, incluindo a renovação de matéria

orgânica, biodegradação de poluentes aromáticos clorados em solos e sedimentos anaeróbios e a metilação de mercúrio (Fauque, 1995; Barton e Tomei, 1995). Baseado em análises de seqüências de rRNA, as BRS podem ser divididas em quatro grupos distintos: BRS mesófilas gram-negativas (m-BRS); BRS gram-positivas formadoras de esporos; BRS termófilas pertencentes ao domínio Bactéria e BRS termófilas pertencentes ao domínio Archaea (Castro e cols., 2000). Esses microrganismos possuem uma grande variedade morfológica (Barton e Tomei, 1995) e constituem um grupo fisiológico bastante complexo. Várias propriedades têm sido usadas nos esquemas tradicionais de classificação (Tabela 1), sendo as mais importantes: forma da célula, motilidade, conteúdo de guanina e citosina (GC) no DNA, presença de desulfovirdina e citocromos, temperatura ótima e oxidação completa *versus* incompleta de acetato (Castro e cols., 2000).

O gênero mais conhecido é *Desulfovibrio*, que é comum em ambientes aquáticos e solos alagados, ricos em material orgânico e contendo níveis suficientes de sulfato. *Desulfotomaculum* é encontrado principalmente no solo e é formado por bastões capazes de formar esporos. Esse gênero possui algumas espécies termófilas. Os outros gêneros de BRS são naturais de ambientes anóxicos de água doce ou marinho; *Desulfomonas* foi isolado do intestino de mamíferos (Madigan e cols., 1997; Castro e cols., 2000).

A redução de sulfato ocorre no meio intracelular, logo após sua ativação pela reação com ATP, dando origem a adenosina fosfosulfato (APS). Desta forma, o sulfato deve ser transportado através da membrana citoplasmática, convertido em APS, para então ser reduzido a sulfito, numa transferência de dois elétrons ( $E_0$  -60mV), e este reduzido a sulfeto ( $E_0$  -116mV) (Hansen, 1994; Hamilton, 1998). Uma pequena quantidade de enxofre reduzido é assimilada pela BRS, mas a grande maioria é liberada para o meio ambiente como íons sulfeto que, normalmente, são hidrolisados a sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) livre (Postgate, 1984). BRS necessitam de uma baixa diferença de potencial redox no meio para sobrevivência, e como uma consequência direta desses valores relativamente baixos existe uma disponibilidade limitada de energia produzida quando ocorre a oxidação do substrato (Hamilton, 1998).

Além da utilização de sulfato como aceptor de elétrons, muitas BRS podem crescer usando nitrato ( $NO_3^-$ ) como aceptor terminal, reduzindo-o a amônia ( $NH_3$ ), ou podem usar certos compostos orgânicos para produção de energia por vias fermentativas em completa falta de sulfato ou outros aceptores terminais de elétrons. O composto fermentável mais comum é o piruvato, que é convertido a acetato,  $CO_2$  e  $H_2$ . Com lactato ou etanol, a energia produzida não é suficiente para fermentação e, nesse caso, o sulfato é necessário. A importância do sulfato como aceptor de elétrons foi demonstrada em um estudo comparativo

do crescimento de BRS em piruvato com e sem sulfato (Madigan e cols., 1997). Na presença do sulfato, o crescimento é maior considerando a maior quantidade de energia disponível quando a utilização do piruvato está acoplada à redução do sulfato.

Tabela 1

**Classificação de BRS com base em características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas** (Extraída e adaptada de Castro e cols., 2000)

Divisão filogenética de acordo com análises de seqüências de rRNA	Forma	Motilidade	DNA (% GC) <sup>a</sup>	Desulfoviridina	Citocromos	Oxidação de acetato	Temperatura de crescimento (°C)
<b>BRS mesófilas gram-negativas</b>							
<i>Desulfobulbus</i>	limão-bastão	-/+	59-60	-	b, c, c <sub>3</sub>	I <sup>a</sup>	25-40
<i>Desulfomicrobium</i>	oval-bastão	+/-	52-67	-	b, c	I	25-40
<i>Desulfomonas</i>	bastão	-	66	+	c	I	30-40
<i>Desulfovibrio</i>	espiral-vibrióide	+	49-66	+/-	c <sub>3</sub> , b, c	I	25-40
<i>Desulfobacter</i>	oval-bastão	+/-	44-46	-		C <sup>b</sup>	20-33
<i>Desulfobacterium</i>	oval-bastão	+/-	41-52	-	b, c	C	20-35
<i>Desulfococcus</i>	esférica ou limão	-/+	46-57	+/-	b, c	C	28-35
<i>Desulfomonile</i>	bastão	-	49	+	c <sub>3</sub>	C	37
<i>Desulfonema</i>	filamentos	deslizamento	35-42	+/-	b, c	C	28-32
<i>Desulfosarcina</i>	bastões ovais ou cocóides, pacotes	+/-	51	-	b, c	C	33
<b>BRS gram-positivas formadoras de esporos</b>							
<i>Desulfotomaculum</i>	bastões retos ou curvos	+	48-52	-	b, c	I/C	a maioria 25-40 algumas 40-65
<b>BRS termófilas bacterianas</b>							
<i>Thermodesulfobacterium</i>	vibrióide-bastão	-/+	30-38	-	c <sub>3</sub> , c	I	65-70
<b>BRS termófilas arqueanas</b>							
<i>Archaeoglobus</i>	cocóide	+/-	41-46	-	n.d. <sup>c</sup>	I	64-92

<sup>a</sup>I, incompleto.

<sup>b</sup>C, completo.

<sup>c</sup>n.d., não documentado.

BRS podem oxidar mais de uma centena de compostos e a maioria deles são produtos típicos de fermentação e produtos que não foram completamente quebrados tais como certos aminoácidos, glicerol e ácidos graxos. Entretanto, essas bactérias podem utilizar outros compostos como fonte de energia, dentre os quais podemos citar: hidrogênio molecular (reação catalisada por hidrogenases de superfície), álcoois, aldeídos, açúcares, gás carbônico e

até hidrocarbonetos (Gibson, 1990; Hansen, 1994). Elas também necessitam de outros nutrientes complementares como nitrogênio, fósforo e ferro para seu crescimento.

A anaerobiose obrigatória das BRS e sua nutrição relativamente restrita asseguram que sejam sempre encontradas como componentes de uma comunidade ou consórcio microbiano. Esses consórcios são, freqüentemente, encontrados na forma de biofilmes, em interfaces ou sobre substratos sólidos, e permitem a criação de microambientes anaeróbios dentro de um ambiente aeróbio (Hamilton, 1985, 1998).

Apesar de serem anaeróbias, BRS podem circular (provavelmente em um estado latente) em águas aeradas, incluindo aquelas tratadas com cloro e outros agentes oxidantes, até encontrarem um local apropriado para sobrevivência. Existem evidências de que algumas cepas de BRS podem tolerar baixos níveis de oxigênio (Tatnall, 1993; Hamilton, 1998). BRS podem, também, crescer em grandes variações de temperatura (da psicofilia à hipertermofilia) e de osmolaridade (da água doce às águas hipersalinas) (Hansen, 1994).

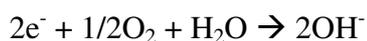
### 3. O envolvimento de bactérias redutoras de sulfato em processos de corrosão

#### 3.1. Corrosão

A corrosão é um fenômeno comum para todos os metais em ambientes aquosos ou úmidos e significa a deterioração de um material por fatores químicos ou eletroquímicos (Gentil, 1996). No fenômeno da corrosão é necessário que se forme uma célula eletrolítica (sistema eletroquímico composto por um anodo e um catodo em contato elétrico e imerso em um eletrólito), ou seja, que ocorra pelo menos uma reação de oxidação (oxidação do metal para seu estado iônico) e pelo menos uma reação de redução, com fluxo de elétrons através do metal (Tatnall, 1993; Hamilton e Lee, 1995). O local onde ocorre a oxidação (corrosão do metal) é chamado de anodo e é representado pela seguinte reação:



Essa meia reação tem que ser balanceada por uma reação catódica (no catodo) equivalente envolvendo a redução de um acceptor de elétron. O oxigênio é o acceptor catódico clássico nesse caso:



A oxidação, a redução e o fluxo de elétrons devem ocorrer para que aconteça corrosão, ou seja, se uma dessas reações deixar de acontecer, o processo de corrosão será paralisado (Tatnall, 1993). Em ambientes aquosos aerados, oxigênio e água são catódicos, ganhando elétrons do metal para formar íons hidroxilas, enquanto em ambientes aquosos desaerados, íons hidrogênio são catódicos, ganhando elétrons para formar hidrogênio gasoso (revisto em

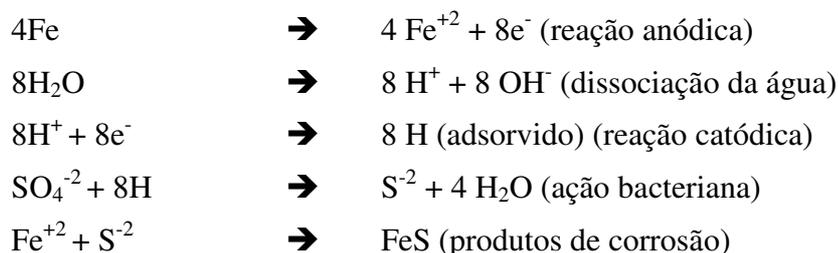
Araújo-Jorge e cols., 1992, Figura 3).

O acúmulo de produtos das reações catódicas e anódicas na interface metal/eletrólito tende a diminuir a taxa de corrosão do metal, processo denominado polarização. No entanto, a corrosão pode ser acelerada na presença de reações secundárias que levam à despolarização da célula eletrolítica e, conseqüentemente, à dissolução do metal (Lee e cols., 1995). Há vários modos nos quais uma célula eletrolítica pode ser estabelecida, por exemplo: (1) quando dois metais diferentes estão em contato elétrico; (2) dentro de uma estrutura metálica simples, onde diferentes áreas de sua superfície desenvolveram potenciais eletroquímicos diferentes. O segundo exemplo pode estar relacionado à presença de inclusões no metal, imperfeições da superfície ou presença de células de aeração diferencial e, em todos os casos, o oxigênio possui diferentes concentrações em relação à superfície do metal (Hamilton, 1985; Tatnall, 1993).

### 3.2. Corrosão influenciada por microrganismos

Corrosão influenciada por microrganismos (CIM) ou biocorrosão é qualquer processo de corrosão localizada causado por modificação microbiana das características químicas locais de uma superfície, tanto em meios aerados, como em meios desaerados (Tiller, 1983; Araújo-Jorge e cols., 1992; Angell, 1999). Quando a CIM se dá em condições anaeróbicas ocorrendo a valores de pH neutro é, geralmente, atribuída à ação das BRS (Iverson, 1985; Araújo-Jorge e cols., 1992, Figura 3).

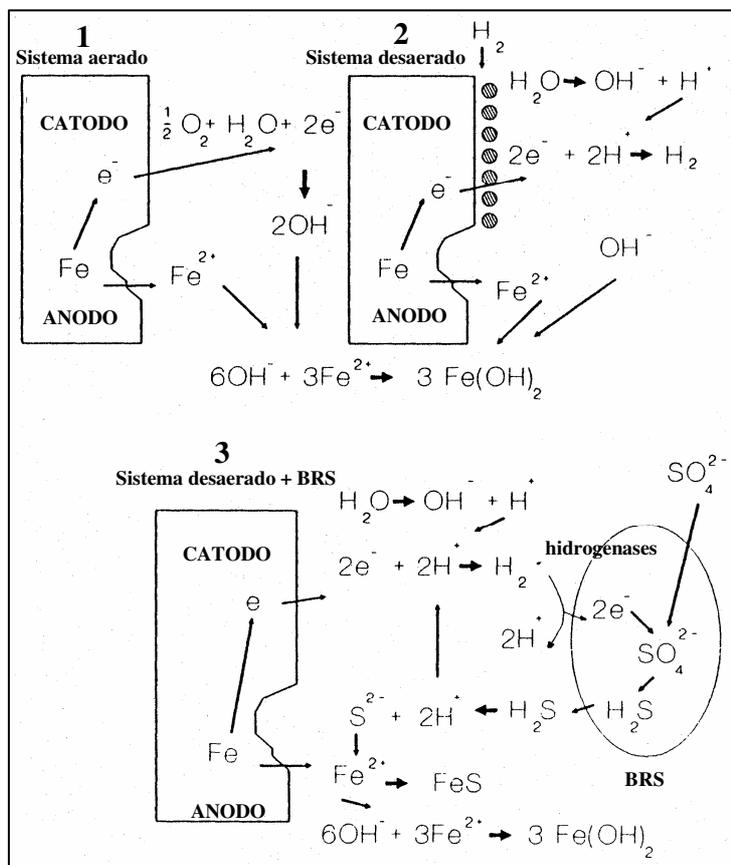
As BRS têm sido o principal foco da maioria das investigações sobre corrosão microbiológica e Van Wolzogen Kuhr e Van der Vlugt (1934) (revisto em Lee e cols., 1995) sugeriram as seguintes reações eletroquímicas para o processo de CIM:



Essa reação global foi descrita como despolarização catódica, baseado na teoria que as BRS removem o hidrogênio que se acumula sobre a superfície do ferro.

Em revisões sobre o tema, Aguiar (1991) e Araújo-Jorge e cols. (1992) sugeriram que a participação das BRS nos mecanismos de corrosão se dá por três vias. A primeira, direta, por

**Figura 3**  
**Corrosão em ambientes aquosos na presença e ausência de BRS**  
 (Extraído de Araujo-Jorge e cols., 1992)



Mecanismos propostos para corrosão em ambientes aquosos na ausência de BRS (1,2) em meios aerado (1) e desaerado (2), ou na presença de BRS em meio desaerado(3).

uma necessidade metabólica de BRS. Suas hidrogenases de superfície consomem o filme de  $H_2$  que se forma na região catódica, como consequência da reação dos elétrons ( $e^-$ ) derivados do metal com íons  $H^+$  resultantes da dissociação iônica da água. Esse consumo de  $H_2$  desloca a reação de dissociação iônica da água, atraindo mais  $e^-$  que regeneram a formação de  $H_2$  e liberando mais  $Fe^{2+}$  na região anódica (perda de massa). A segunda, também direta, pelos produtos metabólicos das BRS, que colocam em solução o  $H_2S$  (sulfeto de hidrogênio) que, por sua vez, reage com  $Fe^{2+}$  formando sulfeto de ferro, e que gera mais íons  $H^+$ , que aceleram o consumo de elétrons na região catódica. A terceira, indireta, por gerar zonas de aeração diferencial sobre o metal, com a deposição de elementos de matriz extracelular e a formação irregular do biofilme. Desta forma, todos fenômenos observados de CIM (Figura 3) são reações comuns de corrosão (Sasaki, 1997).

A corrosão relacionada às BRS está, invariavelmente, associada com a formação de biofilmes em superfícies metálicas (Figura 2). Condições anaeróbicas locais favoráveis ao crescimento dessas bactérias podem surgir na forma de consórcios microbianos mistos em sistemas industriais (Lee e cols., 1995; Beech e cols. 1996). O padrão de corrosão característico da ação das BRS sobre o aço é a corrosão localizada denominada "pitting", com os "pits" (buracos) sendo formados e preenchidos por produtos de corrosão de cor negra na forma de sulfetos de ferro (Hamilton, 1985). A taxa e a extensão dos processos de CIM são criticamente afetadas pela natureza química e física dos produtos de corrosão precipitados (sulfetos de ferro) e pelo acesso de oxigênio ao sistema (Hamilton, 1998). Essas taxas de corrosão parecem não estar diretamente relacionadas com a biomassa total ou com o número de espécies microbianas e sim, com as espécies envolvidas, fontes de carbono e de metal usadas (Cheung e cols., 1994; Cheung, 1995). SPE sintetizadas por diferentes cepas de BRS podem contribuir para o processo de corrosão, não somente por facilitar a adesão celular irreversível e conseqüente colonização de superfícies metálicas, como também por suas características de ligação a íons metálicos (Beech e Cheung, 1995).

Apesar de BRS ser o principal grupo associado aos processos corrosivos por constituir biofilmes e gerar produtos metabólicos corrosivos como o  $H_2S$ , outros grupos de bactérias também devem ser considerados, por contribuir direta ou indiretamente para a corrosão dos materiais. Por exemplo, bactérias produtoras de ácido, sob a forma de consórcios microbianos mistos, tendem a exercer um processo sinérgico com BRS, o que potencializa a corrosão (Jack e Westlake, 1995; Hamilton, 1998). Algumas espécies produtoras de ácidos têm a característica de formar ácidos orgânicos, a partir da oxidação de hidrocarbonetos, que são nutrientes para as BRS e corrosivos ao aço. Outros grupos (bactérias facultativas) criam condições adequadas ao desenvolvimento das espécies anaeróbias (BRS, por exemplo) à

medida que consomem o oxigênio do meio durante o seu metabolismo.

### **3.3. A corrosão influenciada por microrganismos (CIM) na indústria do petróleo**

A influência das BRS na indústria do petróleo tem atraído muito interesse, principalmente no que diz respeito aos problemas causados pela biocorrosão de estruturas metálicas de plataformas marinhas, dutos de transporte, além da acidificação *in situ* de reservatórios de petróleo (Gibson, 1990; Morris e cols., 1995; Hamilton, 1998).

A extração de petróleo pode ser feita em plataformas marítimas de duas formas. Na recuperação primária, a pressão no reservatório de óleo é suficiente para induzir o fluxo de petróleo através do poço. Na recuperação secundária, essa pressão natural é muito baixa e, portanto, um sistema de injeção de água é usado para fornecer a força adicional necessária para a recuperação do óleo. A água do mar é retirada de locais próximos à plataforma, desaerada para prevenir a corrosão pelo oxigênio, tratada, filtrada e injetada para manter a pressão do reservatório (água de injeção). No reservatório, a água de injeção mistura-se com a água residual existente no próprio poço (água de formação). O ambiente anaeróbico, rico em sulfato e nutrientes, criado no interior do sistema de recuperação secundária de petróleo, favorece o crescimento bacteriano, em particular das BRS que se aderem à superfície metálica das tubulações, com conseqüente instalação de processos de corrosão. Na indústria do petróleo, além do sistema de água de injeção, a corrosão influenciada por microrganismos (CIM) provoca deterioração de estruturas de aço, cabos submersos em água, oleodutos, tanques de estocagem de óleo e sistemas de resfriamento (Hamilton, 1983; revisto em Araújo-Jorge e cols., 1992).

A biocorrosão de metais tem conseqüências econômicas importantes, sendo as BRS responsáveis por 50% dos casos dos processos corrosivos em sistemas de perfuração, recuperação, transporte e armazenamento de petróleo (Hamilton, 1985). Como uma maneira de quantificar a escala do problema é dar uma estimativa de custos, tanto de oleodutos e equipamentos danificados como de manutenção preventiva, é quase impossível sugerir algo além de cifras e números aproximados (Aguiar, 1998). Faltam dados para uma estimativa atual dos gastos, mas os números apresentados no passado são impressionantes e demandam atenção. Para o Reino Unido, os gastos para a indústria do petróleo devidos à corrosão microbiana são de 300 a 500 milhões de libras esterlinas por ano (Tiller, 1983; Hamilton, 1985). Uma pesquisa detalhada realizada nos EUA indicou que a biocorrosão custa à indústria daquele país entre 16 e 18 bilhões de dólares por ano (National Bureau of Standards, 1978). No Brasil, nos sistemas de injeção de água para recuperação secundária de petróleo das plataformas da Bacia de Campos, o custo anual médio com biocidas, em 1989, estava em

torno de 6,5 milhões de dólares. Deve-se enfatizar, entretanto, que os dados acima não incluem o custo da poluição ao meio ambiente. A corrosão provocada por BRS é localizada (formação de "pits"), sendo de difícil previsão e, no caso de vazamento de óleo por perfurações na tubulação, além da conseqüente perda de produção, resultaria em grandes danos ambientais para a vida. Embora não tenham sido relacionados à CIM, recentemente, dois grandes vazamentos de óleo, causados pelo rompimento de tubulações da PETROBRAS, deram uma real dimensão do problema. Os acidentes aconteceram na Baía de Guanabara - RJ (janeiro de 1999) e no Rio Iguaçu - PR (julho de 2000), derramando 1,3 e 4 milhões de litros de óleo, respectivamente. O prejuízo ecológico decorrente desses acidentes foi enorme, sendo previstos vários anos para a recuperação das áreas afetadas (Assad, 2000).

#### **4. Controle do crescimento de biofilmes na indústria do petróleo**

Na indústria do petróleo, o controle de biofilmes pode ser feito por métodos físicos e/ou através da ação de compostos químicos.

##### **4.1. Métodos físicos**

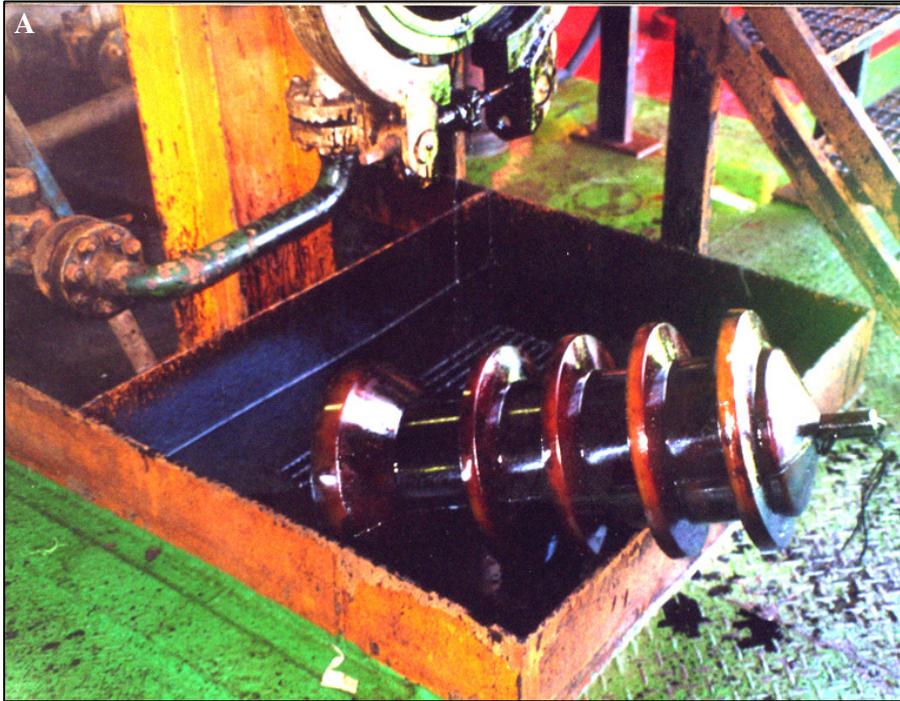
A limpeza mecânica de tubulações pode ser feita por um processo denominado "pigging" (Herbert, 1993). Nesse processo, diferentes tipos de raspadores ou dispositivos feitos de espuma de poliuretano ("pigs"), adaptados para o diâmetro da tubulação, são propelidos através do sistema por movimentos circulares na direção do fluxo d'água (Figuras 4A-C). Esses dispositivos eliminam grande parte do material incrustado (incluindo biofilmes) na superfície da tubulação (Stein, 1993; Gentil, 1996). A raspagem regular das tubulações previne a corrosão e afeta as células eletrolíticas de corrosão bacteriana, sendo necessários vários dias para que essas células se restabeleçam (Costerton e cols., 1987). Entretanto, nem sempre os métodos físicos podem ser aplicados, especialmente, quando há dificuldade operacional para uma intervenção mecânica. Após a limpeza mecânica, é comum a aplicação de agentes químicos, geralmente não-oxidantes (Gentil, 1996).

##### **4.2. Métodos químicos**

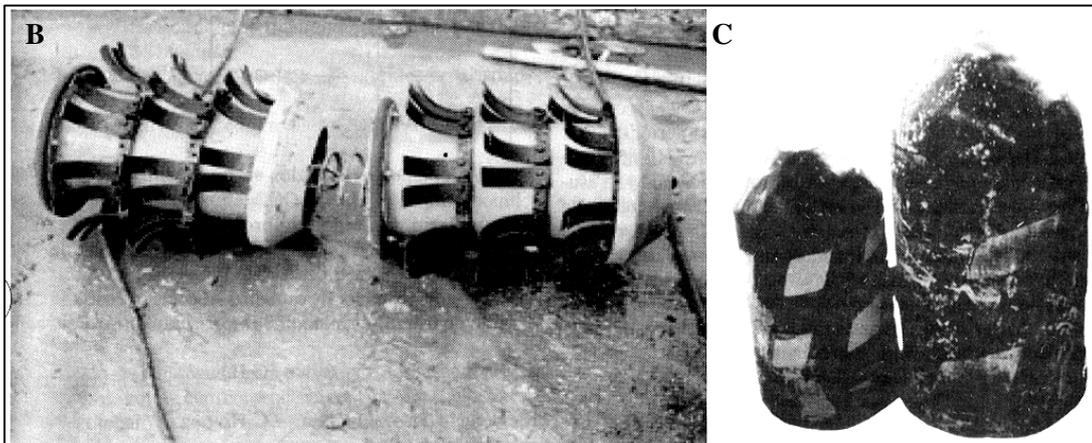
Biocidas são compostos químicos utilizados para reduzir ou prevenir contaminação microbiana e biodeterioração. Na indústria do petróleo, os biocidas têm sido, tradicionalmente, aplicados para prevenir ou atenuar a CIM e, também, para evitar o entupimento e a acidificação dos reservatórios de petróleo, causados, principalmente, pela ação das BRS (Hudgins Jr., 1992; Morris e cols., 1995).

Biocidas, freqüentemente, são parte de uma estratégia geral de controle químico que

**Figura 4**  
**Métodos físicos para limpeza de tubulações metálicas de sistemas industriais**



**A** - “Pig” flexível (“flexpig”) utilizado para limpeza de oleodutos da PETROBRAS  
(Cedido por PETROBRAS/CENPES/BIO)



**B** - “Pig” Raspador com lâminas de aço.  
(Extraído de Gentil, 1996)

**C** - “Pigs” de espuma de poliuretano.  
(Extraído de Gentil, 1996)

inclui inibidores de corrosão, aditivos antiincrustantes, seqüestrantes de oxigênio, dispersantes de óleo, quelantes de cátions divalentes e condicionadores de superfície. Esses produtos variam de acordo com a natureza das bases ativas e com os requerimentos do alvo de aplicação. A base ativa é um composto químico que se propõe a apresentar efeito biocida geral sobre um amplo espectro de bactérias e de outros organismos (Postgate, 1984; revisto em Jack e Westlake, 1995).

Os biocidas vendidos pelas companhias de suprimento químico normalmente contêm outros compostos além da base ativa, como solventes e aditivos que são adicionados à formulação com o propósito de melhorar a atividade para qual o biocida foi inicialmente formulado (Hudgins Jr., 1992).

As bases ativas podem ser efetivas para controlar o crescimento microbiano geral ou para destruir total ou parcialmente esses microrganismos. O efeito de inibição ou letalidade de uma base ativa depende de seu modo de ação, que pode ser: (1) reação com a membrana celular, aumentando a permeabilidade e perda dos constituintes celulares; (2) inativação de enzimas essenciais; (3) destruição ou inativação funcional de seu material genético (DNA e RNA) (Jack e Westlake, 1995; Gentil, 1996; Madigan e cols., 1997).

O biocida ideal deveria ter, segundo Pelczar Jr. (1997), as seguintes características:

- possuir atividade em baixas concentrações sobre um amplo espectro antimicrobiano;
- ser solúvel em água ou em outros solventes (como o óleo) em quantidade necessária ao seu uso efetivo;
- não ser tóxico para as formas de vida superiores;
- ser estável em armazenamento e possuir uma longa meia-vida;
- ser compatível com os materiais nos quais ele reagirá para protegê-los;
- ser biodegradável, ou facilmente degradável quando espalhado no meio ambiente;
- ser disponível e econômico.

O primeiro passo para o controle dos problemas associados a bactérias na indústria do petróleo é a monitoração desses microrganismos no local atingido. Entretanto, é comum o monitoramento somente de populações planctônicas, embora os processos de “fouling”, corrosão e entupimento envolvam biofilmes. O tratamento com biocidas, cujas concentrações foram testadas contra organismos planctônicos, não é necessariamente eficiente para o controle de populações do biofilme. Esta estratégia pode gerar enormes gastos em tratamentos ineficazes. Portanto, quando o objetivo do tratamento é a erradicação de biofilmes, seja em sistemas industriais ou médicos, os agentes antibacterianos devem ser testados contra as bactérias do biofilme e não apenas contra as bactérias planctônicas (Costerton e cols., 1987). Nesse sentido, amostradores removíveis inseridos na parede de tubulações industriais

produzem uma amostragem mais fidedigna da ecologia bacteriana do sistema.

A seleção de uma base ativa para um tratamento em particular, geralmente, é empírica ou baseada em experiências prévias de situações correlatas. Testes em sistemas estáticos e dinâmicos são muito utilizados pelos diversos setores da indústria para a avaliação de critérios de eficiência biocida de soluções químicas. Os testes estáticos (primários) são utilizados para uma avaliação inicial do potencial biocida, enquanto os testes dinâmicos (secundários), em geral mais sofisticados, são utilizados para pesquisar os compostos que apresentaram eficiência nos testes estáticos (Ludensky,1999).

#### **4.2.1. Formas de aplicação de biocidas**

Segundo Morris e cols. (1995) e Gentil (1996), os biocidas podem ser aplicados nas tubulações através de doses de choque, doses contínuas, ou uma combinação de ambas. Quando aplicado em uma tubulação através de doses de choque, o biocida pode ser espalhado pelo sistema usando-se uma sonda mecânica ("pig") ou através do fluxo do fluido presente na tubulação em questão (óleo, gás, água de injeção). Em algumas situações, secções das tubulações podem ser bloqueadas e preenchidas com um biocida, permitindo, desta forma, sua impregnação por dias ou semanas e, então, sua posterior remoção do sistema. Os métodos de dosagens de choque permitem a liberação do biocida concentrado no sistema mas, geralmente, envolvem tratamento de produtos residuais. A injeção contínua fornece maior exposição ao sistema, mas pode ser problemática se os microrganismos se tornarem resistentes ao biocida empregado. Se isso ocorrer, a dose deve ser aumentada ou deve-se implementar um tratamento com um biocida alternativo. Para implementar a injeção contínua numa tubulação, um injetor químico é acoplado em uma localização que forneça eficácia máxima.

#### **4.2.2. Resistência bacteriana a biocidas**

Vários fatores afetam a atividade de um biocida, tais como o tipo do organismo envolvido, a natureza química do biocida, a temperatura de contato, pH do meio ambiente e a presença de matéria orgânica (Russel, 1992). Limitação de nutrientes e taxas reduzidas de crescimento também podem alterar a sensibilidade de bactérias a biocidas (Brown e Williams, 1985; Gilbert, 1988).

Existem dois mecanismos distintos de resistência bacteriana a biocidas, adquirida e intrínseca (Russel, 1995; Russel e Day, 1996). A resistência adquirida é resultado da aquisição de plasmídios ou transposons codificando genes que conferem resistência para um agente microbiano particular, ou ainda a seleção de mutantes resistentes de uma população

que foi exposta a um agente antimicrobiano. A resistência intrínseca é uma propriedade natural controlada por cromossomos ou uma adaptação de um organismo. Em ambientes naturais, os mecanismos de resistência intrínseca podem ser mais importantes. Existem várias formas de resistência intrínseca: os aspectos morfológicos (esporos bacterianos, diferenças na parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas), o crescimento bacteriano na forma de biofilmes, tolerância fenotípica, respostas à falta de nutrientes e a outras condições de estresse, entre outros (revisto em Morton e cols., 1998).

A resistência de biofilmes bacterianos a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos está associada com a matriz extracelular (Ruseska e cols., 1982; Watkins e Costerton, 1984; Vess e cols., 1993; Allison, 1998; Sutherland e cols., 1999). Para certos biocidas, particularmente aqueles que são quimicamente reativos ou fortemente carregados, a presença de SPE impede seu acesso às células subjacentes. Para outras categorias, as SPE prolongam, por alguns segundos, o tempo gasto pelo composto para atingir níveis antimicrobianos nas áreas mais internas do biofilme. Esse efeito pode ser exacerbado quando as SPE encontram-se ligadas a enzimas capazes de degradar os biocidas. Além disso, a proximidade das células entre si dentro do biofilme permite a formação de diferentes gradientes gasosos e nutricionais, modificando a taxa de crescimento e o acesso a nutrientes, e, conseqüentemente, afetando a susceptibilidade da população do biofilme. Esses mecanismos podem estar envolvidos com a adoção de novos fenótipos resistentes a biocidas (Foley e Gilbert, 1996; Morton e cols., 1998).

#### **4.2.3. Monitoramento das aplicações de biocidas e da corrosão influenciada por microrganismos**

As populações bacterianas devem ser rotineiramente monitoradas, através das análises dos fluidos e das superfícies metálicas, e os resultados devem orientar a aplicação de biocidas, objetivando sucesso nos aspectos operacionais e econômicos. Amostras de bactérias presentes nos fluidos e nas superfícies podem ser analisadas *in situ* através de "kits" comercialmente disponíveis, ou levadas para análises laboratoriais mais complexas (Stein, 1993; Morris e cols., 1995, Jack e Westlake, 1995). Os testes realizados em laboratório para avaliar a eficiência de biocidas devem levar em consideração as características operacionais do sistema, visando-se alcançar uma reprodução cuidadosa das condições de campo (Gaylarde e Videla, 1994).

Para avaliação da eficiência de biocidas no controle de BRS na indústria do petróleo e de gás, as técnicas mais usadas são: número mais provável (NMP) e detecção da atividade bacteriana, verificada pelo enegrecimento do meio, devido à formação de sulfeto de ferro

(Postgate, 1984; Jack e Westlake, 1995). Essas técnicas requerem um tempo de quatro semanas de incubação antes que a informação necessária seja obtida (Figuras 5 e 6). Métodos alternativos foram desenvolvidos como, por exemplo, a detecção e a quantificação de BRS por medida de potencial eletroquímico da suspensão de bactérias (Figura 7), mas não têm sido empregados em larga escala (Aguilar, 1991).

#### **4.2.4. Pré-requisitos ambientais para uso de biocidas**

O impacto ambiental causado pelos biocidas deve ser levado em consideração, sendo essa a maior preocupação na pesquisa por novos biocidas (Gaylarde e Videla, 1994). A seleção de bases ativas eficazes no combate às BRS se contrapõe à preocupação com a citotoxicidade para os demais organismos marinhos e também com a saúde do operador técnico. Uma outra preocupação é com o risco de vazamento desses reagentes durante o transporte por navios ou estocagem em grandes tanques na plataforma. Numa situação extrema de vazamento, os danos ambientais seriam desastrosos, e estariam sujeitos às penas previstas pela lei CONAMA 20 de proteção ao meio ambiente (Resoluções da CONAMA, 1992). Portanto, antes de se iniciar um programa de tratamento, é importante estabelecer um plano para o descarte do biocida e também é preciso adquirir uma licença de uso. Geralmente, a licença para tratamento químico é solicitada pela agência local de meio ambiente. Os resíduos químicos e o lixo devem ser gerenciados de acordo com as regulamentações previstas pelas legislações ambientais estadual e federal. Deve-se incluir no orçamento total, para o programa de tratamento, os custos relacionados à licença e ao despejo (Morris e cols., 1995).

A avaliação da toxicidade dos compostos químicos que são despejados no mar pela indústria do petróleo é feita principalmente pelo *teste de toxicidade aquática aguda*, realizado com uma ampla variedade de organismos de água doce e de água salgada, como peixes, crustáceos, moluscos, entre outros. Neste caso, mede-se a concentração mínima do composto capaz de matar 50% de uma amostragem desses organismos (LC<sub>50</sub>). Esse teste é muito útil para o conhecimento dos efeitos gerais das soluções despejadas no mar, mas a grande variedade de procedimentos empregados impede avaliações mais precisas do efeito de cada um dos compostos químicos presente nessas soluções. Além disso, não se sabe ao certo a quantidade dos vários produtos químicos usados para tratamento nas plataformas de petróleo em todo o mundo. A maioria das companhias não reporta a quantidade dos químicos utilizados em suas operações (Hudgins, 1992). Uma fração substancial do material liberado na água é consumida de acordo com sua função específica (por exemplo, inibidores de corrosão adsorvendo à superfície metálica, sequestrantes reagindo com oxigênio, biocidas reagindo

**Figura 5**  
**Tabela do método do Número Mais Provável (NMP) usada para enumeração de BRS**

(Extraída de Harrigan e McCance, 1976)

Número de Frascos Positivos Observados em Cada Diluição			Número Mais Provável de Microrganismos por ml da Primeira Diluição
Primeira Diluição	Segunda Diluição	Terceira Diluição	
0	0	0	0
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	1	1	0,6
0	2	0	0,6
1	0	0	0,4
1	0	1	0,7
1	0	2	1,1
1	1	0	0,7
1	1	1	1,1
1	2	0	1,1
1	2	1	1,5
1	3	0	1,6
2	0	0	0,9
2	0	1	1,4
2	0	2	2,0
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	1	2	3,0
2	2	0	2,0
2	2	1	3,0
2	2	2	3,5
2	2	3	4,0
2	3	0	3,0
2	3	1	3,5
2	3	2	4,0
3	0	0	2,5
3	0	1	4,0
3	0	2	6,5
3	1	0	4,5
3	1	1	7,5
3	1	2	11,5
3	1	3	16,0
3	2	0	9,5
3	2	1	15,0
3	2	2	20,0
3	2	3	30,0
3	3	0	25,0
3	3	1	45,0
3	3	2	110,0
3	3	3	140,0

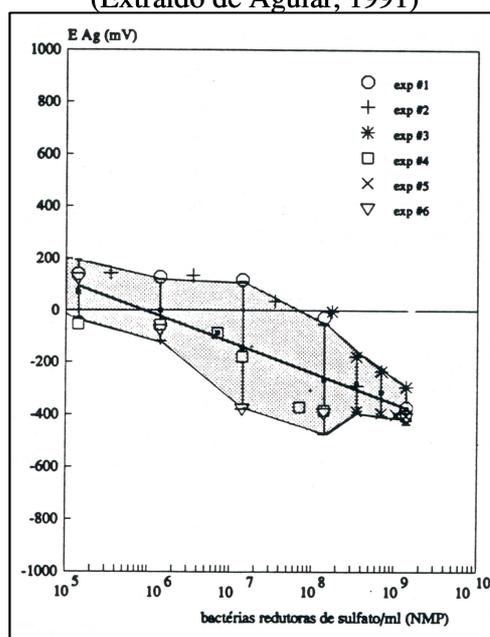
Valores do NMP para três tubos com três diluições decimais sucessivas. O NMP pode ser estimado pela multiplicação do NMP derivado da tabela pelo fator da primeira diluição.

**Figura 6**  
**Deteccção da atividade de BRS pelo enegrecimento do meio Postgate E**



A figura mostra um corpo-de prova de aço-carbono contendo biofilme de BRS aderido à sua superfície e inoculado em meio de cultura Postgate E fresco (frasco à esquerda). Com o crescimento de BRS, observa-se o enegrecimento do meio de cultura devido a formação de sulfeto de ferro (frasco à direita). O acompanhamento diário da cor do meio de cultura (até o máximo de 28 dias) é usado como indicador de detecccção da atividade de BRS.

**Figura 7**  
**Método de detecccção e semi-quantificação de BRS em suspensão por medida de potencial eletroquímico**  
 (Extraído de Aguiar, 1991)



Registros eletroquímicos da relação entre os potenciais de prata medidos em suspensões de BRS, em diferentes diluições com água do mar desaerada, expressos em relação ao número de BRS quantificado por testes paralelos de NMP, acompanhados por 28 dias após os registros eletroquímicos. Quanto menor o valor do potencial de prata (eixo Y) maior a quantidade de bactérias encontradas em solução (eixo X).

com células bacterianas). Assim, a fração total dos compostos químicos presentes na água despejada é aproximadamente 25% ou menos da inicial. Medidas diretas das concentrações despejadas e dados mais precisos sobre a solubilidade dos compostos são um pré-requisito importante antes da tentativa de estudos definitivos de impacto ambiental potencial.

### **4.3. Principais bases ativas aplicadas na indústria do petróleo**

Em duas amplas revisões sobre o tema, Hudgins (1992) e Morris e cols. (1995) descrevem alguns dos biocidas mais utilizados na indústria do petróleo. Os aldeídos (glutaraldeído, acroleína, formaldeído), sais quaternários de amônio, carbamatos, isotiazolona e sais acetatos de amina estão entre eles. Além desses compostos, vários outros produtos químicos podem ser utilizados no controle da CIM na indústria do petróleo e da corrosão em diferentes tipos de instalações. O sulfato de tetrakis(hidroxi)metil fosfônio, o ácido dietilenotriaminopentacético e o molibdato de sódio fazem parte desse grupo (Kenisur, 1996; Downward e cols., 1997; Wang e cols., 1999). A Figura 8 apresenta as fórmulas químicas de algumas das principais bases ativas usadas na indústria do petróleo.

#### **4.3.1. Glutaraldeído**

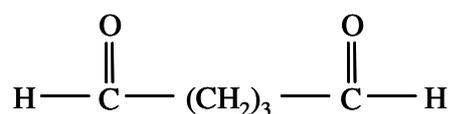
O glutaraldeído (GA) é um composto ativo encontrado em uma ampla variedade de biocidas comerciais usados para o controle de bactérias e algas. Ele é um composto acíclico de cinco carbonos, cujos carbonos terminais constituem grupos funcionais aldeídos (Figura 8A). Esses grupos reagem com os constituintes básicos de proteínas (por ex. os grupos  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-COOH$  e  $-SH$ ) presentes na membrana e na parede celular, alterando a permeabilidade da célula. Dessa forma, o transporte de nutrientes para a célula e a remoção de seus metabólitos são inibidos, sendo esta a principal causa para a morte dos microrganismos (Eagar e Theis, 1986).

GA é solúvel em água e possui densidade similar. Entretanto, é insolúvel em óleo e, assim, em um ambiente água/óleo, ele possui forte afinidade com a fase aquosa. GA é formulado em concentrações de até 50%, concentração máxima permitida pela legislação ambiental. As formulações podem conter água, metanol ou isopropanol (ou uma combinação de todos). Os álcoois são, geralmente, adicionados para prevenir o congelamento durante sua estocagem, podendo também aumentar a capacidade de penetração do GA. O GA é incompatível com substâncias alcalinas ou ácidos fortes. Em particular, é reativo com amônia e substâncias contendo aminas. As aminas podem promover a polimerização exotérmica do glutaraldeído.

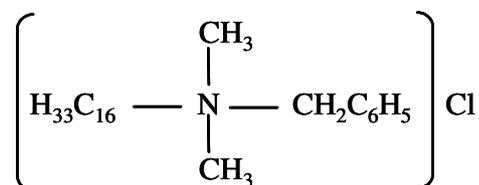
Nas concentrações máximas permitidas, o GA é classificado como corrosivo pelo

**Figura 8**  
**Fórmulas químicas de algumas das principais bases ativas aplicadas na indústria do petróleo**

**8A - Glutaraldeído (OCH[CH<sub>2</sub>]<sub>3</sub>CHO)**

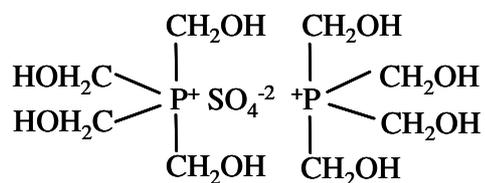


**8B - Sais quaternário de amônio ([R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> N]<sup>+</sup>X<sup>-</sup>)**



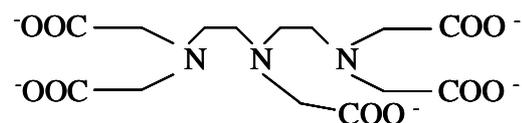
Ex. Cloreto de cetildimetilbenzilamônio

**8C - Sais quaternários fosfônio (CH<sub>2</sub>OH)<sub>4</sub>P-X**



Ex. Sulfato tetrakishidroximetil fosfônio

**8D - Ácido dietileno triamino pentacético (DTPA)**



Ex. DTPA<sup>5-</sup>

Departamento de Transporte dos Estados Unidos da América. A corrosividade desse composto tem causado preocupação quando dosagens de choque são aplicadas em pontos de sistemas de difícil acesso para inspeção (ex. poços injetores, bases de tanques, entre outros). Porém, em sistemas com predominância da CIM, o uso de GA, em níveis recomendados, pode resultar em decréscimo na corrosão por meio do controle microbiológico.

A forma mais simples para o descarte de GA é diluí-lo a níveis biodegradáveis, abaixo de 10 ppm. O descarte líquido pode ser feito em unidades de tratamento de água e esgoto ou, alternativamente, em água superficial de acordo com regulamentações aplicadas. Porém, se a diluição ou a biodegradação não é viável, soluções de até 10.000 ppm de GA podem ser desativadas quimicamente pela elevação do pH para 11 ou mais. Onde a legislação ambiental permite, o GA pode ser atomizado com solvente inflamável dentro de um incinerador. Sua combustão completa produz dióxido de carbono e água.

#### **4.3.2. Sais quaternários de amônio**

Sais quaternários de amônio (QAT) são íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) com grupos alquila (hidrocarbonetos) com todos os hidrogênios substituídos (Figura 8B). Eles são compostos catiônicos usados em biocidas e inibidores de corrosão. QAT atuam como um detergente sobre a membrana celular, dissolvendo lipídeos e causando a liberação de material celular vital. As propriedades detergentes destes compostos fornecem uma proteção adicional contra a adesão mediada por SPE. Como inibidores de corrosão, QAT formam uma camada protetora sobre superfícies internas de sistemas tratados, reduzindo a exposição do metal a agentes oxidantes. A combinação das propriedades biocida e formadora de camada dos QAT fornece uma opção estratégica contra a CIM. Entretanto, sua eficiência depende das doses aplicadas e das condições locais. Por exemplo, a dose efetiva de QAT varia de 10 ppm para bactérias gram-positivas a 400 ppm para bactérias gram-negativas (Edyvean e Dexter, 1993).

As principais aplicações dos QAT têm sido em componentes de sistemas fechados, tais como tubulações e separadores gás/líquido. Relatos técnicos da aplicação de QAT na superfície de reservatórios são raros.

Biocidas contendo QAT podem ser formulados com uma variedade de aditivos, incluindo o hidróxido de potássio (KOH), álcoois e água. Os álcoois e a água são principalmente solventes, embora os álcoois também possam fornecer uma ação biocida adicional e uma maior capacidade de penetração. Os QAT são compatíveis com GA, mas alguns produtos feitos com QAT podem ser formulados com outras aminas que podem gerar incompatibilidade ao produto. Assim, testes de compatibilidade devem ser realizados antes de suas aplicações. Os QAT são incompatíveis com agentes oxidantes fortes, tais como cloro,

iodo, peróxidos, cromatos, ácido nítrico, percloratos, oxigênio concentrado e permanganatos.

A maioria dos biocidas à base de QAT é biodegradável em concentrações subletais e, assim, a desativação química, freqüentemente, não é necessária. Porém, QAT pode ser retirado da água usando-se filtros de argilas naturais. Essa propriedade de atração dos QAT pela argila permite que o efluente tratado seja considerado não tóxico para despejo, caso nenhum outro composto tóxico esteja presente.

#### **4.3.3. Sais quaternários fosfônio**

Os sais quaternários fosfônio contendo fósforo, cloro e/ou sulfato pertencem ao mais recente grupo de biocidas desenvolvidos (Cheung, 1995).

O sulfato tetrakis(hidroxi)metilfosfônio (THPS) é um sal quaternário fosfônio de cadeia curta (Figura 8C). 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 (Downward e cols., 1997). 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 utilizadas no combate aos microrganismos da CIM (Downward e cols., 1997). O THPS apresenta um bom perfil ambiental em relação à citotoxicidade ( $LC_{50}$ ) sobre organismos aquáticos, é prontamente biodegradado e não apresenta potencial para a ocorrência de bioacumulação. Um outro benefício ambiental é o fato dele ser rapidamente oxidado a óxido de trihidroximetilfosfina (THPO), que também tem baixa toxicidade aquática e não é considerado um agente causador de danos ambientais. Ambos os compostos, THPS e THPO, são fotodegradados no ambiente.

#### **4.3.4. Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA)**

O DTPA (Figura 8D) é um agente quelante amplamente usado para remover incrustações de sulfato de bário (barita), que são um grave problema na indústria do petróleo (vide item 5.1). O DTPA promove a dissolução química da barita através da formação de fortes complexos com o íon bário em solução (Wang e cols., 1999; Dunn, 1999), sendo que a eficiência desse processo é função da concentração do produto, da temperatura, do tempo de contato e da área superficial disponível para a reação. O pH alcalino (>12) necessário à dissolução do sulfato de bário é, reconhecidamente, desfavorável ao crescimento de microrganismos.

#### 4.3.5. Molibdato de sódio

Além de sua atividade bacteriostática, o molibdato de sódio é conhecido como um inibidor de corrosão de ligas metálicas (metais ferrosos, alumínio e cobre), sob diferentes condições operacionais e ampla variação nas características da água. Segundo artigo técnico (Kenisur, 1996), o molibdato possui uma baixa toxicidade quando comparado à maioria dos metais de transição e não faz parte da lista dos produtos considerados tóxicos e/ou poluentes da CWA (Clean Water Act, Estados Unidos).

O íon molibdato funciona como inibidor metabólico para BRS (Postgate, 1984). Sua estrutura é semelhante à do íon sulfato e quando o íon molibdato encontra-se na mesma relação estequiométrica que o íon sulfato presente no meio, ocorre a inibição da redução deste composto pelas BRS e, conseqüentemente, uma inibição do crescimento dessas bactérias. Chen e cols. (1998 e 1999) verificaram que o íon molibdato foi capaz de reduzir o crescimento de uma cultura de *Desulfovibrio desulfuricans*.

#### 4.4. Novas estratégias para o uso de biocidas

A existência de numerosas e rigorosas leis ambientais relacionadas à aplicação de substâncias tóxicas tem estimulado tratamentos objetivos com o uso mínimo de produtos químicos tóxicos. Nesse contexto, o sistema deve ser monitorado para se determinar a quantidade mínima de biocida eficiente no controle microbiano (Morris e cols., 1995). É recomendável, também, direcionar o tratamento para as áreas afetadas do sistema e não se empregar tratamento global. Além disso, tratamentos alternativos com uso de substâncias naturais estão sendo desenvolvidos. Vários produtos naturais já foram testados com esse fim, entre eles: derivado da árvore Juá (Santos, 1991), extrato de sementes de mostarda preta (Gómez de Saravia e cols., 1998), extrato do óleo de pimenta (Paterek e cols., 1998), imunoglobulinas humanas (Guiamet e cols., 1999), etc.

### 5. Objeto de nosso estudo: biofilmes formados por BRS envolvidos em processos de CIM em oleodutos e no sistema de injeção de água do mar de plataformas da PETROBRAS

Os processos corrosivos que atingem os oleodutos da PETROBRAS vêm provocando a ocorrência de inúmeras falhas internas que, além do aumento de custos operacionais, levam às paradas de produção e aos danos ao meio ambiente. Como anteriormente comentado, embora não tenham sido associados a problemas de corrosão, os recentes vazamentos de 1,3 e 4,7 milhões de litros de óleo que aconteceram na Baía de Guanabara e no Rio Iguçu, respectivamente, ilustram a importância de estudos visando evitar processos que possam causar danos dessa natureza.

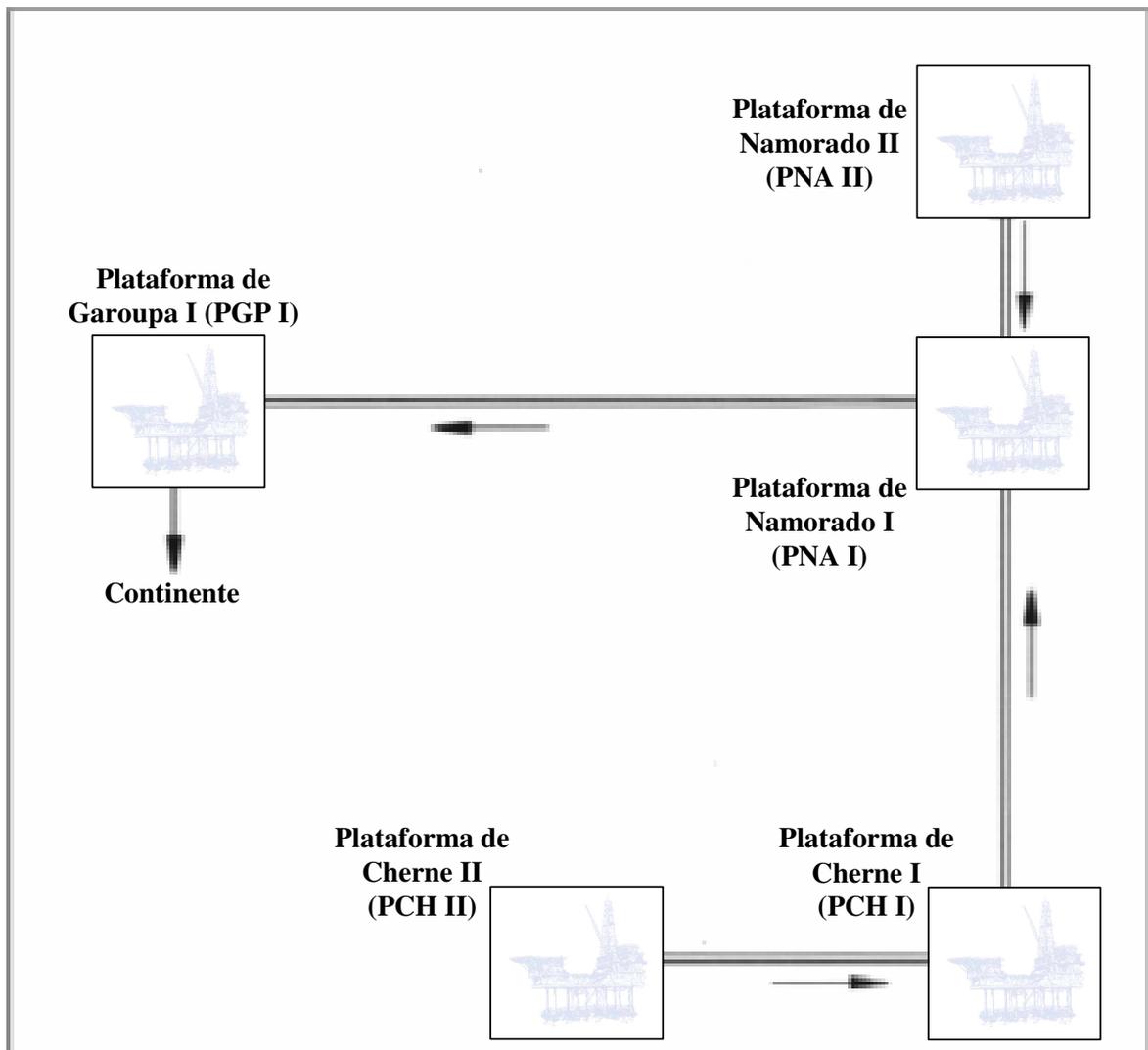
BRS presentes nos sistemas de produção de petróleo têm diversas origens, que podem ser (1) do próprio reservatório, (2) introduzidas durante os processos de perfuração e completação do poço ou (3) provenientes do processo de injeção de água do mar para recuperação secundária do petróleo. No início da produção de um campo, a presença de BRS associada a um baixo teor de água não traz conseqüências maiores no tocante à corrosão, devido à permanência da água na forma emulsionada, que não permite o contato das bactérias com a superfície metálica. Entretanto, quando os sedimentos de fundo e a percentagem de água do fluido produzido aumentam, o nível de atividade microbiana tende a aumentar e a provocar a maioria dos processos corrosivos internos instalados em gasodutos e, principalmente, em oleodutos. Os campos produtores que dependem da injeção de água do mar são os mais susceptíveis à CIM, pois a mistura da água do mar com a água de formação, originalmente presente no reservatório, estimula tanto o crescimento das bactérias nativas do reservatório quanto as presentes na água de injeção. Esse estímulo do crescimento bacteriano se dá, principalmente, pela disponibilização do íon sulfato e pelas diminuições da salinidade e da temperatura da formação petrolífera. Assim, à medida que as condições de ecologia do reservatório tornam-se favoráveis, BRS podem acidificar o reservatório e os fluidos produzidos, pela produção de  $H_2S$ , ou, mover-se, juntamente com a água, da região do poço injetor para a do poço produtor, favorecendo o desenvolvimento de colônias microbianas nas superfícies metálicas.

Portanto, dois cenários distintos se caracterizam como situações-problema, nas quais a CIM assume um papel importante, que atinge tanto oleodutos quanto o sistema de injeção de água do mar. No presente trabalho, participamos, juntamente com a equipe da Biotecnologia e Ecossistemas do CENPES para melhor entender o processo de formação e desorganização de biofilmes bacterianos (com ênfase naquele formados por BRS) nesses sistemas, tendo em vista o controle da CIM.

### **5.1. Cenário 1: crescimento de BRS em áreas incrustadas por sulfato de bário em oleodutos da área norte da Bacia de Campos**

Os oleodutos da área norte (Figura 9), em conjunto, transportam mais de 65 mil barris de óleo/dia e vêm apresentando problemas de corrosão desde 1994 (Magalhães, 1995). Além dos aspectos relacionados à CIM, a produção de petróleo via injeção de água do mar tende a formar incrustações, sendo as mais comuns as do tipo carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ), sulfato de estrôncio ( $SrSO_4$ ) e sulfato de bário ou barita ( $BaSO_4$ ). As ocorrências mais severas de incrustação são conseqüências de sistemas com alto grau de precipitação de  $BaSO_4$ , como é o caso da área norte da Bacia de Campos. Nessas formações, onde a água é rica em íons bário e

**Figura 9**  
**Representação esquemática dos oleodutos da área norte da Bacia de Campos**



O esquema mostra a rede interligada de oleodutos para transporte do óleo recuperado em cada uma das plataformas da área norte da Bacia de Campos. O ponto final de coleta do óleo é a plataforma de Garoupa I (PGP I), antes de seu transporte até o continente.

estrôncio, a mistura com a água do mar, rica em íons sulfato, provoca desequilíbrio químico no meio aquoso dando origem aos depósitos de sulfato de bário.

A interação de microrganismos, em especial das BRS, com as incrustações de sulfato de bário baseia-se em fenômenos de atração eletrostática, onde a adesão inicial da BRS ao cristal ocorreria devido ao íon bário (catiônico) se ligar à superfície aniônica das bactérias. Essa interação leva à solubilização do cristal de barita, a metabolização do íon  $\text{SO}_4^{2-}$  pela BRS, à produção elevada de sulfeto e ao processo de corrosão localizada que vem sendo detectado nos oleodutos da área de produção norte da PETROBRAS, na Bacia de Campos (Magalhães e cols., 1995).

Diante do exposto, o(s) tratamento(s) deveria(m) ser capaz (es) de remover as incrustações e inibir o crescimento de BRS. O candidato natural ao controle da CIM seria a injeção contínua de biocidas. Entretanto, além da presença do sulfato de bário, a baixa porcentagem de água do fluido transportado e a baixa solubilidade dos biocidas comerciais no óleo tendem a limitar a eficiência biocida. A passagem sucessiva de raspadores ("pigs") para limpeza seria uma outra possibilidade de tratamento. Por outro lado, a alta dureza das incrustações de sulfato de bário (barita) deixa dúvidas quanto à eficiência dos raspadores em remover os depósitos aderidos.

Fica evidente a necessidade de se estudar um tratamento específico para esses oleodutos, onde o principal mecanismo de falha tem sido a CIM, pela ação das BRS sobre as incrustações de sulfato de bário.

## **5.2. Cenário 2: monitoramento e controle da CIM no sistema de injeção de água do mar para recuperação secundária de petróleo**

Na PETROBRAS, o uso da técnica de recuperação secundária de petróleo mostra-se bastante intensificada, em função da colocação em produção de campos dotados de grandes reservas, como é o caso de Marlim, na Bacia de Campos. O campo de Marlim é de importância estratégica para a produção brasileira de petróleo. Contém um volume original provado de óleo de  $802 \times 10^6 \text{ m}^3$  e uma reserva explorável provada de óleo de  $270 \times 10^6 \text{ m}^3$ , o que representa 35% das reservas totais no Brasil. Estima-se que os poços permitirão um pico de produção de óleo de 535.000 barris / dia no ano de 2002, e uma produção acumulada de óleo de 2,5 bilhões de barris após 25 anos (ano de 2019) (Bruhn e cols., 1996). Neste campo, a água do mar é a matéria-prima básica para levar a efeito esse processo, prevendo-se, no ano de 2000, proceder-se à injeção de cerca de  $118.365 \text{ m}^3$  / dia de água do mar tratada (Magalhães, 1998). Múltiplos esforços estão voltados para a melhoria da qualidade da água de injeção para recuperação secundária de petróleo, visando o controle microbiológico de

organismos envolvidos em processos de corrosão, de entupimento e de acidificação biogênica de reservatórios.

O presente estudo priorizou analisar bactérias amostradas em plataformas do Campo de Marlim por sua importância estratégica para a produção brasileira de petróleo. Um sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop") foi desenvolvido pelo CENPES para simulação das condições operacionais de um sistema de injeção de água do mar e avaliação de processos corrosivos abióticos e bióticos. Este sistema "loop" foi testado pela primeira vez no presente trabalho para cultivo, monitoramento, caracterização e controle (pelo uso de biocidas) de bactérias planctônicas e de biofilmes envolvidos em processos de biocorrosão.

## 6. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo geral:

- Avaliar o efeito de diferentes soluções químicas compostas de bases ativas com diferentes características (biocidas, inibidores metabólicos, inibidores de corrosão e de incrustação) no controle do crescimento de BRS sésseis e planctônicas e na desorganização de biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em sistemas de produção, transporte de petróleo e sistema de injeção de água do mar da PETROBRAS.

Esse objetivo geral desdobra-se nos seguintes objetivos específicos:

1. estudar em laboratório, por técnicas microbiológicas e de microscopia eletrônica, sob condições estáticas e dinâmicas de fluxo d'água, a formação e a desorganização (na presença de biocidas) de biofilmes associados a processos de biocorrosão e constituídos por bactérias amostradas em oleodutos ou em tubulações do sistema de injeção de água do mar de plataformas marítimas da PETROBRAS, Bacia de Campos.
2. avaliar, por técnicas microbiológicas e de microscopia eletrônica, o efeito de bases ativas no tratamento *in situ* de biofilmes bacterianos corrosivos presentes em oleoduto de plataforma da PETROBRAS na área de produção norte da Bacia de Campos.
3. padronizar a técnica de microscopia confocal de varredura a laser para o estudo *in situ* de biofilmes bacterianos corrosivos aderidos à superfície metálica de corpos-de-prova.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **1. Meios de cultura e soluções**

### **1.1. Água do mar sintética**

Meios de cultura e soluções, utilizados tanto para os experimentos de microbiologia quanto para as análises ultra-estruturais e elementais, foram diluídos em água do mar sintética obedecendo ao padrão de concentração de NaCl encontrado em cada uma das amostras estudadas. A composição da água do mar sintética (em g/10 l) consiste em NaF (0,03), SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,2), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,3), KBr (1,0), KCl (7,0), CaCl<sub>2</sub> (11,13), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40,0), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (107,8), NaCl (235,0), NaSiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (0,2), Na<sub>2</sub>EDTA (0,0089), NaHCO<sub>3</sub> (2,0), pH 7,6.

### **1.2. Solução redutora para preservação de biofilmes bacterianos**

Essa solução foi utilizada para o acondicionamento das amostras extraídas de campo até o momento em que elas foram inoculadas em meio de cultura e para os procedimentos de extração dos biofilmes dos corpos-de-prova que precederam os métodos de contagem das bactérias. Os componentes dessa solução são o tioglicolato de sódio (0,124 g), ácido ascórbico (0,1 g), 4 ml de solução de resazurina a 0,025% (p/v), água do mar sintética (1000 ml), pH 7,6 (após esterilização).

### **1.3. Meio Postgate E - modificado para bactérias redutoras de sulfato mesófilas (m-BRS)**

É o meio nutritivo usado para a seleção de culturas de BRS e também para a contagem de populações (Postgate, 1984). Esse meio deve ser incubado em anaerobiose. A mera exclusão do ar, entretanto, não é suficiente para o crescimento das BRS. Para tal, o maior pré-requisito é o estabelecimento do potencial redox do meio em torno de -100mV que, nesse caso, é conferido pelo tioglicolato de sódio como agente redutor. Numa modificação introduzida no laboratório do CENPES, o tioglicolato de sódio (0,124 g/l) substitui o ácido tioglicólico (0,1 g/l), sendo esterilizado separadamente em solução-mãe e adicionado em condições assépticas (1% v/v), antes da inoculação com bactérias. Essa alteração permite a estabilização do pH e estocagem do meio por vários meses. O sal de ferro, na concentração de 0,5% é usado com propósito de diagnóstico. A formação de um precipitado preto de FeS, escurecendo o meio, evidencia a redução bacteriana de sulfato (ver Introdução - Figura 6 ). A adição de agar na quantidade de 1,9 g/l para a formação de meio semi-sólido foi baseada na indicação de Surinach (1986) para facilitar o processo de adesão. A resazurina foi introduzida como indicadora de anaerobiose. O preparo do meio é realizado cozinhando-se o agar em água do mar sintética, sob agitação, até que ele esteja completamente dissolvido, quando

então o aquecimento é desligado, mantendo-se a agitação, e os componentes restantes são adicionados. O pH é ajustado para 7,6 com o uso de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. O meio recebe purga de nitrogênio durante todo o preparo e o estado de anaerobiose é detectado pela mudança de cor da resazurina, de cor azul para róseo. Ao final, ele é acondicionado em vidros de 10 ml ou 50 ml, ou em reatores com capacidade de 1 a 5 l. Os vidros recebem uma tampa de borracha e lacre de alumínio e os reatores são devidamente fechados e vedados, de forma a impedir a entrada de ar. A esterilização é feita em autoclave durante 15 minutos após atingir a temperatura de 121°C. Após a esterilização, parte do agar apresenta-se em forma de flocos e o meio apresenta-se incolor ou róseo. A composição do meio Postgate E modificado é feita por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,0 g),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1,0 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,0 g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,83 g), lactato de sódio (50% p/v) (7,0 ml), extrato de levedura (1,0 g), ácido ascórbico (0,1 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g), agar-agar (1,9 g), 4,0 ml de solução de resazurina 0,025% (p/v), água do mar sintética (1000 ml), pH 7,6 (após esterilização).

#### **1.4. Meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT)**

Esse meio de cultura foi usado nos experimentos realizados no sistema dinâmico de fluxo d'água para a seleção de culturas de bactérias anaeróbias heterotróficas e também para a contagem de populações. Os componentes desse meio são: glicose (5,0 g), peptona universal (4,0 g), extrato de levedura (1,0 g), 4,0 ml de solução de resazurina a 0,025% (p/v), água do mar sintética (1000 ml), pH 7,6 (após esterilização).

#### **1.5. Solução nutritiva para formação de biofilmes bacterianos**

A solução nutritiva foi utilizada nos ensaios realizados em sistema dinâmico de fluxo d'água para favorecer o crescimento da população bacteriana e o processo de adesão dessas bactérias aos corpos-de-prova (formação de biofilmes). Os componentes dessa solução são 4,0 ml de lactato de sódio (70%), extrato de levedura (1,0 g), glicose (0,25 g) em 1000 ml de água do mar sintética, pH 7,6 (após esterilização).

## **2. Corpos-de-prova utilizados**

O dispositivo usado para a formação dos biofilmes pelas bactérias é confeccionado com o mesmo material das tubulações das plataformas de petróleo, geralmente aço-carbono. Os amostradores (corpos-de-prova) para uso em campo são desenhados com as mesmas características do sistema de trabalho, isto é, resistentes às pressões de teste e ao impacto, não maleáveis e inertes ao meio. Amostradores para uso em laboratório são confeccionados seguindo os mesmos princípios, porém sem a necessidade de um desenho complexo (Figura

10). Suas formas e dimensões podem variar de acordo com o local e objetivos a serem atingidos com seu uso.

Antes da utilização, os corpos-de-prova foram preparados com jateamento de areia, a fim de se obter uma superfície de rugosidade uniforme, e foram esterilizados sobre lenços de papel em fluxo laminar, por 30 minutos cada face, pela ação da luz ultravioleta (UV), sob fluxo de nitrogênio seco e filtrado para evitar possível oxidação. Ao término da esterilização, os corpos-de-prova foram embrulhados no lenço de papel e mantidos em dessecador até o momento dos experimentos.

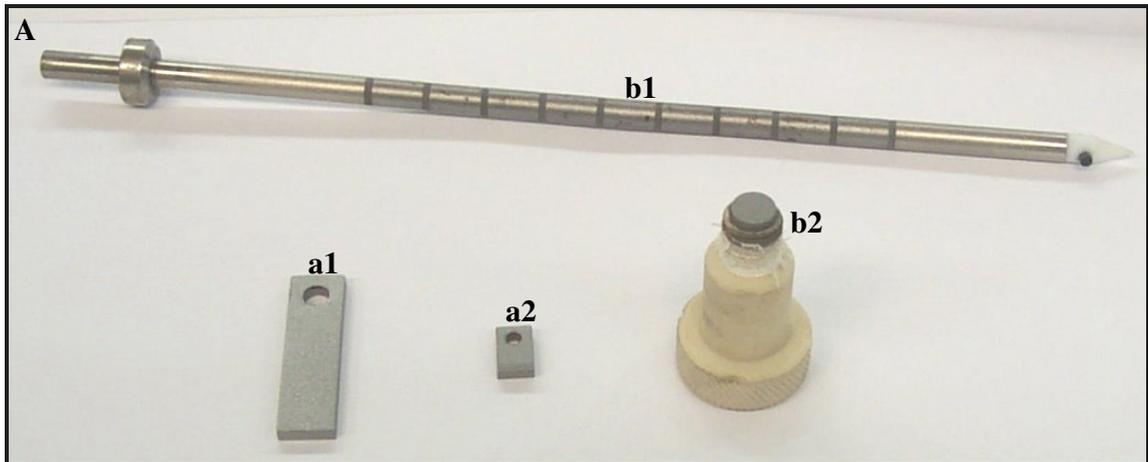
Nesse trabalho, foram utilizados dois tipos de corpos-de-prova com diferentes formatos (Figura 10). Para o crescimento de biofilmes em sistema estático, os corpos-de-prova eram chapas retangulares (3,9 cm x 1,0 cm x 0,3 cm) de aço-carbono, com um furo numa das extremidades para permitir que fossem amarrados, pendurados e incubados, em posição vertical, nos frascos contendo os meios de cultura ou composições biocidas, com ou sem inóculo de bactérias (Figura 10A, amostrador a1). Já os corpos-de-prova usados no sistema dinâmico ("loop") eram discos de aço-carbono (SAE 1020) similares aos cupons do dispositivo "Robins Device" (Ruseska e cols., 1982) com área igual a 0,5 cm<sup>2</sup> que foram colocados tangencialmente ao fluxo d'água do sistema (Figura 10A, amostrador b1, Figura 10B).

### **3. Avaliação em laboratório da eficiência biocida de soluções químicas diversas em sistema estático de fluxo d'água visando o controle de BRS presentes em oleodutos incrustados por sulfato de bário**

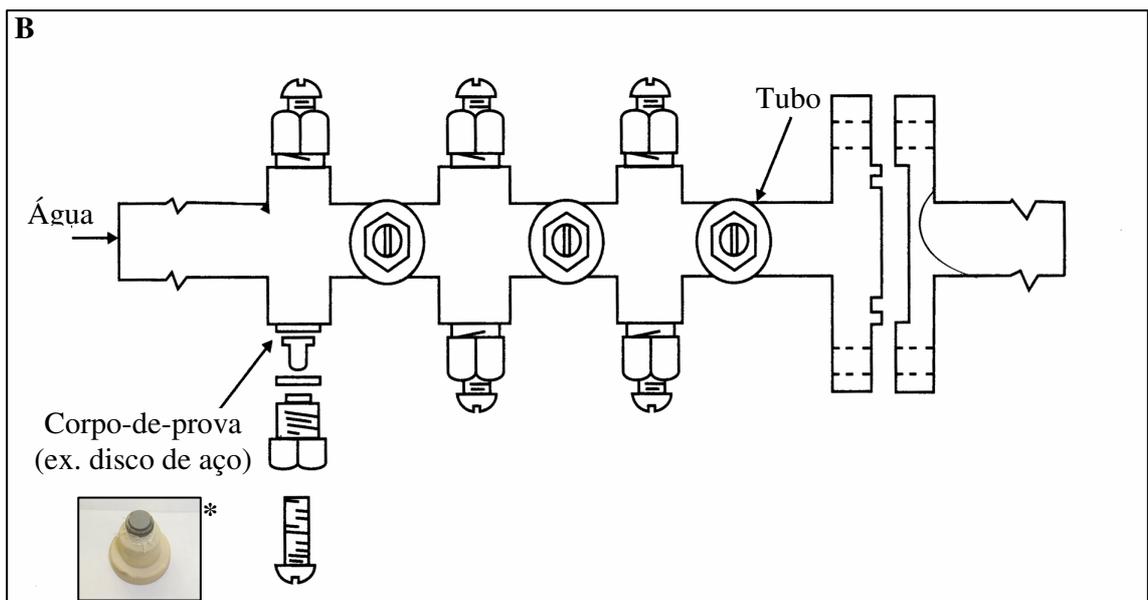
#### **3.1. Procedimento de coleta, cultivo e obtenção de BRS nas formas planctônica e séssil**

Depois de raspados da tubulação do oleoduto das plataformas Namorado e Garoupa 1 PNA-1 / PGP-1, localizado na área norte da Bacia de Campos (Vide Introdução – Figura 9), os resíduos foram imediatamente imersos em solução salina redutora pré-purgada em nitrogênio e levadas para o laboratório do CENPES. Esses resíduos foram submetidos à agitação por vórtex e o material extraído foi inoculado em meio Postgate E modificado para seleção de BRS com salinidade ajustada para 72 g de NaCl / l (similar àquela da água produzida originária desse oleoduto). A manutenção dessas bactérias na forma planctônica em laboratório é feita por tempo indeterminado através de passagens mensais, normalmente com inóculo de 0,5 a 10% em meio Postgate E modificado. Para obtenção da forma séssil de BRS, bactérias planctônicas foram colocadas em contato com corpos-de-prova de aço-carbono por

**Figura 10**  
**Corpos-de-prova e dispositivos utilizados para estudo e monitoramento de biofilmes bacterianos em sistemas estático e dinâmico de fluxo d'água**



Corpos-de-prova de aço-carbono SAE 1020 utilizados em ensaios estáticos (a) e dinâmicos (b) de fluxo d'água. Os corpos-de-prova **a1** e **b2** foram utilizados no presente trabalho nos sistemas estático e dinâmico “loop”, respectivamente.



Dispositivo do tipo “Robins Device” utilizado para amostrar e monitorar biofilmes de um sistema de fluxo dinâmico como, por exemplo, tubulações de injeção de água. Esses dispositivos são colocados de forma paralela ao sistema principal e os corpos-de-prova (no detalhe) são encaixados de forma tangencial em relação ao fluxo.

noventa (90) dias para formar um biofilme sobre a superfície dos mesmos. Foi adicionada ao meio de cultura uma concentração de sulfato de bário similar àquela encontrada no oleoduto (1,6 g/l).

### 3.2. Soluções químicas avaliadas

Nos ensaios de eficiência biocida avaliou-se um total de quatro soluções químicas (Tabela 2): (1) sulfato de tetrakis(hidroximetil) fosfônio coadjuvado com sais quaternários de amônio (THPS-QAT); (2) glutaraldeído coadjuvado com sais quaternários de amônio (GA-QAT); (3) sal sódico do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e (4) a combinação de molibdato de sódio com o nitrito de sódio ( $\text{MoO}_4\text{-NO}_2$ ) que, segundo o departamento técnico da Kenisur (1996), é muito eficiente para controlar a corrosão do aço-carbono em águas contendo um baixo teor de oxigênio. Essas bases ativas foram escolhidas pelas seguintes razões: (1) eficiência proposta para o controle do crescimento bacteriano; (2) aplicação na indústria do petróleo; (3) disponibilidade comercial dos produtos. Nestes ensaios, procurou-se reproduzir as condições do tratamento realizado em campo com biocidas. A água corrente fornecida pela CEDAE foi desaerada com bissulfito de sódio (pH 6,8) e empregada para diluição das bases ativas, pois a remoção do oxigênio da água (desaeração) é necessária para reduzir a corrosividade a um nível mínimo. Somente a solução de DTPA não foi submetida a desaeração, além de ter o pH ajustado para 12, com KOH 5 M. Os biocidas foram testados em laboratório, usando a cultura mista de BRS nas formas planctônica e sésil.

**Tabela 2**

**Bases ativas, concentrações e dosagens de produtos utilizados nos testes de eficiência biocida**

<b>SOLUÇÃO DAS BASES ATIVAS</b>	<b>DOSAGEM EMPREGADA</b>
Solução aquosa contendo 43,8% p/v de sulfato de tetrakis(hidroximetil) fosfônio + 7,2% p/v de sal quaternário de amônio (THPS-QAT)	100 ppm
Solução aquosa contendo 42% de glutaraldeído + 8% de sal quaternário de amônio (GA-QAT)	250 ppm
Solução aquosa contendo de 32% de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) ou Solução alcalina contendo 40% de ácido dietilenotriaminopentacético em hidróxido de sódio (NaOH)	Produto puro + KOH 5M (pH 12) ou 10% v/v (pH 14)
Solução aquosa contendo 99,5% p/v (min) de molibdato de sódio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) + Solução aquosa contendo 97% p/v (min) de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) - ( $\text{MoO}_4\text{-NO}_2$ )	250 ppm de $\text{MoO}_4^{2-}$ com 250 ppm de $\text{NO}_2^{1-}$

### **3.3. Ensaio de eficiência biocida**

Soluções de biocidas preparadas em frascos de 50 ml de acordo com suas especificações (Tabela 2) foram colocadas em contato por 4 h e 24 h com: (1) corpos-de-prova virgens sem a presença de BRS (controle abiótico); (2) corpos-de-prova virgens, colocados simultaneamente com um inóculo de  $7,5 \times 10^3$  BRS planctônicas; (3) corpos-de-prova cobertos por biofilme de BRS (após 90 dias de formação; ver item 3.1). A escolha dos tempos de contato com os biocidas baseou-se na possibilidade destes serem os tempos mínimo e máximo de parada de produção em campo para a realização do tratamento.

### **3.4. Análises microbiológicas para avaliação da eficiência biocida**

Após 4 h e 24 h de exposição às diferentes soluções biocidas, os corpos-de-prova foram lavados em solução salina redutora, transferidos para frascos de 50 ml de meio de cultura Postgate E modificado e incubados por 28 dias, na temperatura de 30°C, com o objetivo de avaliar a eficiência biocida sobre as BRS sésseis. Adicionalmente, o meio de cultura contendo as bactérias planctônicas em contato com a solução biocida foi agitado e, em seguida, 5 ml foram retirados dessa solução e inoculados em frascos de vidro com 45 ml de meio Postgate E modificado, na temperatura de 30°C. A atividade de BRS foi acompanhada por 28 dias.

A avaliação da eficiência das soluções biocidas foi realizada utilizando-se os seguintes parâmetros: detecção das atividades de BRS planctônicas (que se encontravam em solução após tratamento) e de BRS sésseis (que permaneceram aderidas ou que aderiram aos corpos-de-prova após tratamento).

A detecção de BRS foi constatada pelo enegrecimento do meio devido à precipitação de sulfeto de ferro (FeS), resultante da interação de sulfeto liberado por essas bactérias e o ferro encontrado em suspensão no meio (ver Introdução - Figura 6). O grau de eficiência do composto biocida é inversamente proporcional à detecção da atividade bacteriana no meio de cultura, ou seja, quanto mais rápida for a detecção das BRS no meio menor será a eficiência do biocida testado.

### **3.5. Análises ultra-estruturais e microanálises de raios-X**

Após o contato com as soluções de DTPA e GA-QAT, foram retirados corpos-de-prova das culturas de origens planctônica ou sésseis, para serem processados para microscopia eletrônica e para microanálise de raios-X. Os detalhes dos procedimentos empregados encontram-se descritos nos itens seis (6) e sete (7).

#### **4. Tratamento do oleoduto PCH-II / PCH-I com o produto selecionado através dos ensaios em sistema estático: avaliação da eficiência do DTPA no controle de BRS e incrustações de sulfato de bário**

##### **4.1. Solução biocida selecionada**

Uma solução alcalina (pH 14) contendo DTPA a 40% em hidróxido de sódio (NaOH) foi aplicada na tubulação em uma concentração de 10% diluída em água industrial. Neste ensaio, acrescentou-se o carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 1,5% na solução de DTPA, pois essa combinação já havia sido testada anteriormente no CENPES, apresentando um maior poder em complexar íons bário (dados não mostrados).

##### **4.2. Realização do tratamento proposto**

Na plataforma Cherne II (PCH II), o óleo foi deslocado por uma camada de 15 m<sup>3</sup> de água. Em seguida, foram feitos o bombeamento com xileno (para dissolver o óleo restante) e a aplicação de DTPA + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O tempo de contato do produto com a superfície da tubulação foi de 10 h e 20 min.

##### **4.3. Avaliação da eficiência do tratamento**

Acompanhou-se a chegada de fluido na plataforma de Cherne I (PCH I), tendo sido monitorado o pH, aspecto visual e odor (dados não mostrados). Resíduos da tubulação foram amostrados com o auxílio de raspadores ("pigs") introduzidos na tubulação antes do tratamento com DTPA. Amostras líquidas da água produzida foram coletadas em locais próximos ao receptor de "pigs". Desta forma, obteve-se amostras-controle visando a caracterização da eficiência do DTPA com relação à sua capacidade biocida e ao seu poder antiincrustante. Após 10 h de tratamento com DTPA, resíduos e amostras da solução biocida aplicada no oleoduto foram coletados para análises comparativas. O material amostrado foi avaliado por técnicas microbiológicas, de microscopia eletrônica (MEV e MET) e de microanálise de raios-X por MET.

Nos ensaios microbiológicos, as técnicas utilizadas para a avaliação da eficiência biocida foram a técnica do Número Mais Provável (NMP) e a detecção da atividade de BRS (acompanhado pelo enegrecimento do meio) em meio Postgate E modificado. O NMP é um método de contagem de bactérias que pode ser usado para a enumeração de bactérias que

crecem em suspensão (Postgate, 1984), de origem sésil ou planctônica, através de diluições decimais dos meios de cultura empregados. Para a contagem de bactérias sésseis deve-se, inicialmente, proceder a raspagem ou agitação dos resíduos (ou de corpos-de-prova) dentro da solução salina redutora antes de iniciar as diluições. As amostras são preparadas em triplicatas de meio de cultura, em oito diluições decimais sucessivas (24 tubos). A leitura é feita atribuindo valor positivo às culturas que acusaram o crescimento das bactérias (negras, no caso de BRS; ver Introdução - Figura 6); valor negativo às diluições que não acusaram o crescimento (no caso de BRS, não mudaram de cor). Ao final de 28 dias, a contagem de BRS é estimada pela tabela estatística do NMP (ver Introdução - Figura 5), onde o resultado da contagem das bactérias planctônicas é expresso pelo número mais provável de bactérias por mililitro (NMP / ml). O valor encontrado é, posteriormente, convertido para a área do corpo-de-prova (NMP / cm<sup>2</sup>) ou para o peso em g dos resíduos (NMP / g) de onde as bactérias foram extraídas.

O processamento das amostras para avaliações por microscopia eletrônica (MET e MEV) e para microanálise de raios-X foi realizado de acordo com os protocolos descritos nos itens seis (6) e sete (7).

## **5. Avaliação de técnicas de monitoração e controle da corrosão influenciada por microrganismos (CIM) em sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop")**

### **5.1. Obtenção das culturas bacterianas e cultivo em laboratório**

As culturas de bactérias usadas nos ensaios de avaliação da eficiência de bases ativas biocidas foram obtidas de amostras de fluido não tratado (água do mar não clorada e sem biocida) do sistema de injeção da plataforma PXVIII, localizado no Campo de Marlim, Bacia de Campos, Rio de Janeiro, RJ. As amostras foram levadas para o laboratório do CENPES em solução salina redutora, onde sofreram o seguinte procedimento: 5 ml das amostras foram inoculados em frascos contendo 45 ml de meio de cultura Postgate E modificado para bactérias redutoras de sulfato mesófilas (m-BRS), e 45 ml de meio de cultura para bactérias anaeróbias totais (BANHT). Os frascos foram incubados em estufa regulada para a temperatura de 37°C e o crescimento foi acompanhado (máximo de 28 dias). As culturas obtidas foram repicadas em frascos com meios frescos (Postgate E modificado e meio de cultura para BANHT) a fim de se obter volume de cultura suficiente para todos os ensaios realizados no "loop". A avaliação das concentrações de bactérias nas culturas foi quantificada pela técnica do NMP. A concentração final de m-BRS e BANHT em cada cultura antes dos experimentos estava em torno de 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> NMP / ml.

## **5.2. O sistema dinâmico**

Um sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop") foi idealizado pelo grupo de microbiologia da Biotecnologia e Ecossistemas do CENPES, para simular as condições encontradas no sistema de injeção de água do mar para a recuperação secundária de petróleo. O "loop" é composto de material não metálico (cloreto de polivinila (PVC), acrílico ou vidro temperado), com exceção dos corpos-de-prova, que são feitos de aço-carbono (Figura 10). Esse sistema possui capacidade para 2 l. O sistema de recirculação utiliza uma bomba centrífuga magnética com uma potência de motor de 1/25 hp e a solução nutritiva para favorecer o crescimento bacteriano e a formação de biofilme é adicionada ao sistema através da utilização de uma bomba peristáltica. A vazão no sistema é mantida em 0,3 l / min e a pressão é de 0,3 Kg / cm<sup>2</sup>.

A temperatura do fluido é controlada pelo uso de um sistema de refrigeração e aquecimento. O "loop" encontra-se em fase de patenteamento pelo CENPES, portanto evitamos dar mais detalhes sobre o mesmo, com o intuito de proteger os direitos autorais, comerciais e industriais até que a patente seja registrada.

## **5.3. Descrição dos ensaios**

Os ensaios realizados com o auxílio do "loop" tiveram uma fase de cultivo das bactérias no sistema, com a injeção das culturas mistas de m-BRS e BANHT, e uma fase de controle da CIM, com a injeção de uma base ativa biocida para cada ensaio realizado.

Foram realizados dois ensaios para avaliação da eficiência biocida em biofilmes formados sobre os corpos-de-prova, sendo que, para o primeiro, foi usado glutaraldeído (GA) em solução aquosa e, para o segundo ensaio, o GA foi aplicado após o tratamento com o sal quaternário de amônio (QAT) em solução aquosa.

Antes do início de cada ensaio, a água do mar sintética, filtrada, estéril e desaerada foi bombeada no sistema dinâmico até a estabilização da temperatura a 37°C (temperatura média observada na fase desaerada de sistemas de injeção de água do mar) e do teor de oxigênio (~20 ppb). Posteriormente à estabilização das leituras, um volume de 1 l de solução nutritiva foi adicionado ao sistema, utilizando-se uma bomba peristáltica Masterflex numa vazão de 0,3 l / min.

### **5.3.1. Tratamento com GA**

O GA foi dosado por 24 h na mesma concentração que é normalmente empregada nos sistemas de injeção da Bacia de Campos, isto é, 250 ppm da base ativa.

Após a estabilização das leituras de temperatura (37°C) e do teor de oxigênio dissolvido no meio (~20 ppb), 40 ml de culturas enriquecidas de m-BRS e de BANHT (concentração estimada entre  $10^4$  e  $10^6$  NMP / ml) foram adicionadas ao sistema. Após 15 minutos e após 6 dias da injeção das culturas no "loop", coletou-se amostras de fluido para avaliação microbiológica (detecção m-BRS e quantificação de m-BRS e BANHT planctônicas). Após 12 dias de injeção das culturas, além de amostras de fluido, foram também coletados corpos-de-prova para as mesmas avaliações microbiológicas. Outras amostras-controle de corpos-de-prova foram retiradas após 72 h da injeção de culturas para análises por microscopia confocal, e após 24 h, 48 h, 4 dias e 12 dias para análises de MEV e MET. Amostras de fluido também foram retiradas após 12 dias de inóculo das culturas para análises de MET e microanálise de raios-X. As análises microscópicas de amostras retiradas antes dos testes com os biocidas objetivaram não somente o controle pré-tratamento com o biocida, como também a caracterização morfológica da dinâmica de formação do biofilme no sistema "loop".

Imediatamente após a coleta das amostras com 12 dias de incubação no sistema dinâmico, 250 ppm de GA foi adicionado ao fluido, utilizando uma seringa hipodérmica de 1 ml. Posteriormente, foram retiradas amostras de fluido e de corpos-de-prova em contato com o biocida após 1 h, 4 h e 24 h para as análises microbiológicas, ultra-estruturais (MEV e MET) e microanálise de raios-X (somente bactérias planctônicas). Adicionalmente, foram analisadas, por MET, amostras do fluido e de corpo-de-prova mantidas no sistema por 7 dias de contato ininterrupto com o biocida e por mais 5 dias após drenagem completa do fluido e substituição por água do mar sintética desaerada, filtrada e estéril. Após retirada dessas amostras, o sistema foi bombeado com água alcalina (pH acima de 11, objetivando inibição do possível efeito residual de GA) e com água corrente por 2 h e depois foi esvaziado.

### **5.3.2. Tratamento com QAT-GA**

O QAT foi dosado por 24 h e depois o GA foi aplicado por mais 24 h. Ambos os produtos foram dosados nas mesmas concentrações normalmente empregadas nos sistemas de injeção da Bacia de Campos, isto é, 10 ppm de QAT e 250 ppm de GA.

Após nova estabilização das leituras do "loop" e lavagem do sistema com água do mar

sintética estéril por 2h, as bactérias foram inoculadas no sistema. Quarenta mililitros (40 ml) de culturas de m-BRS e de BANHT (concentração  $> 10^3$  NMP / ml) foram adicionados ao sistema. Após 24 h e 11 dias de inóculo das bactérias, amostras de fluido e de corpos-de-prova foram retiradas para análises microbiológicas. O tratamento biocida foi realizado no décimo primeiro dia após a injeção das bactérias no sistema, quando foi feita uma dosagem de 10 ppm de QAT por 24 h e posterior aplicação de 250 ppm de GA. Após contato por 1 h, 4 h e 24 h com GA, amostras de fluido e de corpos-de-prova foram processadas para análises microbiológicas. Amostras de corpos-de-prova, após 1 h e 24 h de aplicação do GA, foram processadas para MEV. O fluido do sistema foi, então, drenado após 7 dias de aplicação de QAT e substituído por água do mar desaerada estéril, bombeada por mais 2 dias. Ao término desse procedimento, amostras de corpos-de-prova e de fragmentos internos da tubulação de PVC foram retiradas para análises de MEV.

#### **5.4. Processamento de amostras para análises microbiológicas para avaliação da eficiência dos biocidas**

As amostras de fluido e de corpos-de-prova contendo o biofilme foram, primeiramente, transferidas para a solução salina redutora e, a seguir, o biofilme foi extraído por agitação em vórtex por 5 minutos, coadjuvada por sonificação por 2 minutos. Após a remoção do biofilme, o número de bactérias viáveis foi determinado pela técnica do NMP, para m-BRS e BANHT, em seus respectivos meios de cultura. Os métodos do NMP (concentração) e de detecção da atividade de BRS (enegrecimento do meio) foram empregados para a avaliação da eficiência biocida.

#### **6. Processamento para microscopia eletrônica**

As culturas mistas de BRS e de BANHT, provenientes de campo ou de ambos os sistemas estático e dinâmico de fluxo d'água, previamente obtidas no laboratório do CENPES, foram levadas para o Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos (LBCM) do DUBC em frascos lacrados, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M e vermelho de rutênio 0,14%. A fim de evitar a corrosão eletroquímica dos corpos-de-prova durante as etapas mais longas de fixação e lavagem, as respectivas soluções eram pré-purgadas com  $N_2$  e acondicionadas, juntamente com os corpos-de-prova, em vidros lacrados em anaerobiose. Esse procedimento mostrou-se útil para minimizar a oxidação dos corpos-de-prova. As células planctônicas eram recolhidas juntamente com o meio de cultura e misturadas à solução fixadora. Os protocolos de processamento das amostras encontram-se descritos a seguir.

### **6.1. Processamento de rotina para microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As amostras de bactérias em solução ou aderidas a corpos-de-prova ou resíduos de tubulações de petróleo, foram processados para MET como anteriormente descrito por Coutinho e cols. (1994). Resumidamente, as amostras foram fixadas por 18 h a 4°C, em glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.6, diluído em água do mar sintética ajustada para a concentração de NaCl encontrada em cada sistema estudado. Posteriormente, as amostras foram lavadas em mesmo tampão, pós-fixadas em solução de OsO<sub>4</sub> 1% a 4°C por 1,5 h no escuro, gradualmente dessalinizadas (substituição crescente do tampão diluído em água do mar pelo mesmo tampão diluído em água tri-destilada - 15%, 30%, 70%, 90%, 100%), desidratadas em acetona e emblocadas em Epon com polimerização a 60°C durante 72 h. Os corpos-de-prova eram raspados na etapa de desidratação, em que a acetona se encontrava a uma concentração de 70% e, a partir de então, as células eram centrifugadas para dar continuidade ao processamento de MET. Para preservar as substâncias poliméricas extracelulares (SPE), vermelho de rutênio (VR), um marcador para substância polimérica glicosilada aniônica (Luft, 1971; revisto em Fassel e Edmiston Jr., 1999), foi adicionado aos tampões em uma concentração de 0,14% durante a fixação e a pós-fixação, e 0,07% durante as lavagens. Todo o processamento foi realizado no escuro para evitar a oxidação do VR. Cortes ultrafinos do material emblocado foram obtidos em ultramicrotomos LKB e Reichert-Jung, com o uso de navalha de diamante. Esses cortes foram contrastados pelo acetato de uranila 7 % diluído em metanol absoluto e, em seguida pelo citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A observação dos mesmos se deu em Microscópio Eletrônico Zeiss, modelos EM-10 no DUBC / FIOCRUZ.

### **6.2. Processamento de rotina para microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para MEV, os corpos-de-prova ou as amostras de resíduo de campo receberam o mesmo processamento que foi realizado para MET, até a fase de desidratação em acetona. Desse estágio em diante, as amostras foram secas pela injeção de CO<sub>2</sub> em um aparelho de ponto crítico (CPD-030 da Balzers) e recobertas por uma camada de ouro com 15 nm de espessura no aparelho metalizador (SCD-040 da Balzers). As amostras foram analisadas com o uso de microscópio DSM-940 da Zeiss.

## **7. Microanálise de raios-X**

Análises elementais das amostras de bactérias sésseis (aderidas aos corpos-de-prova) ou planctônicas foram feitas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) Jeol 1200EX equipado com sistemas de microanálise de raios-X. A aceleração de voltagem utilizada foi de 120 kV. As amostras foram examinadas sem contrastação por metais pesados. Grades de cobre e de níquel contendo cortes ultrafinos das amostras foram analisadas com o objetivo de pesquisar a presença dos elementos ferro, enxofre e bário, dentre outros.

Nas análises, os raios-x foram contados por 300 segundos utilizando-se detector de silício (SiLi) com janela Norvar, 0-10 keV de dispersão de energia e com resolução de 10 eV por canal. As análises foram feitas utilizando o sistema Noram / Voyager III.

## **8. Microscopia confocal de varredura a laser**

Os corpos-de-prova foram retirados do "loop" e imediatamente congelados à temperatura de -20°C. Nos dias de observação ao microscópio, os corpos-de-prova foram descongelados, incubados com laranja de acridina 0,05% diluída em H<sub>2</sub>O tri-destilada durante 2 minutos e posteriormente lavados em H<sub>2</sub>O tri-destilada antes de serem montados em suporte para observação.

As amostras foram observadas no microscópio confocal de varredura laser DSCLM 410 da Zeiss equipado com o software Zeiss LSM 3.98.

## **RESULTADOS**

## 1. Sistema estático de fluxo d'água

### 1.1. Ensaios de microbiologia: determinação da velocidade de crescimento de BRS nos inóculos diluídos com água corrente e do efeito biocida das bases ativas testadas.

Através de ensaios microbiológicos avaliou-se a eficiência das bases ativas utilizadas nos diferentes testes com BRS de origens planctônica e sésil cultivadas sob condições estáticas de fluxo d'água (Tabela 3).

Nos testes de controle abiótico (água corrente desaerada sem a injeção prévia de BRS e bases ativas), corpos-de-prova em contato com água corrente após 4 h e 24 h e, posteriormente, imersos em meio Postgate E modificado, revelaram presença de BRS após 10 e 13 dias, respectivamente. Esse crescimento já era esperado, visto que água corrente não estéril foi utilizada nos ensaios com o propósito de simular a água industrial utilizada em campo. Entretanto, nessa mesma situação de controle abiótico, não se detectou crescimento de BRS planctônica (em solução).

Amostras de controle biótico (após inóculo de BRS de origens sésil e planctônica, anterior ao tratamento com as bases ativas) apresentaram crescimento mais rápido de BRS. Corpos-de-prova com biofilmes pré-formados após 90 dias, retirados após 4 h e 24 h de incubação no sistema estático em presença de água corrente revelaram crescimento de BRS após 4 dias e 6 dias, respectivamente. Resultado semelhante foi detectado para BRS em solução, extraídas dos mesmos frascos de onde foram retirados os corpos-de-prova com os biofilmes pré-formados, cujo crescimento foi detectado após 7 dias em ambos os tempos de 4 h e 24 h de incubação no sistema. Entretanto, crescimento mais rápido de BRS foi detectado nos testes com injeção de BRS planctônicas na presença de corpos-de-prova virgens e em contato com água corrente. BRS aderidas ao corpo-de-prova e em solução foram detectadas no terceiro dia de incubação em meio Postgate E modificado, após ambos os tempos de 4 h e 24 h de incubação em água corrente.

Em relação aos testes abióticos efetuados na presença das bases ativas (Tabela 3), não se observou crescimento bacteriano, exceto para BRS sésseis após 24 h de contato com THPS-QAT e após 4 h de contato com  $\text{MoO}_4\text{-NO}_2$ .

Já nos testes realizados com as bases ativas (Tabela 3), foram observados os seguintes resultados para cada uma das bases ativas testadas:

- **THPS-QAT:** BRS cresceram em todas as situações testadas, em tempos que variaram de 3 a 8 dias, exceto nos testes com injeção de BRS sésseis, em que bactérias em solução não foram detectadas após 24 h de contato com a base ativa.

- **GA-QAT**: crescimento de BRS se deu mais tardiamente, comparado com THPS-QAT, com tempos que variaram de 5 a 14 dias, sendo que o crescimento bacteriano não foi detectado para BRS em solução após 4 e 24 h na presença da base ativa nos testes com BRS sésseis (biofilme pré-formado de 90 dias) e também para BRS aderidas ao corpo-de-prova e em solução nos testes com injeção de BRS planctônicas, após 24 h na presença dessa solução biocida.
- **DTPA**: crescimento de BRS não foi observado na grande maioria das situações testadas, exceto para BRS no corpo-de-prova, em ambos os testes com biofilme pré-formado e injeção de bactérias planctônicas, e 4 h de incubação com DTPA, que cresceram 6 dias após incubação em meio Postgate E modificado.
- **MoO<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>**: crescimento de BRS foi detectado em tempos que variaram de 5 a 11 dias, exceto para BRS em solução após 4 h nos testes com injeção de BRS planctônicas e após 24 h em ambos os testes com BRS sésseis e planctônicas.

A análise dos resultados obtidos nos testes de avaliação da eficiência biocida de bases ativas (Tabela 4) revelou que a solução de DTPA foi a de melhor desempenho, porque impediu o crescimento de BRS nos controles e em todas as situações testadas por mais de 4 h após a injeção de BRS. Segue-se o produto à base de GA-QAT. A solução de MoO<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub> teve desempenho ligeiramente inferior ao GA-QAT, enquanto que o composto à base de THPS-QAT foi o menos eficiente. Ressalta-se que o tempo de contato da solução biocida com BRS planctônicas e sésseis, freqüentemente, foi um fator importante para o aumento da eficiência das composições estudadas. Ressalta-se, ainda, que BRS sésseis, quando comparadas às planctônicas, mostraram maior resistência às soluções biocidas, ou seja, a totalidade das amostras dos testes com BRS após 4 h e grande parte das amostras após 24 h de contato com as bases ativas.

**Tabela 3**  
**Deteção de BRS na ausência e presença dos biocidas nos ensaios realizados em sistema estático de fluxo d'água**

Testes	Testes abióticos (sem injeção de BRS)				Testes com biofilmes pré-formados de 90 dias (injeção de BRS sésséis)				Testes com injeção de BRS planctónicas			
	BRS no corpo-de-prova		BRS em solução		BRS no corpo-de-prova		BRS em solução		BRS no corpo-de-prova		BRS em solução	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
Água corrente	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
(10 dias)	(13 dias)			(4 dias)	(6 dias)	(7 dias)	(7 dias)	(3 dias)	(3 dias)	(3 dias)	(3 dias)	(3 dias)
Água corrente + THPS-QAT	ND	+	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+	+	+
(13 dias)	(13 dias)			(3 dias)	(7 dias)	(3 dias)		(8 dias)	(5 dias)	(6 dias)	(6 dias)	(8 dias)
Água corrente + GA-QAT	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	+	ND
				(5 dias)	(13 dias)			(14 dias)		(8 dias)		
Água corrente + DTPA	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
				(6 dias)				(6 dias)				
Água corrente + MoO <sub>4</sub> -NO <sub>2</sub>	+	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+	+	+
(6 dias)				(6 dias)	(10 dias)	(11 dias)		(6 dias)	(5 dias)	(6 dias)	(6 dias)	(5 dias)

**Tabela 3:** Deteção da atividade de BRS (em dias), comprovada pelo enegrecimento do meio Postgate E modificado, antes e depois do tratamento com as bases ativas, nas diferentes situações estudadas. [ND - não deteção de BRS no tempo máximo de incubação (28 dias)]

THPS-QAT - sulfato de tetrakis(hidroxi)metil fosfónio coadjuvado com sais quaternários de amónio;

GA-QAT - glutaraldeído coadjuvado com sais quaternários de amónio;

DTPA - sal sódico do ácido dietileno-triaminopentacético;

MoO<sub>4</sub> -NO<sub>2</sub> - molibdato de sódio com nitrito de sódio.

**Tabela 4**  
**Avaliação da eficiência das soluções biocidas testadas em sistema estático de fluxo d'água**

Testes	Testes abióticos (sem injeção de BRS)				Testes com biofilmes pré-formados de 90 dias (injeção de BRS sésseis)				Testes com injeção de BRS plancônicas			
	BRS no corpo- de-prova		BRS em solução		BRS no corpo-de- prova		BRS em solução		BRS no corpo-de- prova		BRS em solução	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
Água corrente + THPS-QAT	E	NE	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	E	E
Água corrente + GA-QAT	E	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	E	E
Água corrente + DTPA	E	E	E	E	NE	E	E	E	NE	E	E	E
Água corrente + MoO <sub>4</sub> -NO <sub>2</sub>	NE	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	E	E

**Tabela 4:** Eficiência biocida das soluções utilizadas nos ensaios, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3. O critério de eficiência utilizado foi a comparação do crescimento bacteriano na ausência e na presença das diferentes soluções biocidas. Foi considerado eficiente o biocida que inibiu completamente a detecção de BRS no tempo máximo de 28 dias de acompanhamento do crescimento das bactérias em meio Postgate E modificado. [NE - Não eficiente, E - Eficiente].

## **1.2. Formação de biofilme de BRS e sua desorganização na presença dos dois biocidas mais eficazes (GA-QAT e DTPA): avaliação ultra-estrutural e microanálise de raios-X**

Tendo em vista a maior eficiência das soluções de DTPA e de GA-QAT, as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e a microanálise de raios-X, aplicadas na FIOCRUZ, foram utilizadas para avaliar o efeito desses biocidas no crescimento de biofilmes formados a partir do contato de corpos-de-prova com BRS em solução e na desorganização de biofilmes de BRS pré-formados sobre esses dispositivos.

### **1.2.1. Formação do biofilme sobre a superfície dos corpos-de-prova a partir do inóculo de BRS planctônicas**

Nos testes abióticos, sem adição do inóculo de BRS (Fig. 11A), após 4 h de incubação em água corrente, o corpo-de-prova apresentava depósitos irregulares na sua superfície, possivelmente produtos de corrosão ou ainda elementos de matriz extracelular produzidos por bactérias que já estariam presentes na água utilizada. Estes dados corroboram com os resultados obtidos pelas técnicas microbiológicas, que detectaram presença de BRS nas amostras-controle dos testes abióticos (ver Tabela 3).

Observamos que BRS planctônicas inoculadas em frascos contendo água corrente desaerada na presença de corpos-de-prova virgens aderiram à superfície metálica, constituindo biofilme visível por MEV (Figs. 11B-E) e por MET (Figs. 11F-J). Nestes testes com injeção de BRS planctônicas, após 4 h já se detectava a colonização bacteriana sobre o corpo-de-prova, formando um biofilme (Fig. 11B) com bactérias íntegras (Fig. 11F), envoltas por elementos eletrodensos de matriz extracelular (Figs. 11F, pontas de setas). A densidade do biofilme bacteriano aumenta com o tempo. Após 24 h de contato das bactérias com o corpo-de-prova, o biofilme apresenta colonização mais densa e homogênea da superfície metálica (Fig. 11C), com uma grande variedade morfológica de bactérias bem preservadas (Figs. 11D-E e Figs. 11G-I) envoltas por glicocálice eletrodense (Figs. 11G-I, pontas de setas), sendo algumas flageladas (Fig. 11E, pontas de setas brancas). Possíveis produtos de corrosão também são vistos associados à superfície das bactérias, identificados pelo caráter floculado de sulfeto de ferro amorfo, tanto por MEV (Figs. 11D-E, setas) quanto por MET (Fig. 11J).

### **1.2.2. Efeito dos biocidas sobre o crescimento dos biofilmes**

Nos testes abióticos, a observação por MEV de corpos-de-prova virgens em contato somente com água corrente desaerada (Figs. 12A-B) ou adicionada das soluções de GA-QAT

(Figs. 12C-D) ou de DTPA (Figs. 12E-F) por 4 h ou 24 h indicou, em geral, ausência de crescimento bacteriano sobre a superfície metálica. Como anteriormente comentado, a superfície irregular do metal apresenta produtos de corrosão e elementos de matriz extracelular produzidos por possíveis bactérias contaminantes da água corrente. Observou-se, especialmente, uma maior precipitação de material floculado de matriz extracelular quando o corpo-de-prova foi colocado em contato com GA-QAT (Figs. 12C-D).

Com base nas análises ultra-estruturais, GA-QAT não foi eficiente para impedir a formação ou mesmo desorganizar o biofilme recém-formado. Imagens de MET (Figs. 12I-J e 12P) revelam padrão semelhante de biofilme formado sobre o metal após 4 h (Figs. 11I-J) e 24 h (Fig. 12P) de exposição das amostras ao agente bactericida, quando comparado à amostra-controle de 4 h (Fig. 12H). Mesmo após tratamento, as células apresentam morfologia e conteúdo citoplasmático preservados. Ressalta-se, entretanto, que o tratamento com GA-QAT está influenciando a estrutura da matriz extracelular, que tende a se condensar sobre o substrato, formando uma camada densa de material precipitado que envolve as células, como observado por MEV após 24 h de tratamento (Fig. 12O, estrelas), e quando comparado ao biofilme-controle de mesmo tempo (Fig. 12N, estrelas). Especialmente, o padrão de reação das substâncias poliméricas extracelulares com o contrastante catiônico vermelho de rutênio, analisado por MET, parece exacerbado, revelado pelo aspecto extremamente eletrodense da matriz, especialmente após 4 h de tratamento com o biocida (Figs. 12I, estrelas), e comparado à amostra-controle (Fig. 12H, estrelas).

Resultados mais evidentes na alteração do padrão de formação do biofilme bacteriano foram obtidos pelo uso da solução à base de DTPA. A partir de 4 h de contato com esta base ativa, biofilme de BRS que se formou sobre o metal apresentava-se restrito a áreas esparsas do corpo-de-prova e com aspecto retraído nas imagens de MEV (Fig. 12L), quando comparado ao biofilme-controle de mesmo tempo (Fig. 12G). Imagens de MET de amostras raspadas de corpos-de-prova, após 4 h (Fig. 12M) e 24 h (Fig. 12Q) de incubação na presença de BRS planctônicas e DTPA, revelaram células colapsadas na grande maioria (Figs. 12M e 12Q, setas), com conteúdo citoplasmático esvaziado, e rodeadas por elementos eletrodensos residuais de matriz extracelular (Figs. 12M e 12Q, estrelas). No tempo de 24 h, não detectamos por MEV imagens de biofilme que pudessem ser registradas, muito provavelmente, devido à remoção da estrutura residual do biofilme alterado (Fig. 12Q, imagem de MET) durante o processamento no aparelho ponto-crítico, que desidrata por completo a amostra.

### **Figura 11**

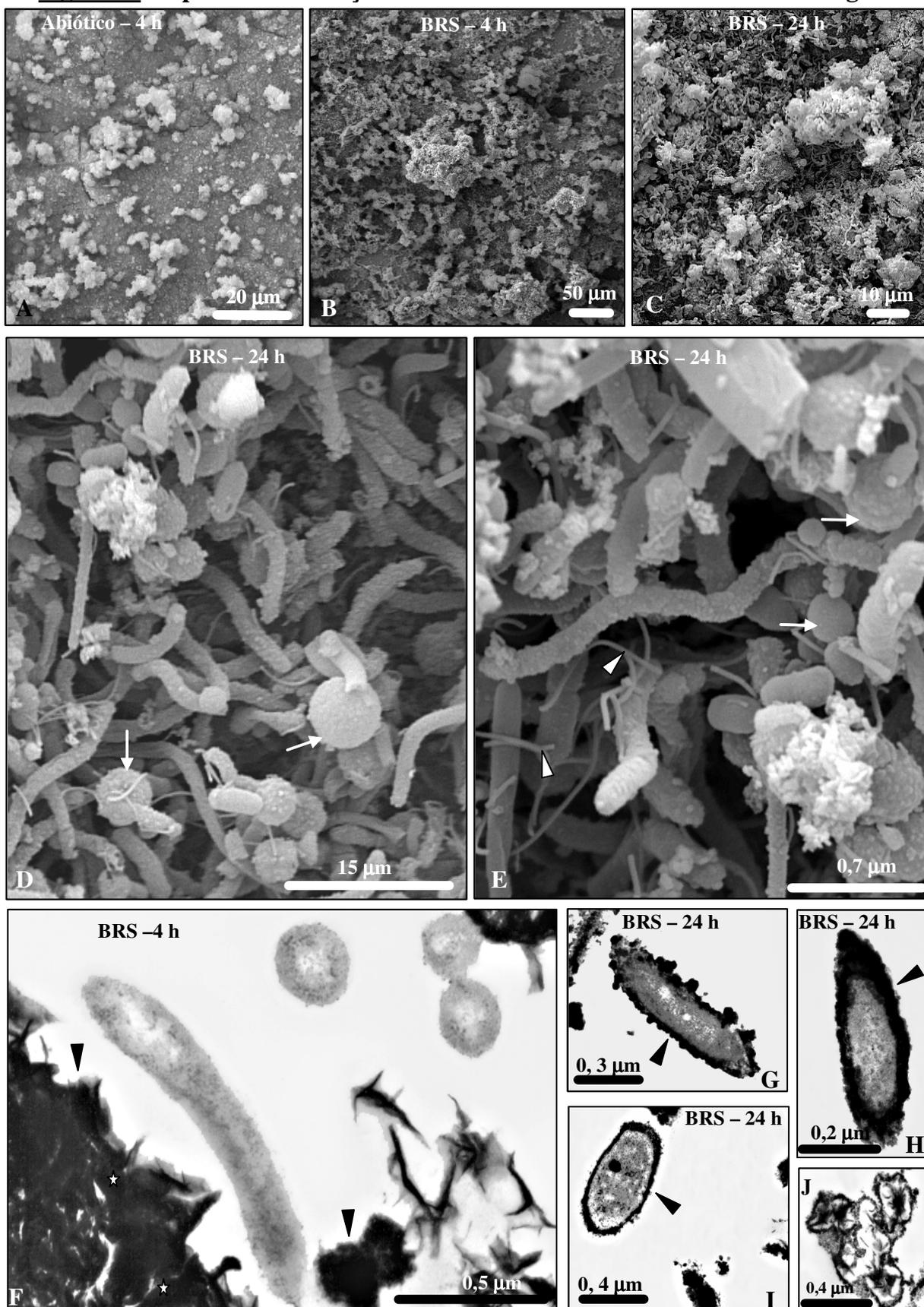
#### **Formação do biofilme sobre a superfície dos corpos-de-prova a partir do inóculo de BRS planctônicas**

**Figura 11A** – imagens de MEV mostrando a aparência do corpo-de-prova após 4 h de incubação em água corrente desaerada sem a injeção de BRS.

**Figuras 11B e 11F**– imagens de MEV (Fig. 11B) e MET (Fig. 11F) dos aspectos de formação do biofilme após 4 h de incubação com BRS planctônicas.

**Figuras 11C-E e 11G-J** – imagens de MEV (Figs. 11C-E) e MET (Figs. 11G-J) dos aspectos de formação do biofilme após 24 h de incubação com BRS planctônicas.

**Figura 11: Aspectos da formação do biofilme em sistema estático de fluxo d'água**



## **Figura 12**

### **Efeito dos biocidas sobre o crescimento dos biofilmes em sistema estático de fluxo d'água**

**Figuras 12A-B** – imagens de MEV mostrando a aparência do corpo-de-prova após 4 h e 24 h de incubação em água corrente sem a injeção de BRS.

**Figuras 12C-D** – imagens de MEV mostrando a aparência do corpo-de-prova após 4 h e 24 h de incubação em água corrente adicionada de GA-QAT sem a injeção de BRS.

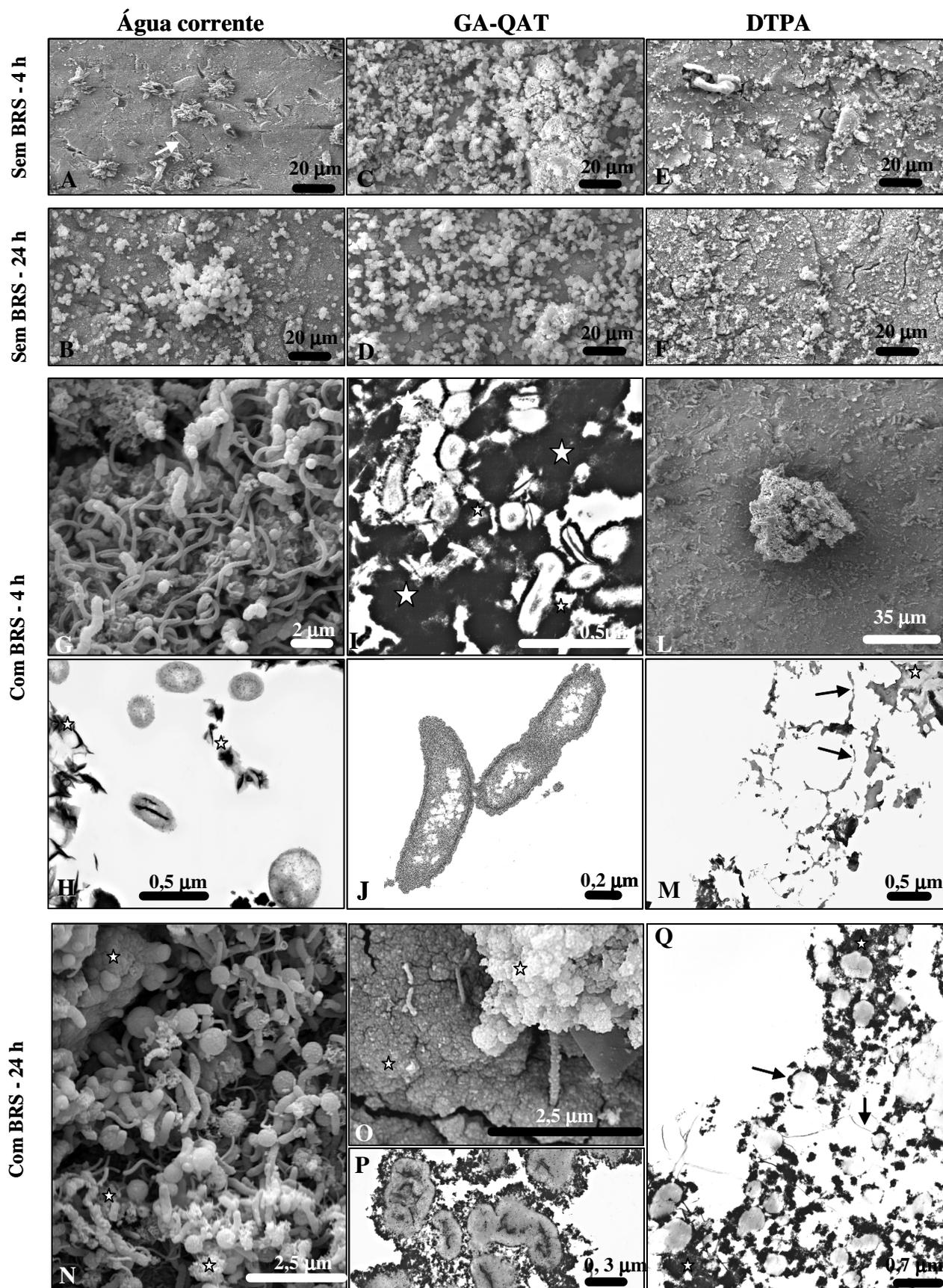
**Figuras 12E-F** – imagens de MEV mostrando a aparência do corpo-de-prova após 4 h e 24 h de incubação em água corrente adicionada de DTPA sem a injeção de BRS.

**Figuras 12G-H e 12N** – imagens de MEV (Figs. 12G e 12N) e MET (Fig. 12H) mostrando os aspectos de formação do biofilme após 4 h de incubação dos corpos-de-prova em água corrente na presença de BRS planctônicas.

**Figuras 12I-J e 12O-P** – imagens de MEV (Fig. 12O) e MET (Figs. 12I-J e 12P) mostrando o efeito do GA-QAT sobre o crescimento do biofilme após 4 h e 24 h de incubação dos corpos-de-prova em água corrente na presença de BRS planctônicas.

**Figuras 12L-M e 12Q** – imagens de MEV (Fig. 12L) e MET (Figs. 12M e 12Q) mostrando o efeito do DTPA sobre o crescimento do biofilme após 4 h e 24 h de incubação dos corpos-de-prova em água corrente na presença de BRS planctônicas.

Figura 12: Efeito dos biocidas sobre o crescimento do biofilme em sistema estático de fluxo d'água



### 1.2.3. Aspecto do biofilme pré-formado de 90 dias sobre corpos-de-prova

Biofilmes de BRS pré-formados por 90 dias sobre corpos-de-prova apresentam-se igualmente maduros e aderidos à superfície do aço-carbono após incubação em água corrente pelos tempos de 4 h (Figs. 13A-B; Figs. 14A e Figs. 14C-D) e 24 h (Figs. 13C-D e Fig. 14B). Análises de MEV (Figs. 13A-D) e MET (Figs. 14A-D) mostram biofilme constituído por m-BRS (predominantemente na forma de bastões e vibriões), íntegras e bem preservadas, formando microcolônias agrupadas em estruturas típicas com forma de cogumelos, que se projetam da superfície e se encontram espaçadas entre si (Fig. 13A, setas). Produtos de corrosão, provavelmente sulfeto de ferro amorfo (Fig. 13B e Fig. 14A, pontas de setas), são vistos associados à estrutura do biofilme, assim como elementos de glicocálice e matriz extracelular (Fig. 13D e Figs. 14 A-D, setas). A presença desses elementos foi comprovada pela microanálise de raios-X, cujos resultados são mostrados nas Figs. 14E-F, que correspondem, respectivamente, às estruturas apontadas pelas setas nas Figs. 14C e 14D. Por essa técnica, observou-se uma quantidade significativa dos elementos ferro, oxigênio, rutênio, enxofre, magnésio e cálcio. A detecção de ferro e enxofre (Figs. 14E-F, picos em destaque) comprova a presença do produto de corrosão sulfeto de ferro, em torno da superfície das bactérias e entremeado na matriz extracelular que, por sua natureza aniônica, se associa ao composto catiônico vermelho de rutênio, cujo elemento rutênio foi também detectado pela análise elemental (Figs. 14E-F, pico em destaque). O Fe pode, também, estar presente na forma de óxidos, hidróxidos e carbonato, outros possíveis produtos de corrosão. Frequentemente, a matriz extracelular está colapsada nas micrografias de ME (Fig. 13D e Fig. 14 A, setas), como já era esperado, uma vez que sendo uma estrutura altamente hidratada, tende a se desorganizar e retraindurante a etapa de desidratação do processamento para ME. Essas e outras imagens de amostras-controle servirão como referência para análises de efeito dos biocidas sobre a estrutura de biofilmes tratados, considerando que o protocolo de preservação das células e da estrutura dos biofilmes para análise por ME mostrou-se satisfatório.

### 1.2.4. Efeito dos biocidas sobre biofilme pré-formado de 90 dias

Um painel morfológico do efeito dos biocidas GA-QAT e DTPA sobre biofilmes pré-formados de 90 dias é mostrado por imagens de MEV em pequeno aumento na Fig. 15. Os corpos-de-prova tratados após 4 h (Fig. 15C) e 24 h (Fig. 15D) com a solução contendo GA-QAT mostraram um biofilme bacteriano semelhante ao que foi observado nas respectivas situações-controle (Figs. 15 A-B). Após o uso das bases ativas GA-QAT, a estrutura do

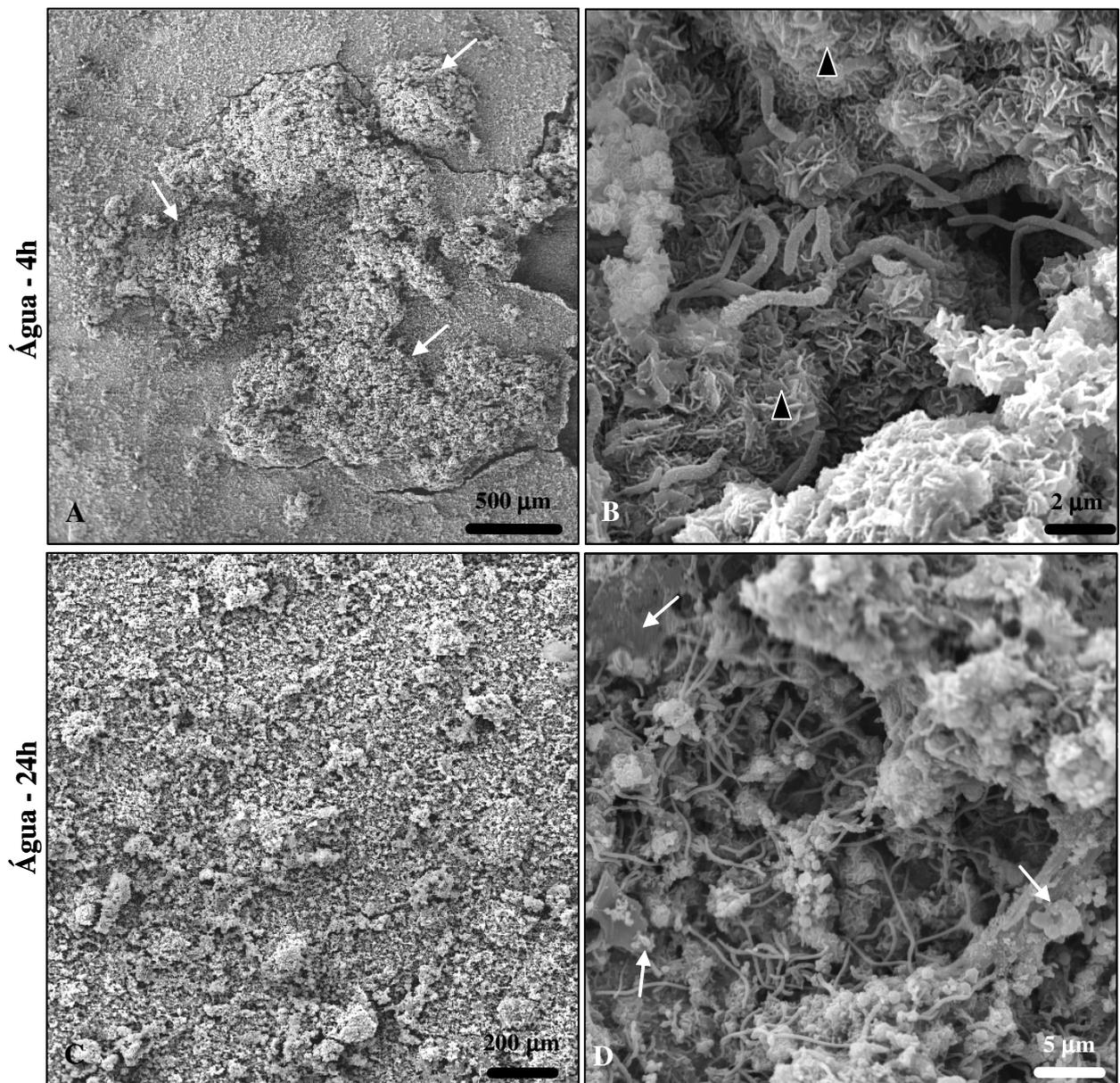
**Figura 13**

**Aspectos em MEV do biofilme pré-formado de 90 dias sobre os corpos-de-prova**

**Figuras 13A-B** – imagens em menor (Fig. 13A) e maior aumento (Fig. 13B) dos aspectos do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h de incubação em água corrente.

**Figuras 13C-D** – imagens em menor (Fig. 13C) e maior aumento (Fig. 13D) dos aspectos do biofilme pré-formado de 90 dias após 24 h de incubação em água corrente.

**Figura 13:** Aspecto em MEV do biofilme pré-formado de 90 dias inserido em sistema estático de fluxo d'água



### **Figura 14**

**Aspecto em MET e análise elemental do biofilme pré-formado de 90 dias sobre os corpos-de-prova imersos em água corrente desaerada sob condições estáticas de fluxo d'água**

**Figura 14A** – imagem do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h de incubação em água corrente.

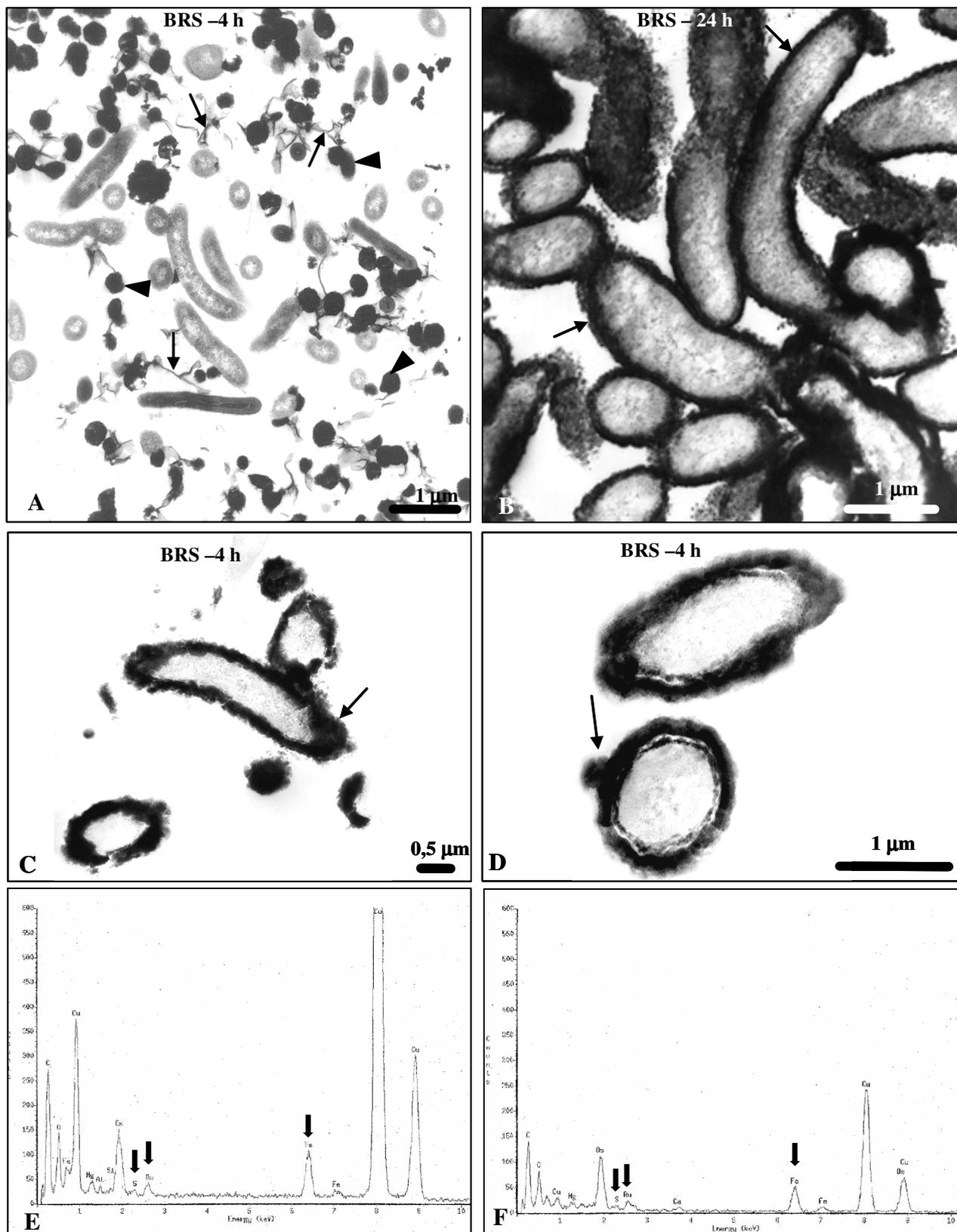
**Figura 14B** – imagem do biofilme pré-formado de 90 dias após 24 h de incubação em água corrente.

**Figuras 14C-D** – imagens de bactérias de biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h de incubação em água corrente.

**Figura 14E** – espectro de energia dispersiva de raios-X realizado sobre o glicocálice da bactéria apontada pela seta na Fig. 14C.

**Figura 14F** – espectro de energia dispersiva de raios-X realizado sobre o glicocálice da bactéria apontada pela seta na Fig. 14D.

**Figura 14:** Aspecto em MET e análise elemental do biofilme pré-formado de 90 dias inserido em sistema estático de fluxo d'água



biofilme, vista por MEV, não sofreu grandes modificações. As microcolônias estão presentes de forma homogênea na superfície do metal. Já nos testes realizados após contatos de 4 h (Fig. 15E) e 24 h (Fig. 15F) dos corpos-de-prova com solução à base de DTPA, as microcolônias que constituem o biofilme encontram-se presentes, mas retraídas (Fig. 15E, setas) e ocupando de forma heterogênea a superfície, sendo possível observar áreas descobertas do metal (Figs. 15E-F, estrelas), não visualizadas nas amostras-controle (Figs. 15A-B). Aparentemente, o efeito do DTPA sobre essa cultura teve maior eficiência na remoção do biofilme após 24h de exposição dos corpos-de-prova ao produto (Fig. 15F). O efeito de ambos os biocidas sobre a estrutura dos biofilmes pôde ser mais bem avaliado por imagens de MEV em maior aumento (Figs. 16A-F). Essas imagens confirmam que, após tratamento com GA-QAT por 4 h (Fig. 16C) e 24 h (Fig. 16D), as BRS permaneciam aderidas ao metal e apresentavam morfologia preservada. Nas amostras tratadas por 24 h com esse biocida, elementos de matriz extracelular, freqüentemente, mostravam-se condensados em forma de placas (Fig. 16D, estrelas), aspecto pouco observado nas amostras-controle (Fig. 16B). Em relação ao DTPA, seu efeito drástico na desorganização do biofilme foi melhor observado nas imagens de MEV de maior aumento (Figs. 16E-F). Após 4 h (Fig. 16E) na presença desse produto, o biofilme se assemelhava a uma biomassa disforme de células "derretidas" imersas em restos de elementos de matriz extracelular, com efeito cumulativo após 24 h de tratamento (Fig. 16F).

Biofilmes pré-formados de 90 dias raspados de corpos-de-prova tratados ou não tratados com GA-QAT e DTPA foram também analisados por MET. Similar ao que foi observado por MEV, em relação ao GA-QAT não se observou mudanças morfológicas nas células dos biofilmes expostos a esse agente bactericida por 4 h (Fig. 17C) e 24 h (Figs. 17D-E), quando comparadas àquelas presentes nos biofilmes-controle após 4 h (Fig. 17A) e 24 h (Fig. 17B) de incubação em água corrente. Por outro lado, a drástica desorganização sofrida pelo biofilme exposto ao DTPA por 4 h é claramente identificada nas imagens de cortes ultrafinos analisadas por MET (Figs. 17F-L). Essas imagens mostram grandes quantidades de restos espalhados de parede celular de bactérias (Figs. 17F-I, pontas de setas), bactérias com conteúdo citoplasmático esvaziado e superfície irregular (Figs. 17F-J, setas finas), imobilizadas por restos residuais de elementos de matriz extracelular (Figs. 17G-J, estrelas). Eventualmente, observava-se algumas bactérias com morfologia e conteúdo citoplasmático preservados (Fig. 16E, seta; Figs. 17G e 17J-L, setas grossas) ao lado de células colapsadas (Figs. 17F-J, setas finas).

**Figura 15**

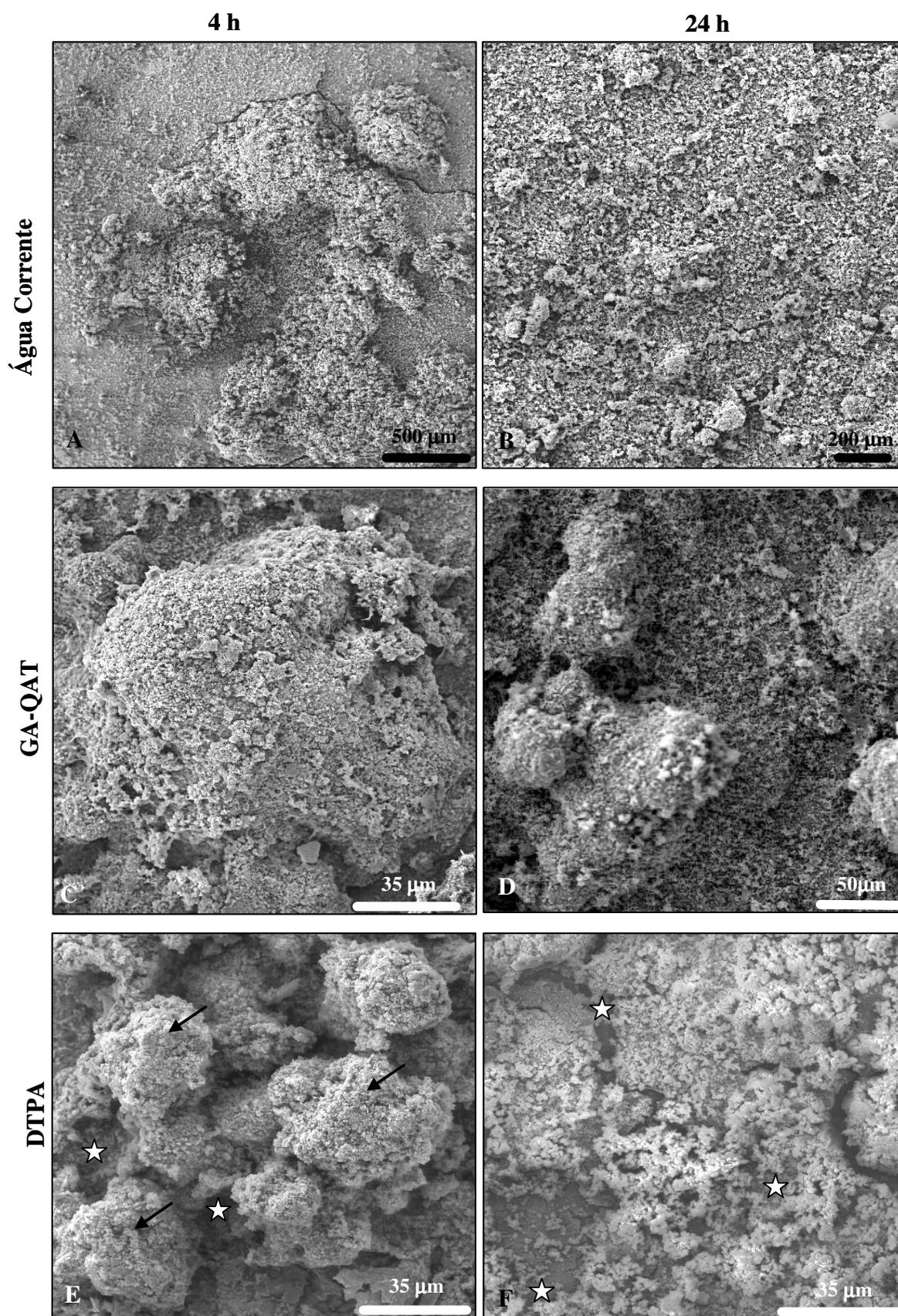
**Aspectos em MEV (menor aumento) do efeito dos biocidas na desorganização do biofilme pré-formado de 90 dias em sistema estático de fluxo d'água**

**Figuras 15A-B** – imagens de MEV mostrando a morfologia do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 15A) e 24 h (Fig. 15B) de incubação em água corrente.

**Figuras 15C-D** – imagens de MEV mostrando o efeito do GA-QAT sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 15C) e 24 h (Fig. 15D) de tratamento.

**Figuras 15E-F** – imagens de MEV mostrando o efeito do DTPA sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 15E) e 24 h (Fig. 15F) de tratamento.

**Figura 15:** Efeito dos biocidas sobre o biofilme pré-formado de 90 dias



**Figura 16**

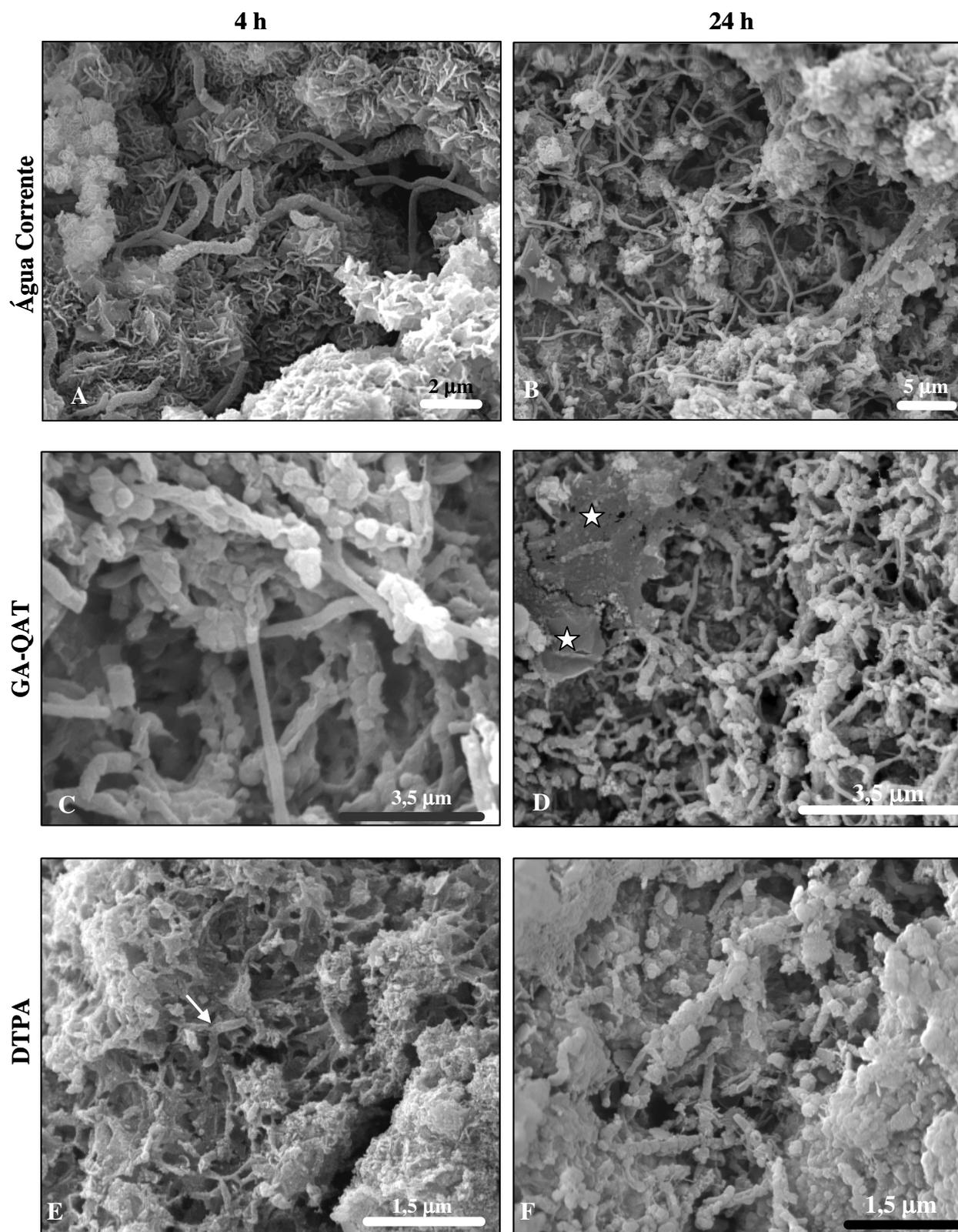
**Aspectos em MEV (maior aumento) do efeito dos biocidas na desorganização do biofilme pré-formado de 90 dias em sistema estático de fluxo d'água**

**Figuras 16A-B** – imagens de MEV mostrando a morfologia do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 16A) e 24 h (Fig. 16B) de tratamento.

**Figuras 16C-D** – imagens de MEV mostrando o efeito do GA-QAT sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 16C) e 24 h (Fig. 16D) de tratamento.

**Figuras 16E-F** – imagens de MEV mostrando o efeito do DTPA sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 16E) e 24 h (Fig. 16F) de tratamento.

**Figura 16:** Efeito dos biocidas sobre o biofilme pré-formado de 90 dias



**Figura 17**

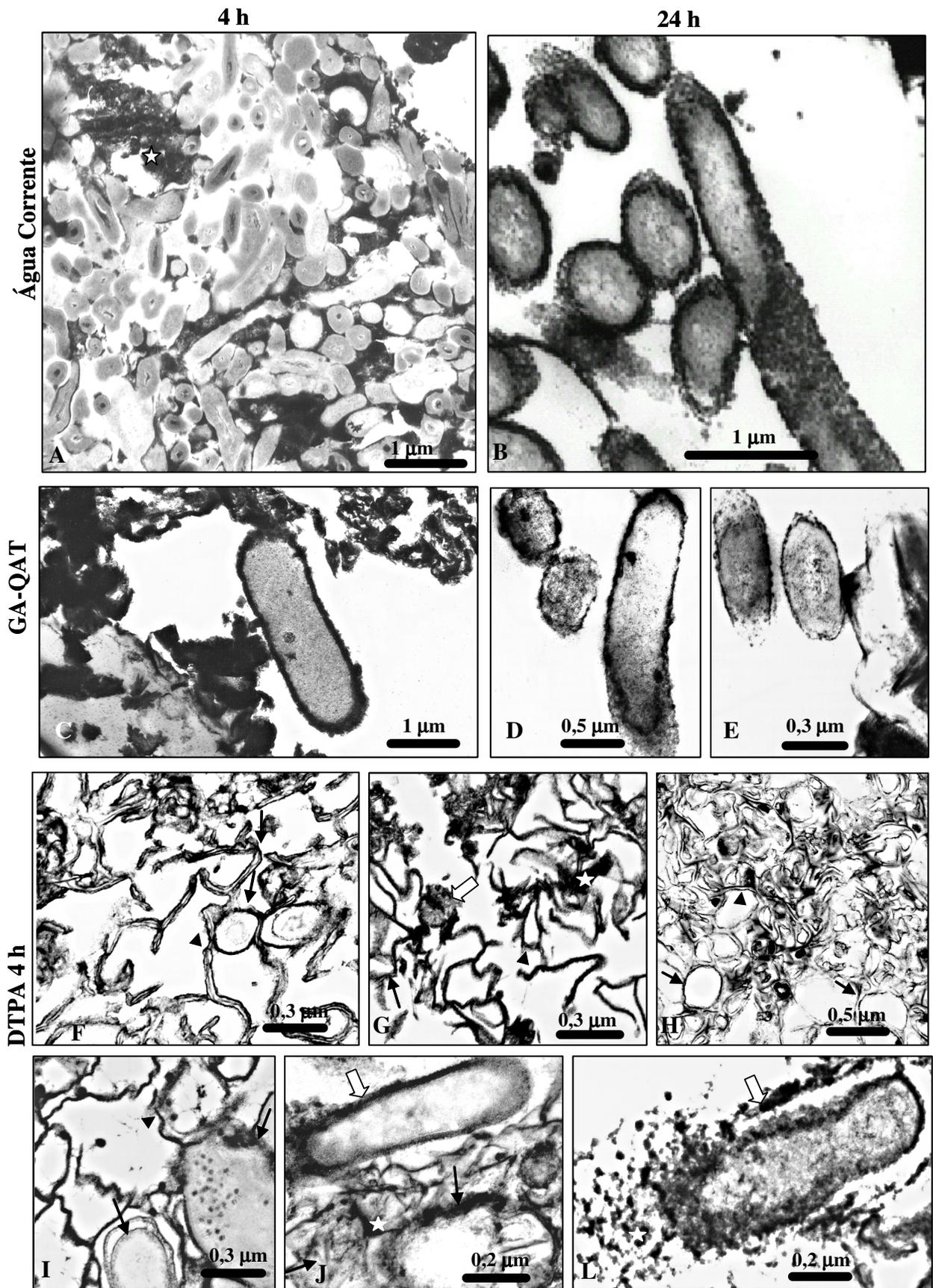
**Aspectos em MET do efeito dos biocidas na desorganização do biofilme pré-formado de 90 dias em sistema estático de fluxo d'água**

**Figuras 17A-B** – imagens de MET mostrando a morfologia estrutural do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 17A) e 24 h (Fig. 17B) de incubação em água corrente.

**Figuras 17C-E** – imagens de MET mostrando o efeito do GA-QAT sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h (Fig. 17C) e 24 h (Figs. 17D-E) de tratamento.

**Figuras 17F-L** – imagens de MET mostrando o efeito do DTPA sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 90 dias após 4 h de tratamento.

**Figura 17: Efeito dos biocidas sobre o biofilme pré-formado de 90 dias**



## 2. Sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop")

Dois testes independentes foram realizados em sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop") para avaliação da formação de biofilmes bacterianos e sua desorganização após tratamento biocida. Duas soluções biocidas foram testadas: glutaraldeído (GA) isoladamente e glutaraldeído conjugado com sais quaternários de amônio (GA-QAT). Análises microbiológicas e ultra-estruturais e microanálises de raios-X foram realizadas para estes testes.

Os ensaios em sistema dinâmico não foram correspondentes aos ensaios feitos em sistema estático, pois, nessa ocasião, o "loop" estava em fase final de desenvolvimento pelo CENPES. Portanto, o efeito biocida do DTPA, composto que obteve os melhores resultados em sistema estático, não pôde ser avaliado nesses experimentos.

### 2.1. Avaliações microbiológicas do efeito biocida do glutaraldeído (GA) isoladamente ou coadjuvado com sais quaternários de amônio (GA-QAT) na inibição de bactérias redutoras de sulfato mesófilas (m-BRS) e de bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT)

Os ensaios microbiológicos de seleção de bases ativas para o controle de processos corrosivos influenciados por microorganismos (CIM) aplicados ao sistema estático de fluxo d'água foram adaptados e incrementados para a avaliação em sistema dinâmico ("loop"). Foram realizadas as seguintes análises: (1) atividade de bactérias redutoras de sulfato mesófilas (m-BRS); (2) concentrações de m-BRS e de bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT).

A inibição da atividade de BRS presentes em solução e aderidas aos corpos-de-prova está relacionada tanto ao número de bactérias quanto à capacidade das mesmas de metabolizarem os substratos disponíveis no meio. A atividade de m-BRS sésseis e planctônicas durante os ensaios microbiológicos foi avaliada pelo índice obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de atividade de m-BRS} = 28^* / \text{tempo de detecção em dias}$$

*\*tempo máximo de incubação (dias)*

Assim sendo, quanto mais baixa é a atividade de bactérias, presentes no fluido ou aderidas aos corpos-de-prova, mais eficiente é a base ativa (Tabela 5).

O principal critério adotado para avaliação da eficiência biocida de produtos é a

inibição do crescimento (concentração) de bactérias sésseis e planctônicas. O produto é considerado eficiente quando inibe o crescimento de bactérias na amostra. Caso a amostra apresente concentração de bactérias acima de  $10^3$  NMP por ml ou por  $\text{cm}^2$  de área de corpo-de-prova, ele é considerado pouco eficiente (Brözel e cols., 1995). Os critérios aplicados no presente trabalho para avaliação da eficiência da inibição do crescimento de BRS e BANHT pelo uso de bases ativas estão sumarizados na Tabela 5.

**Tabela 5**  
**Eficiência biocida com base na atividade e na concentração de bactérias**

EFICIÊNCIA	ÍNDICE DE ATIVIDADE	CONCENTRAÇÃO
ALTA	$\leq 1,33$	Não detecção
MÉDIA	1,33 a 4	$10^0 - 10^2$ NMP / ml ou $\text{cm}^2$
BAIXA	$> 4$	$>10^3$ NMP / ml ou $\text{cm}^2$

**Tabela 5:** Critérios aplicados para estimar o grau de eficiência de biocidas no controle da atividade de m-BRS e das concentrações de m-BRS e BANHT, sésseis e planctônicas.

### 2.1.1. Efeito biocida do glutaraldeído (GA)

Os resultados das análises microbiológicas do primeiro teste realizado no sistema "loop" estão apresentados na Tabela 6. A população de bactérias planctônicas e sésseis foi monitorada a fim de acompanhar seus perfis de crescimento no sistema antes e após adição do biocida. Amostras de fluido e de corpos-de-prova foram retiradas para detecção da concentração e da atividade de m-BRS e BANHT planctônicas.

As concentrações de m-BRS e de BANHT planctônicas inicialmente presentes no sistema (após 15 min do inóculo das bactérias) era de  $1,1 \times 10^2$  NMP / ml e  $9,5 \times 10^4$  NMP / ml, respectivamente (Tabela 6). A concentração de ambas as bactérias em solução mostrou uma tendência inicial de aumento (aproximadamente  $10^5$  NMP / ml após 6 dias) e depois de diminuição (aproximadamente  $10^2$  NMP / ml após 12 dias). As bactérias sésseis foram analisadas somente após o décimo segundo dia de inóculo, cujas concentrações foram de  $10^6$  NMP /  $\text{cm}^2$  e  $10^4$  NMP /  $\text{cm}^2$  para m-BRS e BANHT, respectivamente.

A detecção da atividade de m-BRS foi também acompanhada inoculando-se em meio Postgate E modificadas amostras retiradas do "loop". A detecção de BRS foi acompanhada pelo enegrecimento do meio, que é consequência da reação do produto metabólico dessas bactérias,  $\text{H}_2\text{S}$ , com o ferro presente no meio (ou extraído do corpo-de-prova) para formar o composto negro sulfeto de ferro. Amostras líquidas retiradas do "loop" após 15 min, 6 e 12 dias do inóculo e incubadas em meio Postgate E modificadas apresentaram m-BRS planctônicas após 4, 2 e 3 dias, respectivamente (Tabela 6). Esses dados se correlacionam

inversamente com aqueles relativos à concentração de bactérias pela técnica do NMP (acima descritos). Ou seja, à medida que aumenta o NMP de bactérias planctônicas nos tempos amostrados, diminui o número de dias necessários para a detecção de m-BRS e vice-versa. BRS raspadas de corpos-de-prova retirados do "loop" no décimo segundo dia cresceram após 2 dias de incubação em meio Postgate E modificado. Os índices de atividade bacteriana para m-BRS planctônicas e sésseis nas condições acima descritas estão apresentados na Tabela 7.

Após 12 dias de inóculo das bactérias no sistema "loop", GA foi adicionado ao sistema. O tratamento com GA inibiu completamente a concentração de bactérias planctônicas (m-BRS e BANHT) presentes no "loop" em todos os tempos de contato (Tabela 6). Quanto às bactérias sésseis, notou-se que o grau de inibição foi sensivelmente governado pelo tempo de contato da base ativa com o biofilme aderido. Nesse caso, GA promoveu uma redução da ordem de  $10^4$  NMP / cm<sup>2</sup> para m-BRS sésseis e de  $10^2$  NMP / cm<sup>2</sup> para BANHT, somente no tempo de contato de 24 h (Tabela 6).

Os índices de detecção de atividade metabólica (Tabelas 5 e 7) foram aplicados com o objetivo de avaliar a eficiência biocida do GA sobre m-BRS (Tabela 8). As análises mostraram que GA foi eficiente para inibir a atividade de m-BRS planctônicas em todos os tempos de contato (Tabelas 7 e 8). Entretanto, esse produto não apresentou o mesmo grau de eficiência sobre a atividade metabólica de m-BRS sésseis (Tabelas 7 e 8). Os índices obtidos para m-BRS sésseis após adição de GA foram superiores a 4 (Tabela 7) após 1 h e 4 h de contato com GA, o que caracteriza baixa eficiência do biocida. O melhor índice de atividade bacteriana foi obtido para BRS sésseis após 24 h de contato com o produto (Índice 2, Tabela 7), caracterizando uma eficiência biocida mediana do GA (Tabela 8).

Avaliando-se o conjunto dos resultados obtidos em relação à inibição do crescimento dos grupos de m-BRS e BANHT (Tabela 6), verificou-se que o GA apresentou maior eficiência biocida sobre as bactérias na forma planctônica (em suspensão), nos tempos de contato de 1 h, 4 h e 24 h (Tabela 8). Entretanto, quando estas bactérias se encontraram aderidas e protegidas pela matriz do biofilme, o GA apresentou baixa eficiência nos menores tempos de contato (1 h e 4 h), atingindo grau médio de eficiência com o tempo de contato de 24 h (Tabela 8).

**Tabela 6**  
**Deteção da atividade e das concentrações de bactérias planctônicas e sésseis na ausência e presença de GA no sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop")**

	Tempo de cultivo	BACTÉRIAS PLANCTÔNICAS			BACTÉRIAS SÉSSEIS		
		m-BRS		BANHT	m-BRS		BANHT
		Deteção em dias	NMP / ml	NMP / ml	Deteção em dias	NMP / cm <sup>2</sup>	NMP / cm <sup>2</sup>
Após inóculo das culturas	15 min	4	1,1 x10 <sup>2</sup>	9,5 x10 <sup>4</sup>	-	-	-
	6 dias	2	2,5x10 <sup>5</sup>	4,5 x10 <sup>5</sup>	-	-	-
	12 dias	3	4,5 x10 <sup>2</sup>	2 x10 <sup>2</sup>	2	3,8 x10 <sup>6</sup>	4,4 x10 <sup>4</sup>
Após adição do biocida	1 h	ND	ND	ND	4	4,5 x10 <sup>5</sup>	4,4 x10 <sup>4</sup>
	4 h	ND	7	ND	5	1,2 x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>4</sup>
	24 h	ND	ND	ND	14	1,6 x10 <sup>2</sup>	1,6 x10 <sup>2</sup>

**Tabela 6:** Deteção de m-BRS (em dias), comprovada pelo enegrecimento do meio Postgate E modificado, e das concentrações de m-BRS e de BANHT pelo método do NMP, antes e após tratamento com glutaraldeído (GA) de bactérias planctônicas e sésseis cultivadas no sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop"). [ND – não detectado]

**Tabela 7**

**Aplicação do índice de deteção de atividade de m-BRS planctônicas e sésseis na ausência e presença de GA**

	Tempo de cultivo	Índice de atividade bacteriana (28 / tempo de deteção em dias)	
		m-BRS Planctônicas	m-BRS Sésseis
Após inóculo das culturas	15 min	28/4 = 7	-
	6 dias	28/2 = 14	-
	12 dias	28/3 =9,33	28/ 2 = 14
Após adição de GA	1 h	ND	28/ 4 = 7
	4 h	ND	28,0 / 5 =5,6
	24 h	ND	28/ 14= 2

**Tabela 7:** Aplicação do índice de atividade bacteriana (28 dias / tempo de deteção em dias) para avaliação da eficiência biocida da base ativa glutaraldeído (GA) no controle de BRS planctônicas e sésseis.

Tabela 8

**Eficiência de GA na inibição da atividade de m-BRS e das concentrações de m-BRS e de BANHT**

Formas de bactéria	Tempo de contato com o biocida	m-BRS		BANHT
		Inibição da atividade	Inibição da concentração	Inibição da concentração
Planctônica	1 h	alta	alta	alta
	4 h	alta	média	média
	24 h	Alta	alta	alta
Séssil	1 h	baixa	baixa	baixa
	4 h	Baixa	baixa	baixa
	24 h	Média	média	média

**Tabela 8:** Avaliação da eficiência da base ativa glutaraldeído (GA) na inibição da atividade de m-BRS e nas concentrações de m-BRS e de BANHT, com base nos critérios estabelecidos para estimar o grau de eficiência biocida (Vide Tabela 5).

### 2.1.2. Efeito biocida do glutaraldeído coadjuvado com sais quaternários de amônio (GA-QAT)

Os resultados das análises microbiológicas do segundo teste realizado no sistema "loop" estão apresentados na Tabela 9. O crescimento das bactérias planctônicas e sésseis foi monitorado antes e após a injeção das bases ativas.

Após 4 h de inóculo de m-BRS e BANHT, a concentração dessas bactérias no fluido era de  $7 \times 10^4$  NMP / ml e  $1,4 \times 10^8$  NMP / ml, respectivamente. No décimo primeiro dia do inóculo das bactérias, detectaram-se níveis de  $10^6$  NMP / ml, para ambas m-BRS e BANHT presentes em amostras de fluido. As concentrações das bactérias sésseis no décimo primeiro dia após o inóculo foram da ordem de  $10^8$  NMP / cm<sup>2</sup> para ambas m-BRS e BANHT, respectivamente.

A detecção da atividade de m-BRS foi também acompanhada. Amostras de fluido e de corpo-de-prova retiradas do "loop" após 11 dias do inóculo e incubadas em meio Postgate E modificado apresentaram m-BRS planctônicas e m-BRS sésseis após 4 e 3 dias, respectivamente. Os respectivos índices de atividade bacteriana estão apresentados na Tabela 10.

Após 11 dias de inóculo das bactérias no sistema "loop", QAT foi dosado por 24 h e, posteriormente, GA foi adicionado ao sistema. Amostras de fluido e de corpos-de-prova foram retiradas para análises microbiológicas após 1 h, 4 h e 24 h de adição de GA. O tratamento com GA inibiu completamente a concentração de bactérias planctônicas (m-BRS

BANHT) presentes no "loop" nos tempos de contato de 1 h e 4 h, mas observa-se recuperação do crescimento bacteriano após 24 h de contato com GA (Tabela 9). Quanto às bactérias sésseis, observou-se que as mesmas foram inibidas após 1 h de contato com GA, com redução da ordem de  $10^6$  NMP /  $\text{cm}^2$  para m-BRS e  $10^5$  NMP /  $\text{cm}^2$  para BANHT. Semelhante ao que foi observado para BRS planctônicas, detectou-se a mesma tendência de recuperação do crescimento da população bacteriana sésil após o choque inicial causado pelo tratamento com GA.

Os índices de detecção de atividade metabólica (Tabela 5) foram aplicados (Tabela 10) com o objetivo de avaliar a eficiência biocida do GA-QAT sobre m-BRS (Tabela 11). As análises mostraram que GA-QAT apresentou alta eficiência para inibir a atividade de m-BRS planctônicas nos tempos de contato de 1 h e 4 h após contato com GA, e eficiência média após 24 h na presença desse biocida (Tabelas 10 e 11). Entretanto, essa base ativa não apresentou o mesmo grau de eficiência sobre a atividade metabólica de m-BRS sésseis (Tabelas 10 e 11). Nesse caso, o tratamento apresentou eficiência média após 1 h e 4 h de contato com GA e baixa eficiência após 24 h em sua presença.

Conclui-se que o tratamento dos grupos de m-BRS e BANHT com GA coadjuvado com QAT apresentou maior eficiência biocida sobre as bactérias na forma planctônica (em suspensão), nos tempos de contato de 1 h e 4 h (Tabela 11). Entretanto, como observado nos resultados obtidos no primeiro teste no "loop" com uso do GA, quando estas bactérias se encontravam aderidas e protegidas pela matriz do biofilme, a eficiência do tratamento foi menor. Mas, ao contrário do que foi observado no primeiro teste somente com GA, no qual o tratamento se mostrou mais eficiente em tempos maiores, as bactérias foram sensíveis ao contato inicial com o biocida, até o tempo máximo avaliado de 4 h, mas recuperaram atividade e crescimento após 24 h. É importante ressaltar que a dosagem de GA foi a mesma (250 ppm do produto) nos dois testes, mas a concentração das bactérias no "loop", imediatamente antes da aplicação do biocida, foi consideravelmente menor no primeiro teste com GA do que no segundo teste com GA-QAT (Tabelas 6 e 9). Esta variável pode ter influenciado a eficiência dos produtos no controle bacteriano.

Tabela 9

**Deteção da atividade e das concentrações de bactérias planctônicas e sésseis na ausência e presença de GA-QAT no sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop")**

	Tempo de cultivo	BACTÉRIAS PLANCTÔNICAS			BACTÉRIAS SÉSSEIS		
		m-BRS		BANHT	m-BRS		BANHT
		Deteção em dias	NMP / ml	NMP / ml	Deteção em dias	NMP / cm <sup>2</sup>	NMP / cm <sup>2</sup>
Após inóculo das culturas	4 h	-	$7 \times 10^4$	$\geq 1,4 \times 10^8$	-	-	-
	11 dias	4	$1,1 \times 10^6$	$3 \times 10^6$	3	$1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
Após adição do biocida (QAT 24 h + GA nos diversos tempos)	1 h	ND	ND	ND	8	$8,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^3$
	4 h	ND	ND	ND	10	$6,3 \times 10^6$	$4 \times 10^3$
	24 h	10	$1,5 \times 10^3$	$2 \times 10^4$	5	$4,6 \times 10^6$	$\geq 5,8 \times 10^9$

**Tabela 9:** Deteção de m-BRS (em dias), comprovada pelo enegrecimento do meio Postgate E modificado, e das concentrações de m-BRS e de BANHT pelo método do NMP, antes e após tratamento de bactérias planctônicas e sésseis com sais quaternários de amônio (QAT) e glutaraldeído (GA) durante ensaio realizado no sistema dinâmico de fluxo d'água ("loop"). [ND – não detectado]

Tabela 10

**Aplicação do índice de deteção de atividade de m-BRS planctônicas e sésseis na ausência e presença de GA-QAT**

	Tempo de cultivo	Índice de atividade bacteriana (28 / tempo de deteção em dias)	
		m-BRS Planctônicas	m-BRS Sésseis
Após inóculo das culturas	11 dias	$28 / 4 = 7$	$28 / 3 = 9,3$
Após adição de QAT por 24 h + GA nos diversos tempos)	1 h	ND	$28 / 8 = 3,5$
	4 h	ND	$28 / 10 = 2,8$
	24 h	$28 / 10 = 2,8$	$28 / 5 = 5,6$

**Tabela 10:** Aplicação do índice de atividade bacteriana (28 dias / tempo de deteção em dias) para avaliação da eficiência biocida da base ativa glutaraldeído (GA) coadjuvada com pré-tratamento com sais quaternários de amônio (QAT) no controle de m-BRS planctônicas e sésseis.

Tabela 11

**Eficiência de GA-QAT na inibição da atividade de m-BRS e das concentrações de m-BRS e de BANHT**

Formas de bactéria	Tempo de contato com o biocida	m-BRS		BANHT
		Inibição da atividade	Inibição da concentração	Inibição da concentração
Planctônica	1 h	alta	alta	alta
	4 h	alta	alta	alta
	24 h	média	baixa	baixa
Séssil	1 h	média	média	baixa
	4 h	média	baixa	baixa
	24 h	baixa	baixa	baixa

**Tabela 11:** Avaliação da eficiência da base ativa glutaraldeído (GA) coadjuvada com sais quaternários de amônio (QAT) na inibição da atividade de m-BRS e nas concentrações de m-BRS e de BANHT, com base nos critérios estabelecidos para estimar o grau de eficiência biocida (Vide Tabela 5).

## 2.2. Crescimento de bactérias planctônicas e sésseis em sistema dinâmico de fluxo d'água "loop" na ausência e presença de biocidas

Amostras de fluido, de corpos-de-prova e da tubulação PVC foram retiradas do sistema dinâmico ("loop") antes e após tratamento com biocidas GA e GA-QAT para avaliações ultra-estruturais e por microanálise de raios-X.

### 2.2.1. Formação do biofilme em sistema dinâmico de fluxo d'água "loop": avaliação ultra-estrutural

A cinética de formação do biofilme bacteriano em condições dinâmicas de fluxo d'água "loop" foi analisada por MEV (Figs. 18A-F). Após 24 h de incubação do corpo-de-prova na presença das bactérias inoculadas no sistema (Figs. 18A-B), a superfície do metal apresentava um relevo irregular, parcialmente coberto por elementos de matriz extracelular (Fig. 18B, estrelas) envolvendo poucas bactérias em forma de bastão (Fig. 18B, setas). A densidade de colonização bacteriana sobre o corpo-de-prova aumentou gradativamente com o passar do tempo. Após 48 h (Figs. 18C-D), observa-se adesão de grande quantidade de bactérias, filamentosas na sua maioria, mas pouco material de matriz extracelular. Após 4 dias (Figs. 18E-F), biofilme bacteriano denso coloniza grandes extensões da superfície do metal e apresenta-se constituído por bactérias (Fig. 18F, setas) envoltas por uma maior quantidade de elementos de matriz extracelular (Fig. 18F, estrelas).

### 2.2.2. Efeito do glutaraldeído (GA) sobre biofilmes pré-formados no "loop" e sobre bactérias planctônicas: ultra-estrutura e microanálise de raios-X

Após 12 dias de incubação dos corpos-de-prova com as bactérias inoculadas em sistema dinâmico "loop", GA foi adicionado ao sistema. Imagens de MEV (Figs. 19A-H) e MET (Figs. 20A-H) mostram que o biofilme pré-formado não apresentou mudanças em sua estrutura após 1 h (Figs. 19C-D e 20C-D) e 4 h (Figs. 19E-F e 20E-F) na presença do biocida, comparadas às imagens-controle do biofilme pré-formado por 12 dias (Figs. 19A-B e 20A-B). As bactérias permaneceram aderidas e com morfologia preservada. Somente a matriz extracelular parece mais concentrada nas amostras tratadas, comparadas às amostras-controle, formando grumos vistos por MEV (Figs. 19D e 19F, estrelas) ou com densidade aumentada quando vista por MET (Figs. 20C-D e 20F-G, estrelas). Aparentemente, somente após 24 h de tratamento (Figs. 19G-H) o biocida interfere com o biofilme, cuja estrutura se mostra desorganizada e parcialmente destacada da superfície, embora as bactérias observadas por MET (Figs. 20G-H) revelem morfologia e conteúdo preservados. Adicionalmente, por MEV, observa-se grande precipitação de sulfeto de ferro sobre a superfície (Fig. 19H, asteriscos) e envolvendo as bactérias (Fig. 19H, setas).

Bactérias planctônicas retiradas de amostras de fluido do sistema antes (Figs. 21A-H) e após (Figs. 22A-H) tratamento com GA por 1 h (Figs. 22A-C), 4 h (Figs. 22D-F) e 24 h (Figs. 22G-H) foram avaliadas por MET e pela técnica de microanálise de raios-X. As análises ultra-estruturais revelaram bactérias gram-negativas em forma de bastões e vibriões, com matriz extracelular filamentosa, tanto nas amostras-controle (Figs. 21 A-B) como nas amostras tratadas (Figs. 22 A-H). O aspecto filamentoso da matriz extracelular das bactérias planctônicas difere daquele denso e amorfo geralmente encontrado associado a bactérias sésseis. Na microanálise de raios-X de bactérias planctônicas, antes (Figs. 21C-H) e após (Figs. 22I-J) tratamento com o biocida, destaca-se a presença dos elementos químicos Fe, S, e Ru, associados ao glicocálice e matriz extracelular, mas ausentes no citoplasma dessas células. A detecção de Fe e S, mais uma vez, comprova a presença do produto de corrosão sulfeto de ferro, que se encontra associado não somente a bactérias sésseis, como anteriormente descrito, mas também a bactérias planctônicas. O Ru revela a natureza aniônica de elementos de matriz extracelular, característica também exaltada pela detecção de outros cátions divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Traços de Cr foram detectados no glicocálice de algumas bactérias. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na composição elemental das estruturas analisadas antes e após tratamento com GA, bem como no padrão morfológico das células.

Corpos-de-prova que permanecerem em contato com a mesma solução de GA por 7

dias e, posteriormente, em contato com água do mar desaerada e estéril (recém-introduzida no "loop" após drenagem do fluido com a solução biocida) por mais 5 dias, foram avaliados por MET (Figs. 23A-B). Adicionalmente, amostra da água do mar recém-introduzida foi também processada para MET (Figs. 23C-D). As imagens revelaram a presença de bactérias sésseis (Figs. 23A-B) e planctônicas (Figs. 23C-D) íntegras e bem preservadas. As bactérias sésseis possuem glicocálice denso e amorfo e estão imersas em extensa matriz extracelular fortemente contrastada pelo composto catiônico vermelho de rutênio quando vistas por MET (Figs. 23A-B, estrelas) e as bactérias planctônicas apresentam glicocálice predominantemente filamentososo, com estrutura de matriz extracelular que mantém unidas bactérias adjacentes (Figs. 23C-D, estrelas). Conclui-se, com esses dados, que o biofilme bacteriano não só permanece aderido aos corpos-de-prova após extenso tratamento biocida e lavagem do sistema, mas pode liberar células para o fluido (detectadas na água do mar estéril recém-injetada). Essas células em suspensão podem, em princípio, levar à contaminação e formação de biofilme em outras áreas do sistema.

### **2.2.3. Efeito do GA-QAT na desorganização de biofilme pré-formado no "loop" e sobre bactérias planctônicas: avaliação ultra-estrutural**

No segundo teste realizado no "loop", após 11 dias de inóculo das bactérias, o sistema foi inicialmente injetado com QAT por 24 h e, posteriormente, com GA. Corpos-de-prova foram retirados para análises após 1 h (Fig. 24A) e 24 h (Fig. 24B) de tratamento com GA. Em ambos os tempos, apesar da presença de bactérias imersas na matriz extracelular (Figs. 23A-B, estrelas) e aderidas ao metal (Figs. 24A-B, setas), verificou-se uma aparente desorganização do biofilme em relação a amostras-controle de biofilmes pré-formados no "loop" após 4 dias (Figs. 18E-F) e 12 dias (Figs. 19A-B) de inóculo bacteriano. Além disso, após o tratamento, a superfície de aço-carbono do corpo-de-prova apresentava-se bastante danificada.

Semelhante ao que foi executado após o primeiro teste no "loop", um corpo-de-prova foi retirado para análises de MEV após permanecer em contato com a solução de GA-QAT por 7 dias e, posteriormente, em contato com água do mar desaerada e estéril (recém-introduzida no "loop" após drenagem do fluido com a solução biocida) por mais 2 dias. As imagens de MEV indicam grande quantidade de produtos de corrosão (Fig. 24C, setas) depositados sobre a superfície metálica bastante danificada do corpo-de-prova, em proximidade com regiões enriquecidas em matriz extracelular (Fig. 24C, estrelas). Assim como os corpos-de-prova, fragmentos da tubulação de PVC do "loop" também foram

retirados do sistema após o contato de 2 dias com a água do mar estéril e processados para MEV. As micrografias revelaram a persistência do biofilme bacteriano denso sobre a superfície desse material, constituído especialmente por células em forma de bastões (Figs. 24D-F, setas), algumas, inclusive, aparentando processo de esporulação (Fig. 24F, seta). Esses últimos resultados mostram que a própria tubulação do sistema pode ser uma fonte de contaminação de bactérias e apontam para a necessidade de métodos mais eficientes de desinfecção química e limpeza mecânica intercalando ensaios microbiológicos no "loop".

### **Figura 18**

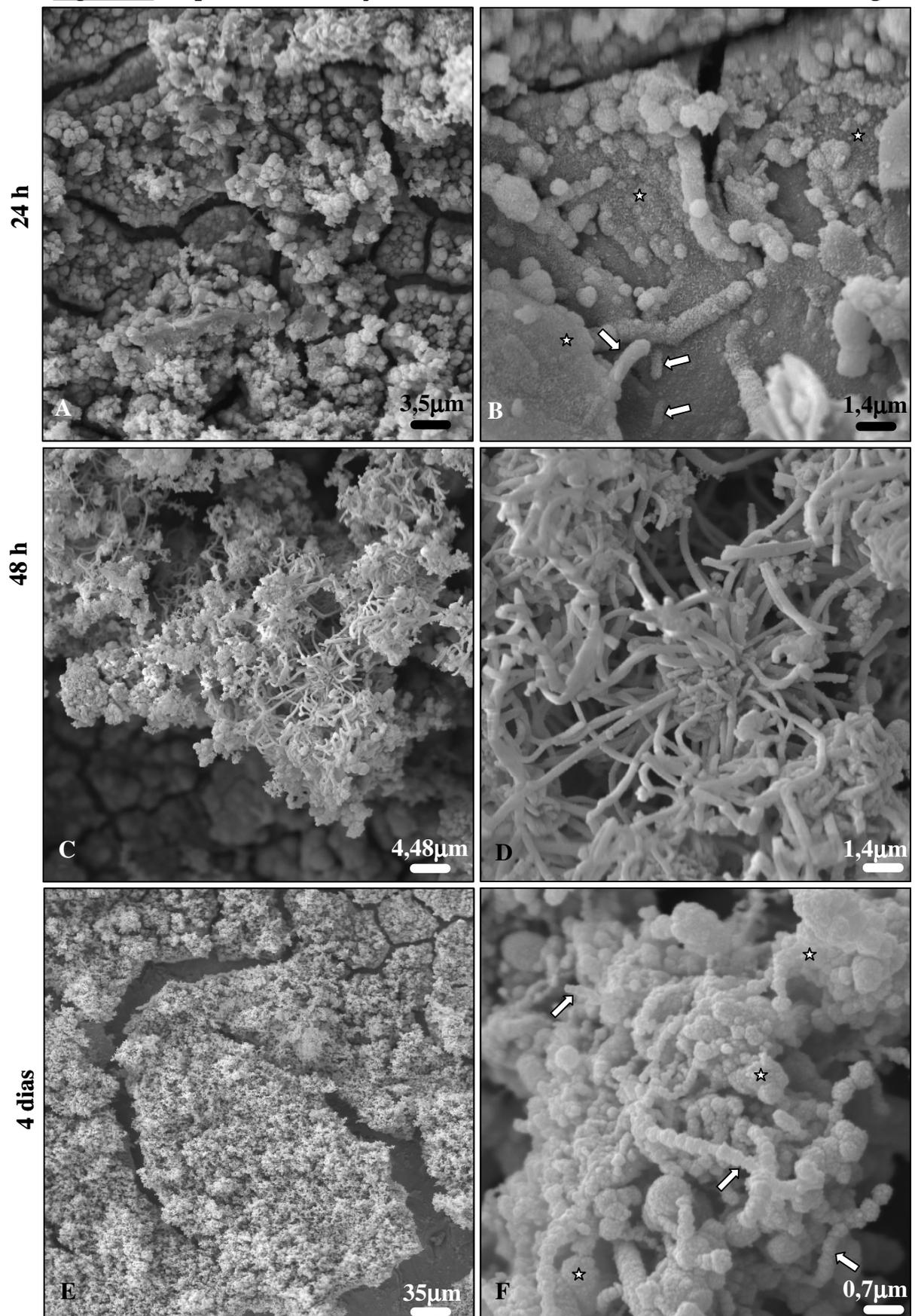
**Aspectos em MEV da cinética de formação do biofilme sobre a superfície dos corpos-de-prova a partir do inóculo de BRS e BANHT planctônicas em sistema dinâmico de fluxo d' água**

**Figuras 18A-B** – imagens em menor (Fig. 18A) e maior aumento (Fig. 18B) do biofilme formado após 24 h de incubação do corpo-de-prova na presença das bactérias inoculadas no sistema.

**Figuras 18C-D** – imagens em menor (Fig. 18C) e maior aumento (Fig. 18D) do biofilme formado após 48 h de incubação do corpo-de-prova na presença das bactérias inoculadas no sistema.

**Figuras 18E-F** – imagens em menor (Fig. 18E) e maior aumento (Fig. 18F) do biofilme formado após 4 dias de incubação do corpo-de-prova na presença das bactérias inoculadas no sistema.

**Figura 18:** Aspectos da formação do biofilme em sistema dinâmico de fluxo d'água



**Figura 19**

**Aspectos em MEV do efeito do GA na desorganização do biofilme pré-formado em sistema dinâmico de fluxo d'água**

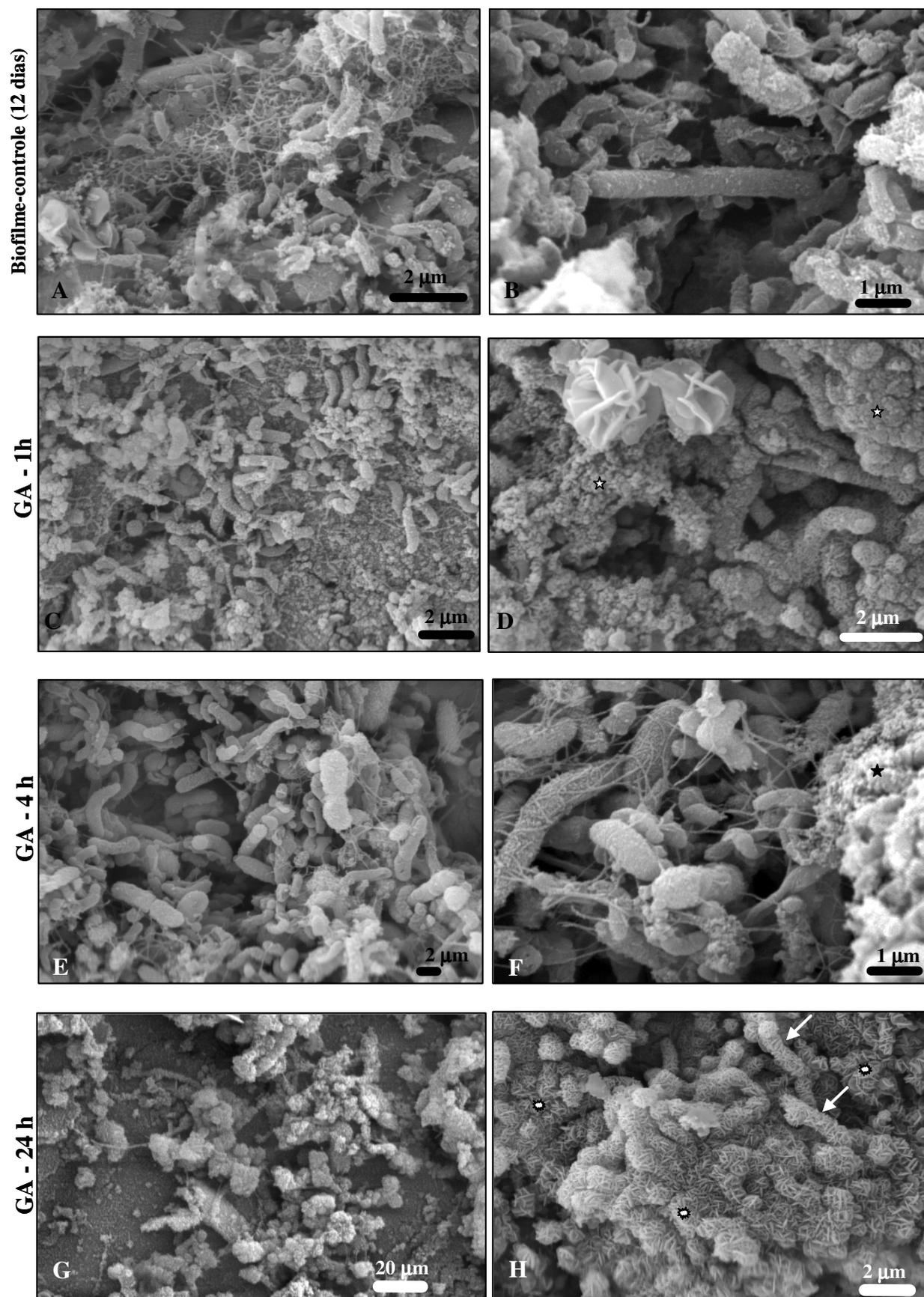
**Figuras 19A-B** – imagens em menor (Fig. 19A) e maior aumento (Fig. 19B) do biofilme formado após 12 dias de incubação do corpo-de-prova na presença das bactérias inoculadas no sistema (biofilme pré-formado de 12 dias, controle).

**Figuras 19C-D** – imagens em menor (Fig. 19C) e maior aumento (Fig. 19D) mostrando o efeito do GA sobre o biofilme pré-formado de 12 dias após tratamento de 1 h.

**Figuras 19E-F** – imagens em menor (Fig. 19E) e maior aumento (Fig. 19F) mostrando o efeito do GA sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 12 dias após tratamento de 4 h.

**Figuras 19G-H** – imagens em menor (Fig. 19G) e maior aumento (Fig. 19H) mostrando o efeito do GA sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 12 dias após tratamento de 24 h.

**Figura 19:** Efeito do GA na desorganização do biofilme em sistema dinâmico de fluxo d'água



**Figura 20**

**Aspectos em MET do efeito do GA na desorganização do biofilme pré-formado em sistema dinâmico de fluxo d'água**

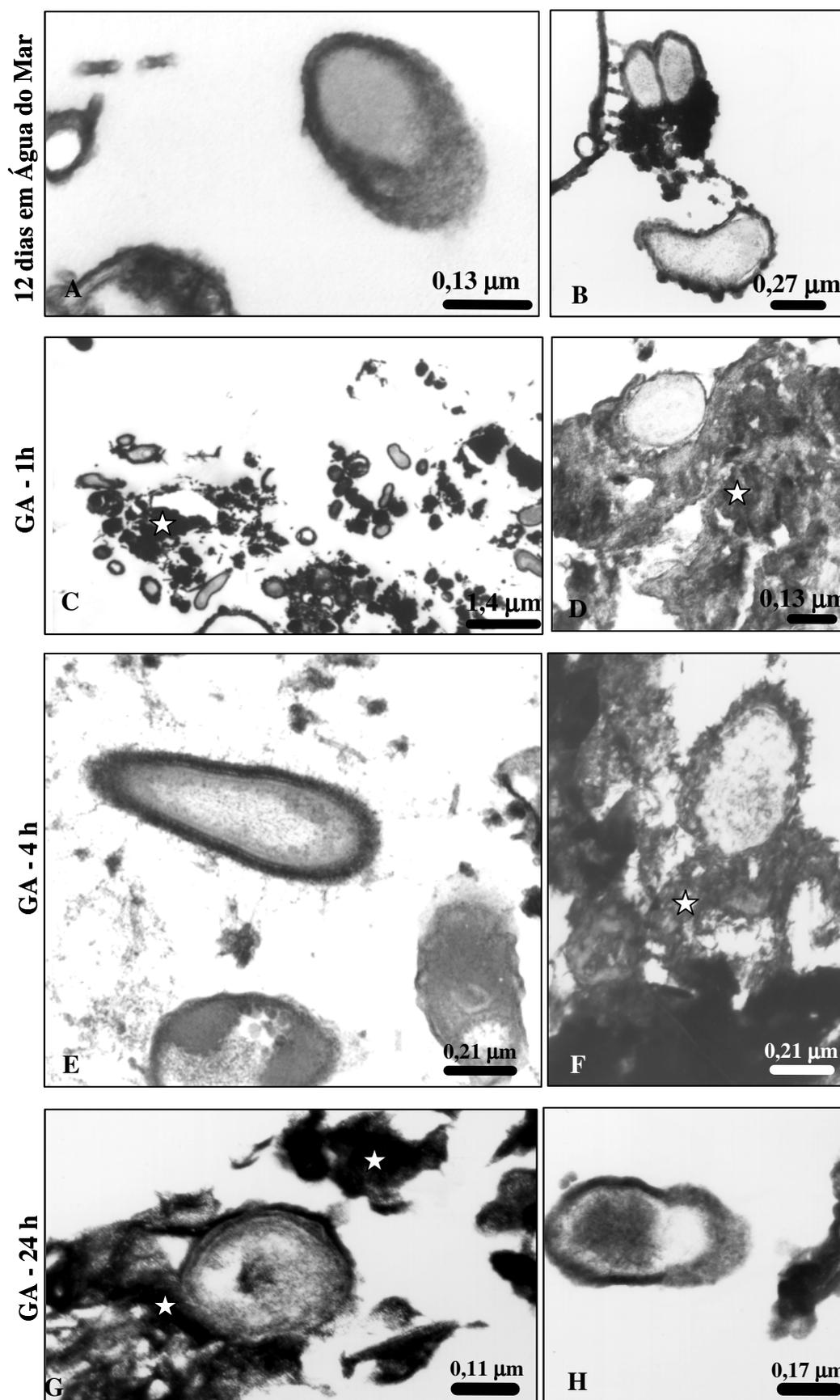
**Figuras 20A-B** – imagens do biofilme formado após 12 dias de incubação do corpo-de-prova na presença das bactérias inoculadas no sistema (biofilme pré-formado de 12 dias, controle).

**Figuras 20C-D** – imagens em menor (Fig. 20C) e maior aumento (Fig. 20D) mostrando o efeito do GA sobre o biofilme pré-formado de 12 dias após tratamento de 1 h.

**Figuras 20E-F** – imagens mostrando o efeito do GA sobre o biofilme pré-formado de 12 dias após tratamento de 4 h.

**Figuras 20G-H** – imagens mostrando o efeito do GA sobre a estrutura do biofilme pré-formado de 12 dias após tratamento de 24 h.

**Figura 20:** Efeito do GA na desorganização do biofilme em sistema dinâmico de fluxo d'água



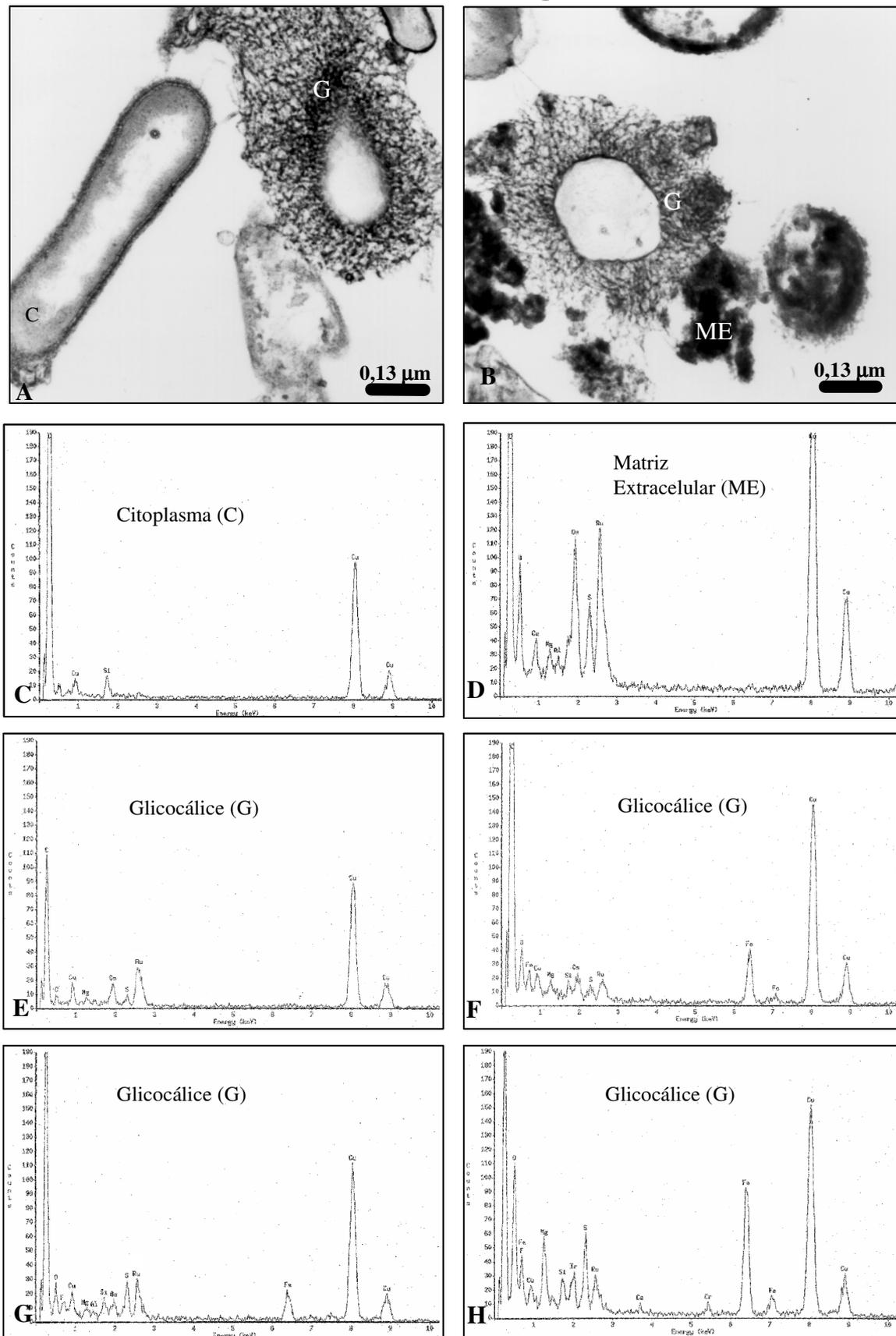
**Figura 21**

**Aspectos em MET e análise elemental de bactérias planctônicas em sistema dinâmico de fluxo d' água**

**Figuras 21A-B** – imagem de bactérias planctônicas retiradas de amostras de fluido do sistema após 12 dias de inóculo.

**Figuras 21C-H** – espectros de energia dispersiva de raios-X realizados sobre o citoplasma (Fig. 21C), matriz extracelular (Fig. 21D) e glicocálice (Figs. 21E-H) de bactérias planctônicas (Figs. 21A-B) após 12 dias de inóculo. Os espectros das colunas da esquerda (Figs. 21C, 21E e 21G) e da direita (Figs. 21D, 21F e 21H) correspondem, respectivamente, às estruturas apontadas pelas respectivas letras nas Figuras 21A e 21B.

**Figura 21: Aspecto em MET e análise elemental de bactérias planctônicas em sistema dinâmico de fluxo d'água**



**Figura 22**

**Aspectos em MET e análise elemental do efeito do GA sobre bactérias planctônicas em sistema dinâmico de fluxo d' água**

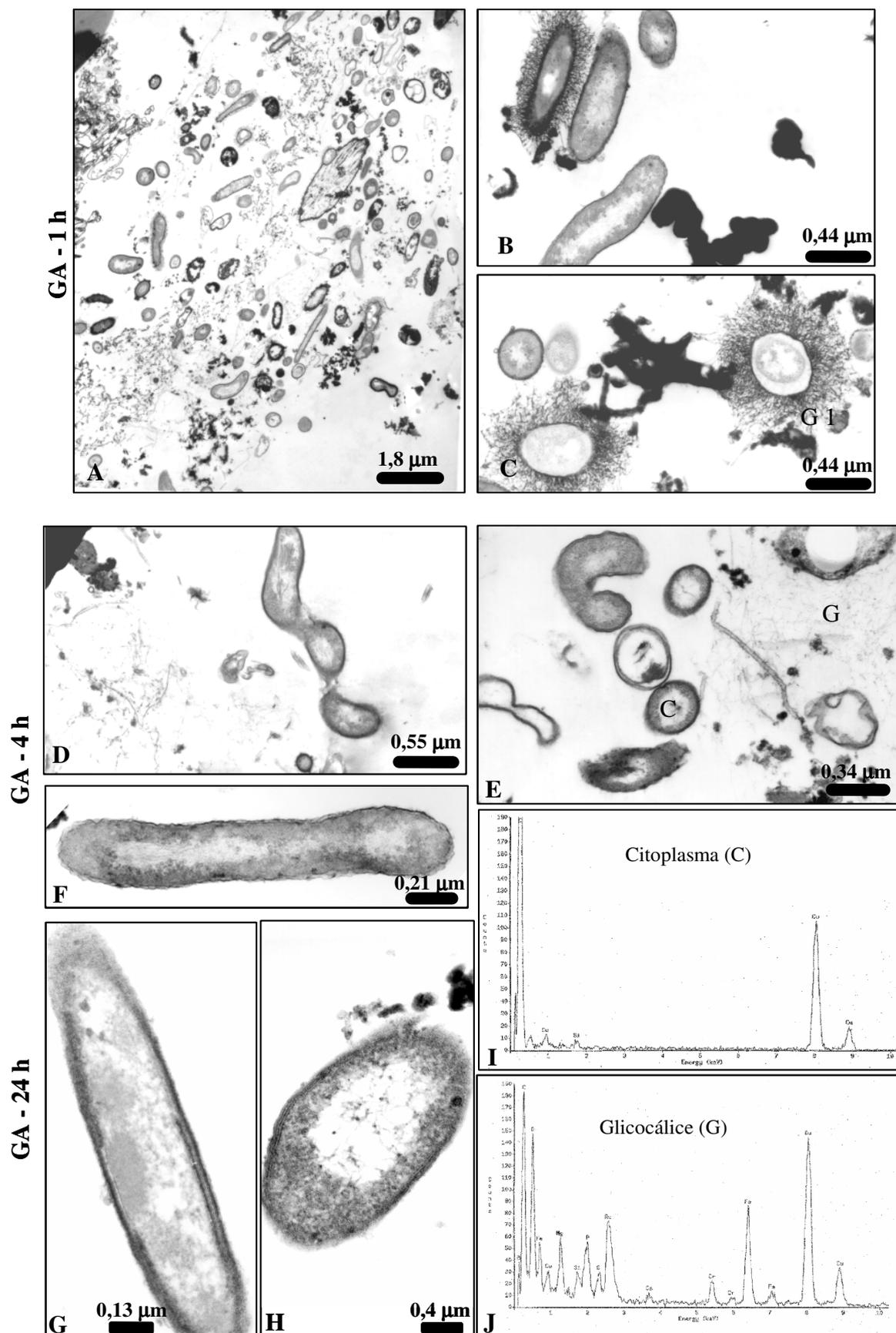
**Figuras 22A-C** – imagens de bactérias planctônicas após 12 dias de inóculo, retiradas de amostras de fluido do sistema após tratamento por 1 h com GA.

**Figuras 22D-F** – imagens de bactérias planctônicas após 12 dias de inóculo, retiradas de amostras de fluido do sistema após tratamento por 4 h com GA.

**Figuras 22G-H** – imagens de bactérias planctônicas após 12 dias de inóculo, retiradas de amostras de fluido do sistema após tratamento por 24 h com GA.

**Figuras 22I-J** – espectros de energia dispersiva de raios-X realizados sobre o citoplasma (Fig. 22I) e glicocálice (Fig. 22J) de bactérias planctônicas (Fig. 22E), após 12 dias de inóculo e posterior tratamento por 4 h com GA.

**Figura 22:** Efeito do GA sobre bactérias planctônicas em sistema dinâmico de fluxo d'água



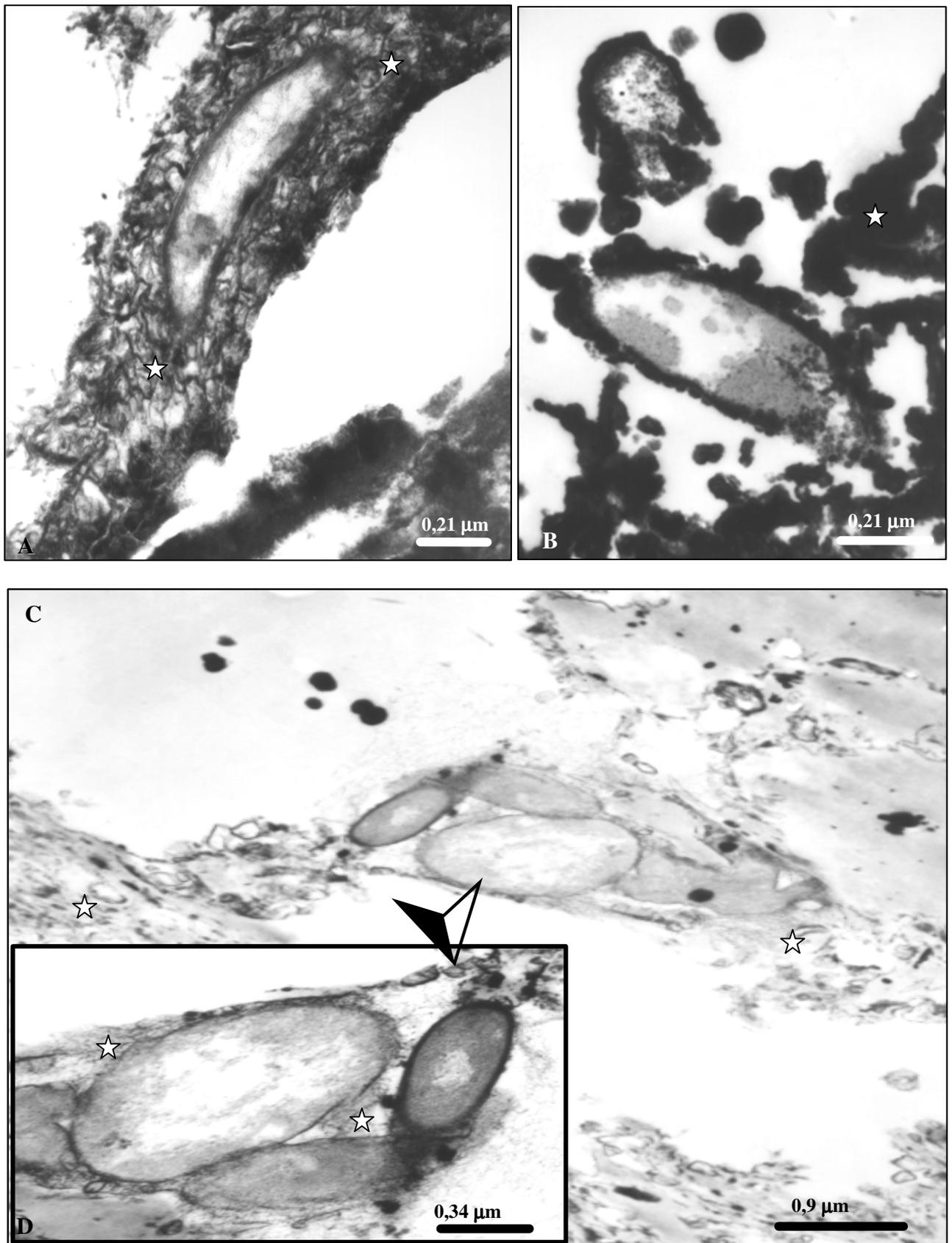
**Figura 23**

**Aspectos em MET de bactérias sésseis e planctônicas após término dos testes com GA e lavagem do sistema dinâmico de fluxo d'água. Após 12 dias de inóculo das bactérias, o GA foi adicionado ao sistema, permanecendo por 7 dias, após o que todo o fluido foi substituído por água do mar desaerada estéril, com um período de hibernação de 5 dias, antes que as amostras fossem retiradas.**

**Figuras 23A-B** – imagens de bactérias sésseis raspadas de corpo-de-prova.

**Figuras 23C-D** – imagens de bactérias planctônicas presentes na água do mar estéril recém-injetada no sistema (após término do teste com GA).

**Figura 23:** Avaliação da presença de bactérias sésseis e planctônicas após o término dos testes com GA e lavagem do sistema dinâmico de fluxo d'água



### **Figura 24**

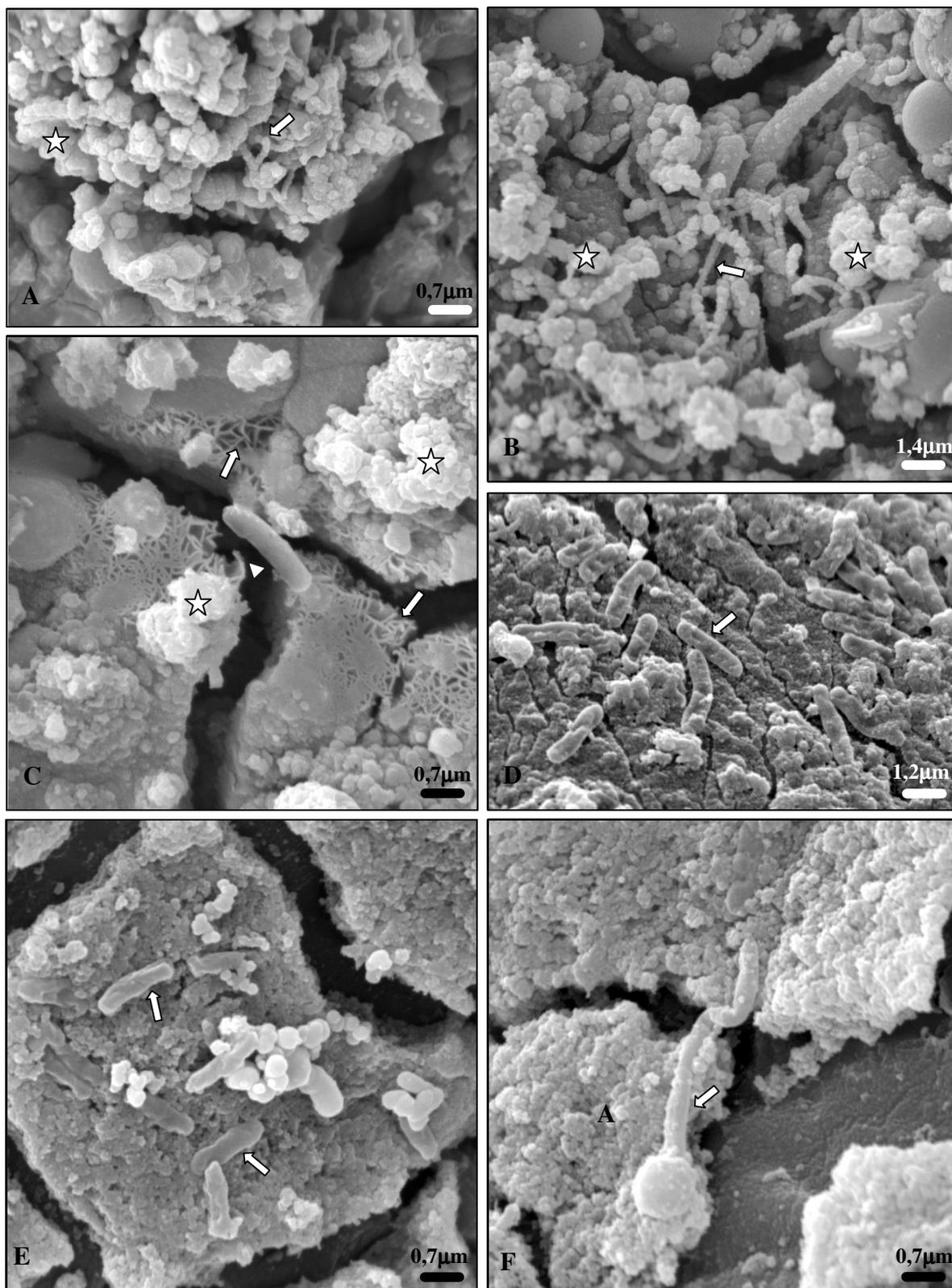
**Aspectos em MEV do efeito do GA-QAT na desorganização do biofilme pré-formado em sistema dinâmico de fluxo d'água e avaliação de corpos-de-prova e da tubulação após o término dos testes e da lavagem do sistema**

**Figuras 24A-B** – imagens mostrando o efeito do GA-QAT sobre o biofilme formado após 11 dias de inóculo das bactérias, tratado por 24 h com QAT e depois com GA, por 1 h (Fig. 24A) e por 24 h (Fig. 24B).

**Figura 24C** – imagem da superfície do biofilme formado sobre corpo-de-prova após 11 dias de inóculo das bactérias no sistema, seguido por 7 dias de contato com GA-QAT e mais 2 dias na presença de água do mar estéril (após drenagem de todo o fluido contendo a solução biocida).

**Figuras 24D-F** – imagens da superfície da tubulação de PVC do sistema dinâmico após 11 dias de inóculo das bactérias no sistema, seguido por 7 dias de contato com GA-QAT e mais 2 dias na presença de água do mar estéril (após drenagem de todo o fluido contendo a solução biocida).

**Figura 24:** Efeito de GA-QAT na desorganização do biofilme em sistema dinâmico de fluxo d'água e avaliação de corpos-de-prova e da tubulação após o término dos testes e lavagem do sistema



### **3. Efeito do DTPA no tratamento do oleoduto PCH II / PCH I**

O tratamento do oleoduto PCH II / PCH I foi realizado com o intuito de testar a eficiência do produto selecionado a partir dos ensaios realizados em sistema estático (ver Resultados - Item 1). Além da intervenção para o controle microbiano no oleoduto em questão, objetivou-se, com esse trabalho, testar um procedimento que possa ser aplicado para o controle de BRS e incrustações de sulfato de bário em outros oleodutos da área norte da Bacia de Campos.

A solução de DTPA foi escolhida, pois além de ter apresentado uma eficiência bactericida comparada com a solução de GA-QAT, verificada pelos ensaios em sistema estático (ver Resultados - Tabela 4), possui também alta eficiência antiincrustante e característica corrosiva moderada, quando diluído em água aerada (dados não mostrados). Acrescentou-se o carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a essa solução, pois essa composição já havia sido testada anteriormente pelo CENPES, apresentando maior capacidade em complexar íons bário (dados não mostrados).

#### **3.1. Avaliação microbiológica**

Os resultados da caracterização microbiológica da água produzida (BRS planctônicas) e dos resíduos (BRS sésseis) obtidos do oleoduto, antes e após o tratamento com o produto à base de DTPA, estão apresentados na Tabela 12. Antes do tratamento com a solução biocida amostras-controle de água produzida e de resíduo mostraram alta contaminação por BRS, evidenciada pela técnica do NMP e pela detecção da atividade de BRS. Nota-se que há uma redução da concentração e da atividade de bactérias planctônicas (de  $2,5 \times 10^6$  para  $2,5 \times 10^2$  NMP / ml ; de 3 dias para 4 dias) e da concentração de bactérias sésseis (de  $6,1 \times 10^7$  para  $2,9 \times 10^6$  NMP / ml) antes do tratamento químico, apenas como resultado da limpeza mecânica sucessiva por "pigs" no interior da tubulação. Nas amostras retiradas da solução de tratamento (após 10 h de contato com o produto) não ocorreu o crescimento de BRS, favorecendo a hipótese da eficiência biocida do produto empregado. Entretanto, na amostra de resíduo coletada após o tratamento químico, observou-se, pela técnica do NMP, uma concentração mais elevada de BRS ( $8,5 \times 10^7$  NMP / ml) do que aquela encontrada em resíduo ( $2,9 \times 10^6$  NMP / ml) retirado do mesmo ponto de coleta antes da aplicação do produto. Esse fato, provavelmente, aconteceu devido ao atraso na coleta do resíduo (somente 7 h após o tratamento), que permitiu o seu contato com o fluido de produção de PCH II, recontaminando o sistema.

**Tabela 12**  
**Caracterização microbiológica de amostras de água e resíduo antes e após tratamento realizado no oleoduto PCH II / PCH I**

Pontos de coleta	Amostra	Data de coleta	Horário	Concentração de m-BRS (NMP / ml ou NMP / g)	Deteção da atividade de m-BRS
Receptor de "pig" PCH II / PCH I	Água Produzida	26/03/99	16:00 h	$2,5 \times 10^6$	+ (3 dias)
Após a passagem do primeiro "pig"	Resíduo	26/03/99	16:00 h	$6,1 \times 10^7$	+ (3 dias)
Receptor de "pig" PCH II / PCH I	Água Produzida	27/03/99	13:00 h	$2,5 \times 10^2$	+ (4 dias)
Após a passagem do segundo "pig"	Resíduo	27/03/99	13:00 h	$2,9 \times 10^6$	-
Ponto de coleta de amostras líquidas, próximo ao receptor de "pig" PCH II / PCH I	Solução de Tratamento	27/03/99	23:20 h	N.D.	-
Receptor de "pig" PCH II / PCH I	Resíduo após tratamento	28/03/99	07:00 h	$8,5 \times 10^7$	-

**Tabela 12:** Avaliação da eficiência biocida de DTPA no tratamento do oleoduto PCH II / PCH I. Os resultados foram obtidos pelas técnicas microbiológicas do NMP e de detecção da atividade de BRS (comprovada pelo enegrecimento do meio Postgate E modificado).

*m-BRS: bactérias redutoras de sulfato mesófilas;*

*NMP / ml ou NMP / g: número mais provável de bactérias por mililitro ou grama de amostra.*

### 3.2. Aspecto *in situ* do biofilme e sua desorganização após tratamento com DTPA: avaliação ultra-estrutural e microanálise de raios-X

Analisamos por MEV (Figs. 25A-D) e por MET (Figs. 26A-E), os resíduos obtidos por raspagem da tubulação PCH II / PCH I, antes e após o tratamento com a solução de DTPA. As imagens obtidas antes do tratamento mostraram a presença de bactérias íntegras, em forma de bastões e vibriões, fazendo parte da biomassa rica em matriz extracelular (Fig. 25A, estrelas e Figs. 26A-C), constituindo um biofilme maduro aderido à tubulação. Após o tratamento com o DTPA, as análises microscópicas de MEV (Figs. 25B-D) e MET (Figs. 26D-E) revelaram que as bactérias que constituíam o biofilme foram bastante afetadas pelo produto. As superfícies dessas bactérias apresentaram um aspecto rugoso e suas formas e volumes pareceram alterados em resposta ao contato com o DTPA (Figs 25B-C, setas). O padrão morfológico de alteração do biofilme avaliado por MEV assemelha-se àquele observado em laboratório nas amostras tratadas com DTPA, tais como biofilme disforme e plástico, com células aparentemente se "derretendo" e fundindo umas às outras e à matriz extracelular (Figs. 25D, asteriscos). Esse efeito foi mais bem visualizado nas imagens de MET (Figs. 26D-E) onde, na quase totalidade das amostras, grandes extensões do biofilme eram formados por fragmentos de superfície de bactérias, estruturas "fantasmas" (Figs. 26D-E, pontas de setas), células com conteúdo citoplasmático bastante esvaziado (Fig. 26E, setas finas) e eventuais células íntegras (Fig. 26E, setas grossas) imersas em matriz extracelular residual (Figs. 26D-E, estrelas).

Algumas imagens de MET de biofilmes encontrados em resíduos do oleoduto antes (Fig. 27A) e após (Fig. 27B) tratamento com DTPA foram estudadas pela técnica de microanálise de raios-X (Figs. 27C-J). A análise elemental de regiões do corte ultrafino onde só havia a resina epon, usada para o emblocamento da amostra durante processamento para MET, foi feita como controle (Figs. 27C-D). Nesse caso, o único elemento que se destaca é o Cu, presente na grade de suporte dos cortes. Os elementos O, Si, S, Mn, Ca, Ru e Fe, foram encontrados distribuídos nas diferentes estruturas analisadas, entre elas, glicocálice, citoplasma e matriz extracelular. Destas análises, ressalta-se a presença de Ru no interior do citoplasma de bactéria sésil (Fig. 27G, seta), além da sua identificação rotineira no glicocálice bacteriano e na matriz extracelular (Fig. 27J, seta). Particularmente, do ponto de vista ultra-estrutural, o citoplasma da bactéria que apresenta Ru na análise elemental (Fig. 27A) está enriquecido em material interno denso e amorfo, semelhante àquele encontrado constituindo a matriz extracelular. Os resultados da microanálise de raios-X conjugados às imagens de MET são evidências de um processo, no qual moléculas constituintes de matriz

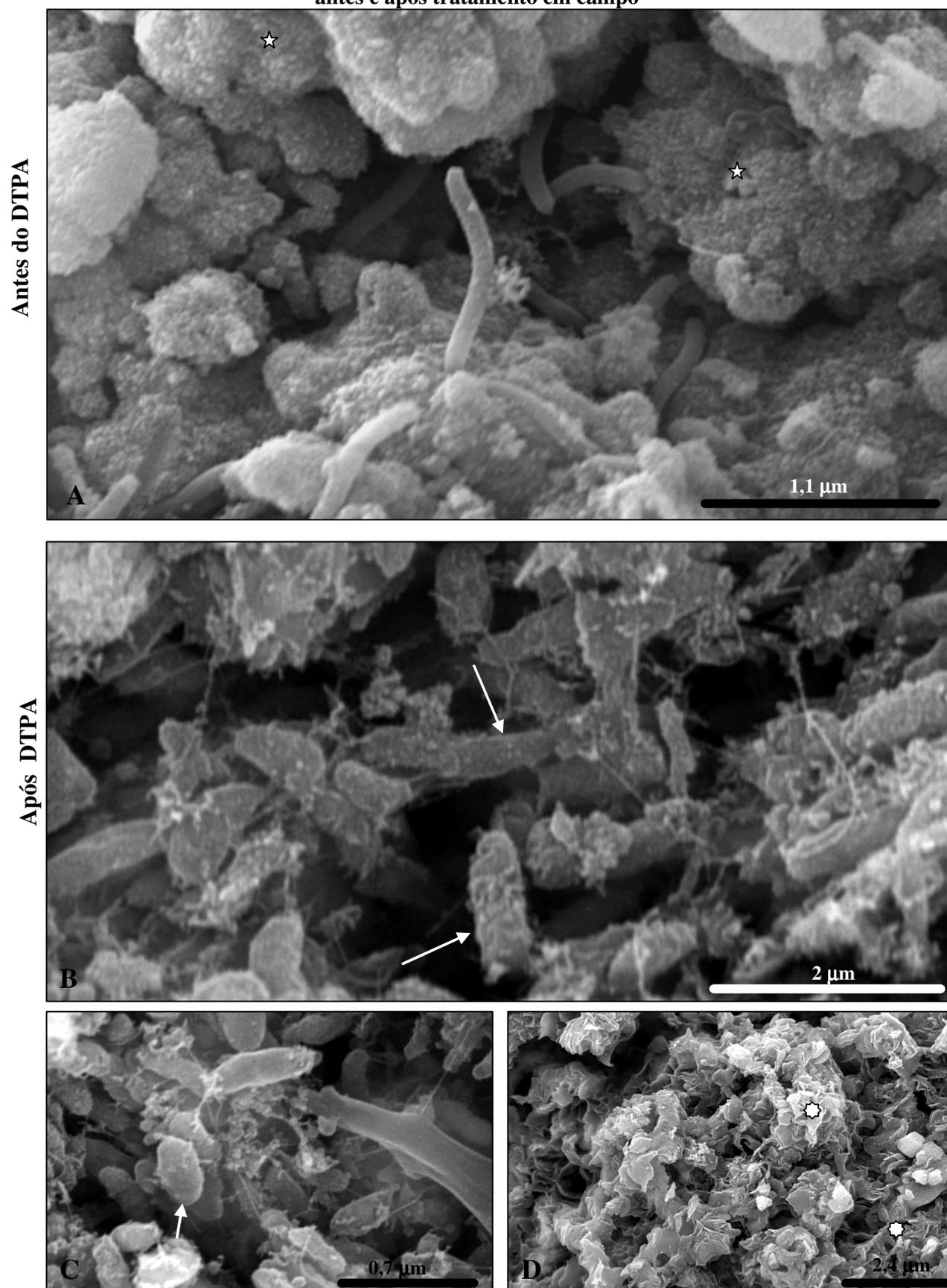
**Figura 25**

**Aspectos em MEV do efeito do DTPA na desorganização de biofilmes presentes em resíduos obtidos do oleoduto PCH II / PCH I, antes e após tratamento em campo.**

**Figura 25A** – imagem do aspecto do biofilme aderido à tubulação do oleoduto antes do tratamento com DTPA.

**Figuras 24B-D** – imagens do aspecto do biofilme aderido à tubulação do oleoduto após tratamento por 10 h com DTPA.

**Figura 25:** Efeito do DTPA sobre biofilmes bacterianos amostrados em resíduos de oleoduto antes e após tratamento em campo



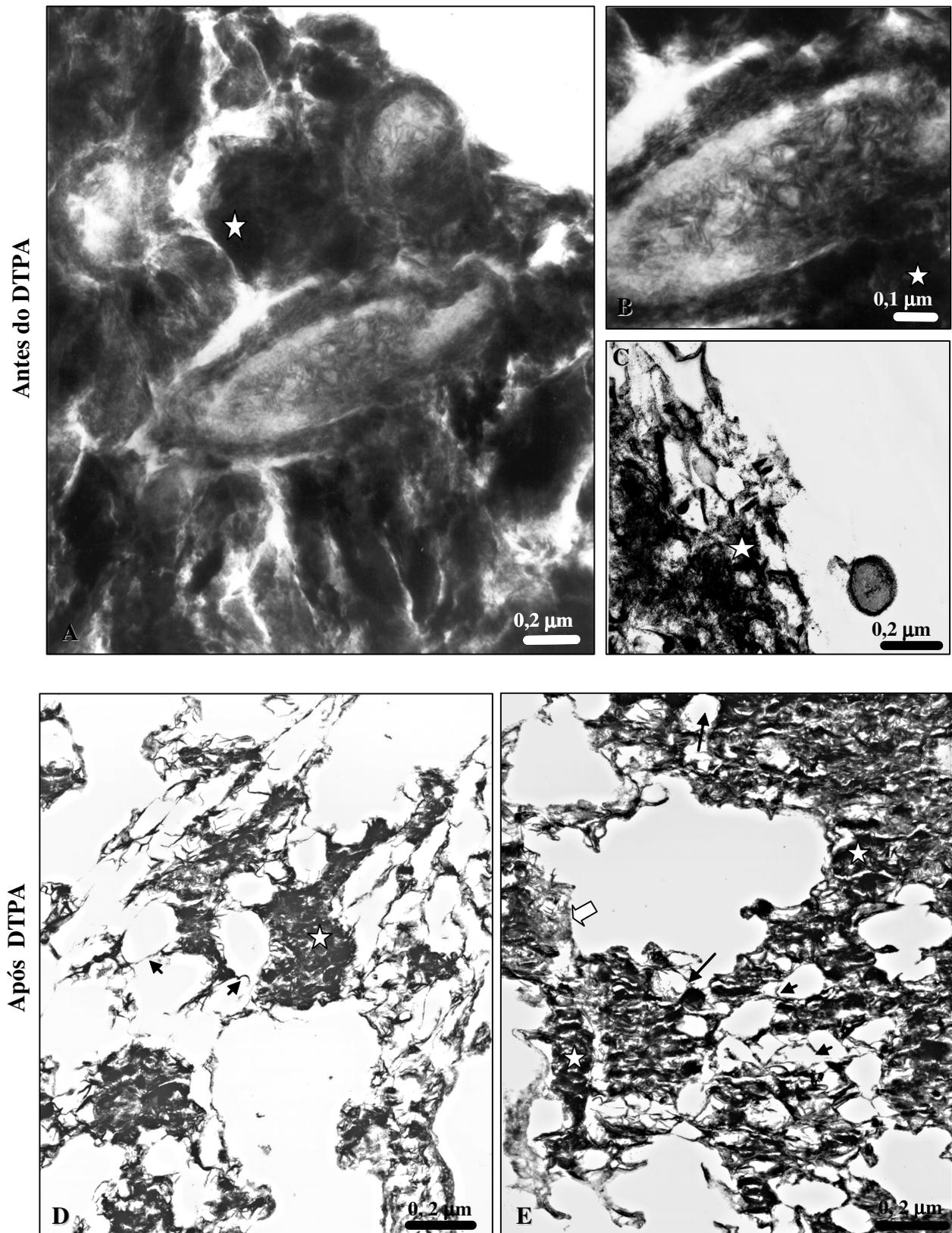
**Figura 26**

**Aspectos em MET do efeito do DTPA na desorganização de biofilmes presentes em resíduos obtidos do oleoduto PCH II / PCH I, antes e após tratamento em campo.**

**Figuras 26A-C** – imagens do aspecto do biofilme aderido à tubulação do oleoduto antes do tratamento com DTPA.

**Figuras 26D-E** – imagens do aspecto do biofilme aderido à tubulação do oleoduto após tratamento por 10 h com DTPA.

**Figura 26:** Efeito do DTPA sobre biofilmes bacterianos amostrados em resíduos de oleodutos antes e após tratamento



**Figura 27**

**Aspectos em MET e análise elemental do efeito do DTPA na desorganização de biofilmes presentes em resíduos obtidos do oleoduto PCH II / PCH I, antes e após tratamento em campo.**

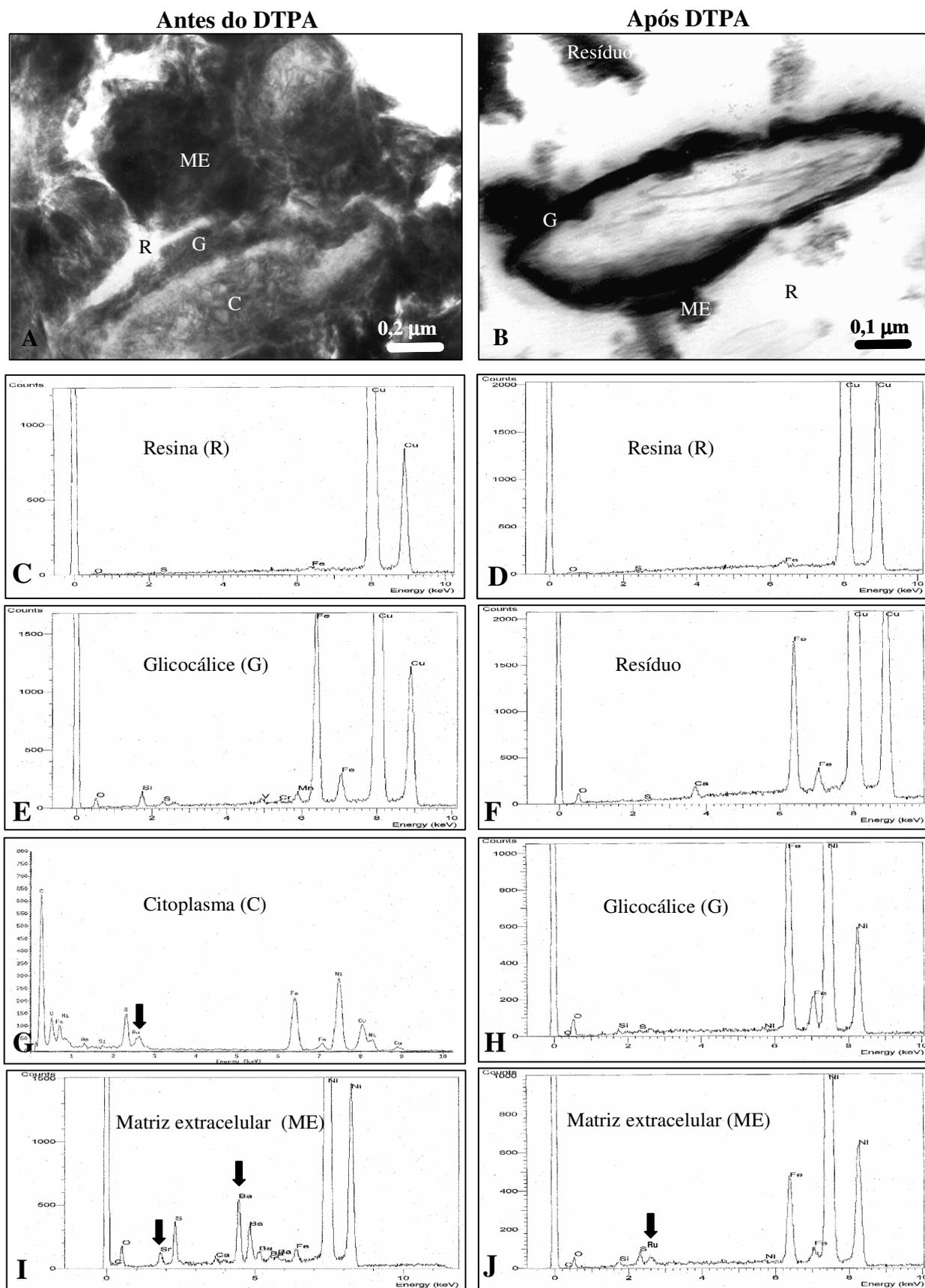
**Figura 27A** – imagem de bactérias sésseis aderidas à tubulação do oleoduto antes do tratamento com DTPA.

**Figura 27B** – imagem de bactéria séssil aderida à tubulação do oleoduto após tratamento por 10 h com DTPA.

**Figuras 27C, E, G e I** – espectros de energia dispersiva de raios-X realizados sobre a resina (Fig. 27C), glicocálice (Fig. 27E), citoplasma (Fig. 27G) e matriz extracelular (Fig. 27I) de bactérias sésseis (Fig. 27A, estruturas apontadas pelas respectivas letras), antes do tratamento com DTPA.

**Figuras 27D, F, H e J** – espectros de energia dispersiva de raios-X realizados sobre a resina (Fig. 27D), resíduo (Fig. 27F), glicocálice (Fig. 27H) e matriz extracelular (Fig. 27J) de bactéria séssil (Fig. 27B, estruturas apontadas pelas respectivas letras), após tratamento por 10 h com DTPA.

**Figura 27:** Efeito do DTPA sobre biofilmes bacterianos amostrados em resíduos de oleodutos antes e após tratamento



extracelular são sintetizadas no citoplasma das bactérias e, posteriormente, liberadas para o meio extracelular. Destaca-se, também, das análises elementais, a presença de Ba e Sr na matriz extracelular (Fig. 27I) antes do tratamento com DTPA, ausente nas análises feitas após tratamento com essa base ativa (Fig. 27J). O Ba em associação com S forma sulfato de bário, cujo composto pode ser consumido pelo metabolismo de BRS. Para tratamento do oleoduto, DTPA foi dosado juntamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , cuja combinação apresenta um maior poder em complexar íons Ba e Sr. É interessante correlacionar o fato de que esses dois íons não foram mais identificados na matriz extracelular após o tratamento com DTPA, que se mostrou eficiente tanto no controle microbiano quanto na desorganização estrutural e química do biofilme bacteriano.

#### **4. Potencial da microscopia confocal para estudo de biofilmes e sua interação com o substrato metálico**

O microscópio óptico confocal de varredura a laser foi utilizado para análises de corpos-de-prova incubados por 72 h com o inóculo de BRS e BANHT em sistema dinâmico de fluxo d'água "loop" (Figs. 28A-D e 29A-B). Para análise ao microscópio confocal, as bactérias foram marcadas pelo composto fluorescente laranja de acridina, que tem afinidade por RNA. O biofilme foi visualizado como uma estrutura que se espalha de forma heterogênea sobre a superfície do metal (Figs. 28A-B). As células estão identificadas nas micrografias pela cor amarela, aderidas ao metal, identificado pela cor azul. Duas regiões do biofilme foram analisadas após cortes ópticos no eixo Z, que permitiram uma visão lateral e de profundidade das mesmas (Figs. 28C-D). Observa-se, nas imagens obtidas, que algumas áreas ocupadas pelas bactérias excluem o metal (Figs. 28C-D, setas), sendo compatível com o processo de corrosão localizada (formação de "pits"), abaixo da região de concentração de bactérias no biofilme. Os pontos de perda de massa do metal ou pontos de corrosão chegam a apresentar profundidade de 15,2  $\mu\text{m}$ .

Uma visão tridimensional do biofilme formado após 72 h de incubação do corpo-de-prova com inóculo de m-BRS (Fig. 29A) foi obtida pelo somatório de cortes ópticos seqüenciais de 1  $\mu\text{m}$  de profundidade (Fig. 29B). Essa análise permitiu estimar em aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a espessura do biofilme aderido sobre a superfície do metal (Fig. 29B). Além disso, a análise individual dos quadros correspondentes a cada corte óptico em diferentes alturas do biofilme revela a densidade diferenciada de células. A observação de menor densidade de colonização bacteriana na superfície do metal, que aumenta e depois diminui gradativamente em direção à superfície, é compatível com o modelo proposto, no qual o biofilme apresenta uma estrutura funcional em forma de "cogumelo".

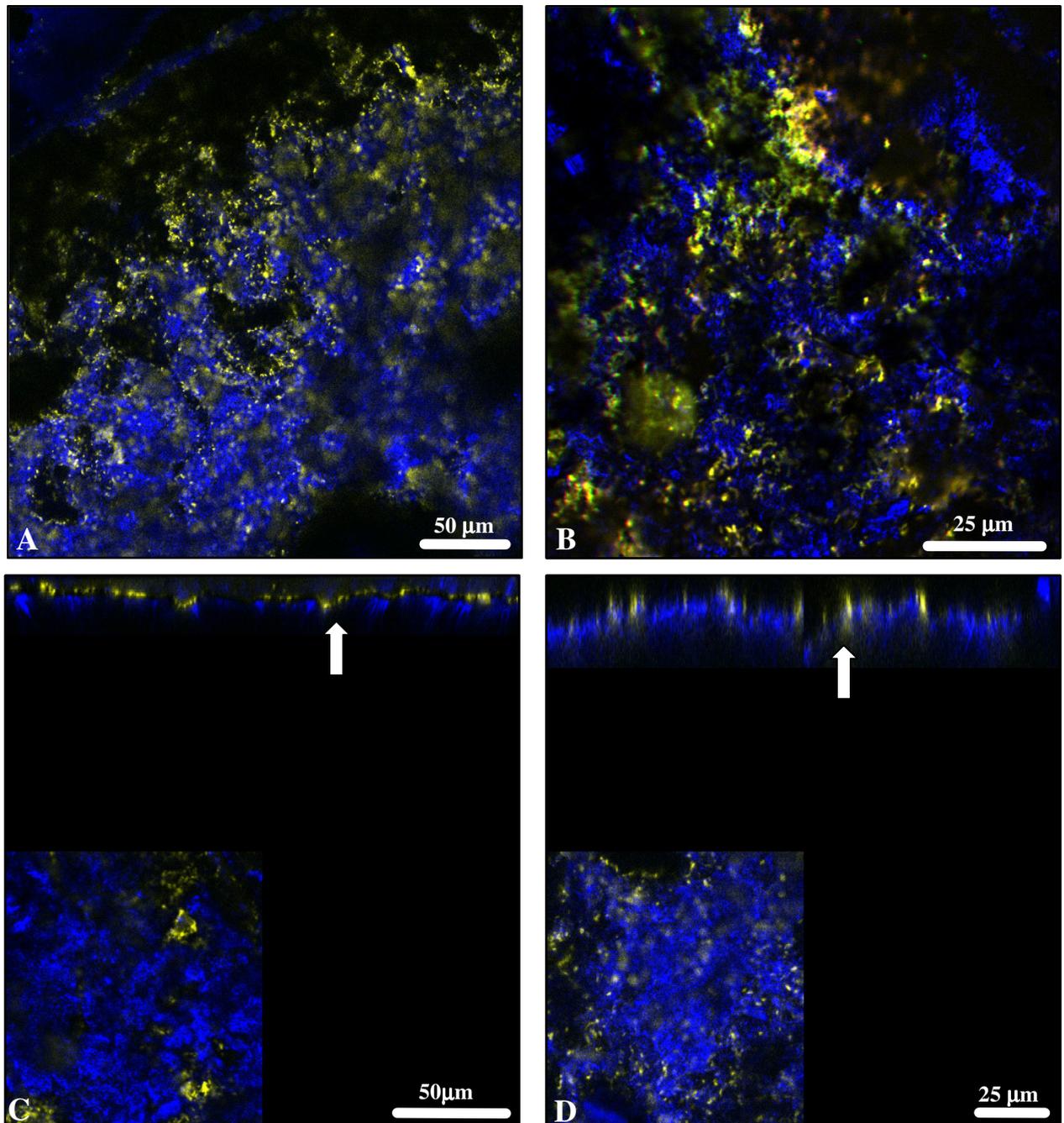
**Figura 28**

**Aspectos do biofilme pré-formado de 72 h em sistema dinâmico de fluxo d' água analisados por microscopia confocal**

**Figuras 28A-B** – micrografias ópticas confocais em menor (Fig. 28A) e maior (Fig. 18B) aumentos revelam biofilme aderido ao metal (azul). Bactérias marcadas com a sonda fluorescente laranja de acridina são mostradas em amarelo.

**Figuras 28C-D** – cortes ópticos no eixo Z (parte superior da micrografia) da imagem mostrada no campo inferior esquerdo em menor (Fig. 28C) e maior (Fig.28D) aumentos revelam que algumas áreas ocupadas pelas bactérias excluem o metal (setas). Nestes pontos, observa-se somente a marcação amarela das bactérias, mas não a cor azul referente ao metal, ou seja, a linha de altura do metal é descontinuada nestas regiões de ocupação por bactérias. Esta imagem é compatível com a corrosão localizada do metal, abaixo do biofilme microbiano.

**Figura 28:** Aspectos do biofilme e da superfície metálica analisados por microscópio confocal



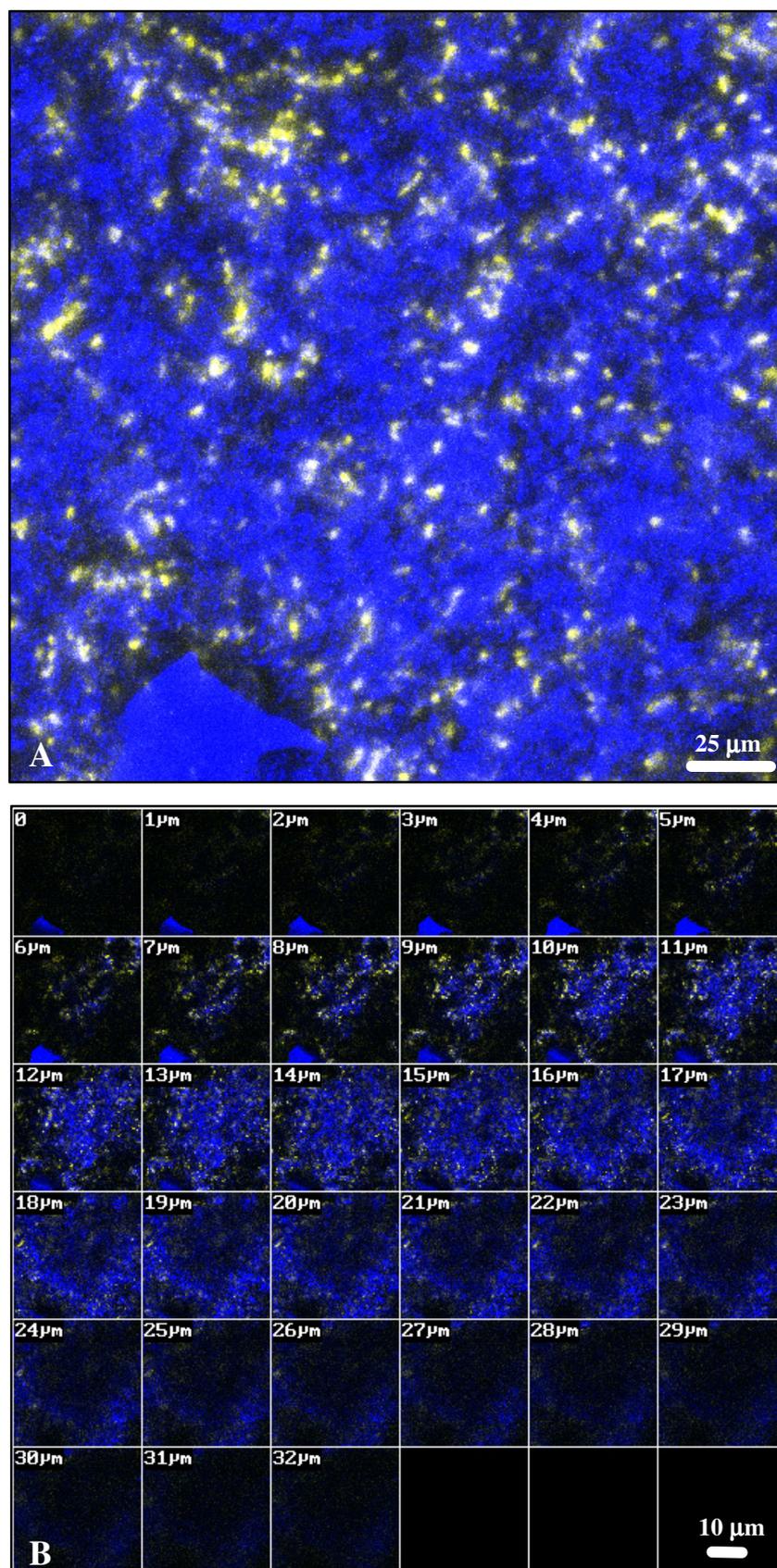
**Figura 29**

**Análise por microscopia confocal da espessura do biofilme pré-formado de 72 h em sistema dinâmico de fluxo d' água**

**Figura 29A** - somatório de imagens do biofilme sobre o corpo-de-prova metálico, feitas a partir de cortes ópticos seqüenciais (1  $\mu\text{m}$ ).

**Figura 29B** – galeria de fotos feitas a partir de cortes ópticos seqüenciais (1  $\mu\text{m}$ ) revela que o biofilme apresenta uma espessura de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ .

**Figura 29:** Análise da espessura do biofilme bacteriano por microscópio confocal



**DISCUSSÃO**

O estudo do efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas é de suma importância dentro de uma estratégia mundial da indústria petrolífera em reduzir ao máximo os elevados custos com danos a equipamentos e perdas na produção. A utilização de produtos químicos visando controlar as bactérias envolvidas nesse processo (principalmente BRS) tem gerado uma crescente preocupação no que diz respeito à eficiência desses compostos e à toxicidade ao ambiente marinho e ao operador técnico (Scholten e cols., 2000). A habilidade de avaliar, prever e controlar a corrosão influenciada por microrganismos é um fator relevante que requer não somente estudos laboratoriais, como também investigações de campo.

O presente trabalho se propôs a reavaliar a eficiência de soluções biocidas já amplamente utilizadas na indústria do petróleo e testar novos compostos e metodologias capazes de controlar processos de biocorrosão e que satisfizessem ao máximo as exigências ambientais contemporâneas. Seu principal objetivo foi estudar o efeito de diferentes soluções químicas no controle do crescimento de BRS sésseis e planctônicas e na desorganização de biofilmes bacterianos. Objetivou, também, padronizar a técnica de microscopia confocal de varredura a laser para o estudo de biofilmes aderidos à superfície metálica de corpos-de-prova. Foram realizados estudos em laboratório, sob condições estáticas e dinâmicas de fluxo d'água, com amostras de bactérias oriundas de oleodutos ou de tubulações do sistema de injeção de água do mar da Bacia de Campos-RJ. Adicionalmente, foram analisadas amostras de água produzida e de resíduos coletados de oleoduto da plataforma PCH II / PCH I da PETROBRAS na Bacia de Campos, antes e após tratamento químico objetivando o controle bacteriano e a remoção de incrustações do sistema.

Apesar de bastante difundida em outros países, as técnicas de microscopia eletrônica, descritas em nosso trabalho, até então não tinham sido utilizadas no Brasil como uma ferramenta para avaliação da eficiência biocida sobre biofilmes bacterianos envolvidos na biocorrosão de tubulações de plataformas de petróleo. Trabalhos anteriores de nosso grupo já haviam usado essa metodologia para caracterização ultra-estrutural de populações bacterianas planctônicas e sésseis, amostradas diretamente em sistemas de injeção de água do mar de plataformas marítimas da PETROBRAS e cultivadas em laboratório pelo uso de meios seletivos para BRS (Coutinho, 1991; Araújo-Jorge e cols., 1992; Coutinho e cols., 1993, 1994a, 1994b). Além disso, é a primeira vez que a técnica de microscopia confocal de varredura a laser, que representa um grande avanço tecnológico na instrumentação microscópica, está sendo aplicada no Brasil para o estudo da biocorrosão, revelando seu potencial para o estudo de biofilmes bacterianos.

Os ensaios laboratoriais em sistemas estáticos de fluxo d'água normalmente são

realizados com o objetivo de selecionar bases ativas, entre uma ampla variedade de produtos químicos, eficazes em controlar os microrganismos de um sistema industrial. Além de serem mais econômicos, os testes estáticos permitem que um número maior de testes possa ser conduzido de forma conveniente, levando à maior precisão dos resultados. Depois de comprovada a eficiência biocida em sistema estático, recomenda-se que os compostos escolhidos passem por testes mais criteriosos de avaliação, que simulem de uma forma mais fidedigna as condições encontradas nos sistemas industriais em que serão empregados (Fu e cols., 1996; Ludensky, 1999). Para isso, foi desenvolvido no CENPES um sistema dinâmico de fluxo d'água, "loop", com possibilidades de monitoramento de variáveis como pH, temperatura, velocidade de fluxo do fluido, taxas de corrosão, taxas de oxigênio, potencial redox, entre outras análises. O "loop" simula as condições operacionais e técnicas do sistema de injeção de água do mar para recuperação secundária de petróleo. Ele foi testado pela primeira vez, no presente trabalho, e dois ensaios independentes foram realizados para avaliar o crescimento de bactérias sésseis e planctônicas nas condições do sistema. GA foi testado isoladamente ou coadjuvado com QAT na desorganização dos biofilmes bacterianos formados no "loop". Os resultados desses ensaios foram analisados não somente do ponto de vista da eficiência biocida, mas também sob a óptica da avaliação do "loop" enquanto instrumento metodológico aplicável ao estudo de fenômenos associados à biocorrosão na indústria do petróleo.

Nossos ensaios em sistema estático serviram para selecionar o biocida mais eficiente para o tratamento de oleoduto da área norte da Bacia de Campos, que estava apresentando problemas de corrosão e de incrustações de sulfato de bário (Magalhães e cols., 1995). As condições estáticas de fluxo d'água foram adotadas para simular as condições de estagnação (hibernação do produto) que seriam encontradas em campo. Dentre as soluções químicas testadas em laboratório, DTPA e GA-QAT foram as que obtiveram os melhores resultados nos testes microbiológicos de avaliação de eficiência biocida das bases ativas. As duas soluções foram capazes de impedir o crescimento bacteriano sobre os corpos-de-prova, sendo que o DTPA foi mais eficiente. As amostras tratadas com esses dois compostos foram também analisadas por microscopia eletrônica (MEV e MET). Através dessa técnica, verificamos que a solução de DTPA teve maior capacidade de alterar a ultra-estrutura das células bacterianas e do biofilme aderido ao metal do que a solução de GA-QAT. As micrografias de MEV e MET revelaram que o biofilme tratado com GA-QAT permaneceu praticamente inalterado em relação à sua estrutura, enquanto que o biofilme tratado com DTPA foi drasticamente desorganizado, com células bacterianas rompidas e com depósitos, aparentemente, dissolvidos. Até a presente data, não existem dados na literatura que atribuam

o efeito biocida ao DTPA e os nossos resultados são inéditos quanto à obtenção do controle bacteriano pelo uso desse produto. Já em relação ao GA, diversos estudos confirmam que esse produto, quando utilizado isoladamente ou conjugado a diferentes tipos de sais quaternários de amônio (QAT), encontra-se entre os compostos de maior eficiência bactericida utilizados na indústria do petróleo (Bessems e Clemmit, 1983; Hudgins, 1992; Morris e cols., 1995; Battersby e cols., 1985; Grab e Theis, 1992; Morris e Pope, 1994; Videla e cols., 1996).

Além da biocorrosão, incrustações, principalmente de sulfato de bário (barita), representam um outro problema de grandes proporções econômicas para a indústria do petróleo (Wang e cols., 1999; Dunn e cols., 1999). Essas incrustações são de difícil remoção, devido à baixa solubilidade em água, e podem representar sítios de atração bacteriana, principalmente para BRS, por constituir fonte de sulfato, no caso da barita. Além disso, seu poder de associação com elementos como o  $Ra^{226}$  ou  $Ra^{228}$ , as tornam radioativas e potencialmente perigosas para as diversas formas de vida marinha. Os principais problemas causados pela barita são os danos a equipamentos e perdas na produção relacionados principalmente à diminuição das áreas de fluxo da tubulação e queda na eficiência de transferência de calor. No caso de interação de BRS com incrustações de barita, soma-se a esses problemas, potencialização da biocorrosão de superfícies metálicas. Biofilmes corrosivos constituídos por BRS e associados a incrustações de barita, presentes no sistema de produção da plataforma PCH II, foram anteriormente caracterizados por técnicas microbiológicas, por testes metabólicos e por análises ultra-estruturais e elementais (Magalhães e cols., 1993, 1995). Nesse estudo, verificou-se que as BRS eram capazes de metabolizar o sulfato de bário na ausência de sulfato solúvel, dissolvendo as incrustações de barita. Por outro lado, a produção de sulfeto em altas concentrações causava corrosão localizada nos oleodutos daquela área de produção.

Com base em nossos resultados dos testes realizados com biocidas em sistema estático, a solução de DTPA foi selecionada para aplicação em campo. A escolha desse produto também se deveu à sua característica corrosiva moderada, comparada à da solução de GA-QAT (dados não mostrados). O DTPA já é utilizado na indústria do petróleo para remover incrustações de sulfato de bário (Wang e cols., 1999) mas, como comentado anteriormente, não consta na literatura dados de que ele possa funcionar como base ativa para o controle microbiano. A eficiência bactericida desse produto para o controle de BRS observada nos testes de laboratório recomendou seu uso no tratamento do oleoduto de campo. O conjunto das ações antiincrustante e biocida do DTPA permitiria tratamento da tubulação em uma única camada, visando o controle tanto da remoção das incrustações de sulfato de bário quanto do controle de BRS. Além dessa vantagem, o fato desse produto não elevar a

corrosividade do fluido permitiria o aumento do seu tempo de contato com os depósitos internos e, ainda, eliminaria a necessidade de desaeração prévia da água, reduzindo assim os custos relativos à parada de produção, desaeração da água e da utilização de um outro biocida.

As operações de rotina realizadas em campos de petróleo combinam programas de tratamento químico com passagens regulares de "pigs" (raspadores) no interior das tubulações (Jack e Westlake, 1995). Al-Hashen e cols. (1999) estudaram, em laboratório, os processos de remoção física de biofilmes crescidos em corpos-de-prova de aço-carbono com o intuito de simular a ação dos diferentes tipos de "pigs" utilizados em campo para limpeza mecânica. Eles verificaram que esse modo de tratamento foi eficaz em remover grande parte da população bacteriana de biofilmes formados tanto por microrganismos aeróbios quanto por microrganismos anaeróbios. Seus melhores resultados foram obtidos após o uso vigoroso de um raspador de plástico rígido sobre a superfície metálica, o que praticamente eliminou o biofilme preexistente. Entretanto, a complexidade das operações técnicas realizadas em campo e as extensas superfícies a serem raspadas dificultam a reprodução de resultados semelhantes em grande escala. Nossos dados de campo, obtidos após a passagem de "pigs" no interior do oleoduto, mostraram que o método foi eficiente para remover uma grande quantidade de bactérias planctônicas presentes na água produzida, porém não apresentou os mesmos resultados quanto à remoção de bactérias sésseis que se encontravam aderidas ao oleoduto antes do tratamento. Nossos resultados sugerem que a combinação da pré-ação química com DTPA com uma pós-ação mecânica com "pig" pode ser mais efetiva, e mereceria ser testada em campo e em laboratório.

Os resultados das análises microbiológicas de amostras líquidas retiradas da solução de tratamento com DTPA, ao término do contato do oleoduto PCH II / PCH I com esse produto, confirmaram seu efeito biocida sobre BRS planctônicas. As análises ultra-estruturais de resíduos coletados antes e após o tratamento confirmaram o mesmo efeito de desestruturação do biofilme bacteriano pelo uso de DTPA, anteriormente observado nos testes estáticos em laboratório. Porém, pela técnica do NMP, verificamos que esses resíduos coletados após o tratamento apresentaram uma concentração mais elevada de BRS quando comparada com a coleta anterior à aplicação do produto. Esse fato, provavelmente, se deveu ao atraso na coleta dos resíduos, que permitiu o seu contato com o fluido de produção proveniente de PCH II, recontaminando o sistema. É possível que as bactérias, detectadas pelas técnicas microbiológicas, estivessem presentes no fluido e tenham permeado os resíduos, mas não tenham aderido ao biofilme preexistente, posto que não foram detectadas pelas análises de microscopia eletrônica.

A rápida recontaminação das tubulações industriais por bactérias costuma ser

observada quando um biocida é removido do sistema. Esse efeito é regularmente evidenciado nos monitoramentos de eficiência de biocidas utilizados em oleodutos e sistemas de injeção de água do mar em todo o mundo (Al-Hashem e cols., 1999). Os biocidas tendem a matar apenas uma proporção 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. "Pigs" instrumentados, capazes de avaliar a integridade interna do oleoduto também devem ser implementados para monitoramento da corrosão interna e do perfil das incrustações encontradas em oleodutos e sistemas de injeção de água do mar. Na verdade, o ideal seria associar à monitoração microbiológica e estrutural, também uma monitoração dos efeitos corrosivos da presença de microrganismos, pois talvez haja uma densidade de biomassa mínima que possa contaminar residualmente o sistema, sem maiores conseqüências com relação à perda de massa das tubulações. Em outras palavras, poderia se chegar a um "equilíbrio" sem esterilização total e sem efeitos corrosivos.

O efeito biocida da solução de DTPA, utilizadas em nosso trabalho, pode estar relacionado (1) ao alto pH das soluções (pH 12 em laboratório e pH 14 em campo), (2) ao fato desta solução não ter sido previamente desaerada antes de sua aplicação ou (3) à formação de quelatos entre o DTPA e alguns elementos essenciais ao metabolismo bacteriano e à estrutura do biofilme, especialmente cátions divalentes.

Cada organismo possui uma faixa ideal de pH dentro da qual seu crescimento torna-se viável. Embora existam bactérias adaptadas a sobreviver em pH ácido (acidófilas) e em pH alcalino (alcalífilas), a maioria das BRS é encontrada em ambientes com uma faixa de pH entre 5 e 9 (Postgate, 1984; revisto em Barton e Tomei, 1995). Poucos organismos possuem um pH alto ótimo para o crescimento (pH 10-11) e são normalmente encontrados em habitats altamente alcalinos como lagos de soda e solos com alto teor de carbonato. A maioria dos procariotos alcalífilos estudados são bactérias aeróbias de origem não marinha (Madigan e cols., 1997). Como o funcionamento das enzimas citoplasmáticas celulares ocorre em pH próximo da neutralidade (pH 7), qualquer variação acentuada do pH citoplasmático acarretaria a morte celular (Lenhinger, 1986). O pH alcalino (pH  $\geq 12$ ) é necessário para que ocorra a dissolução das incrustações de sulfato de bário das tubulações (Wang e cols., 1999; Dunn e cols., 1999). Considerando que as soluções de DTPA utilizadas em nossos ensaios de laboratório e de campo possuíam pH 12 e pH 14, respectivamente, esses altos valores de pH podem ter causado dano direto às células. Entretanto, o possível efeito direto do pH sobre os

biofilmes de BRS aderidos à superfícies metálicas deverá ser comprovado em experimentos futuros.

A presença do oxigênio também pode ter contribuído para o efeito biocida observado para a solução de DTPA, tantos nos ensaios estáticos quanto na sua aplicação em campo. Ainda não se sabe ao certo qual é o verdadeiro efeito que o oxigênio exerce sobre as BRS. Acreditava-se, desde experimentos realizados por Pasteur, que todos os microrganismos anaeróbios eram mortos ao entrar em contato com oxigênio. Segundo Postgate (1984), as BRS, ao serem expostas ao ar, não seriam mortas, mas permaneceriam em estado de dormência. Em 1990, Dilling e Cypionka (revisto em Gall e Xavier, 1996) verificaram que algumas cepas do gênero *Desulfovibrio* eram capazes de realizar o processo de fosforilação oxidativa na presença de ar, o que faria com que essas BRS, além de serem capazes de tolerar o oxigênio, fossem também capazes de tirar alguma vantagem da sua presença. Nossos experimentos não contemplaram um controle de incubação das bactérias na presença de oxigênio e, portanto, é meramente especulativa qualquer conclusão a respeito do efeito desse elemento na morte celular estimada pelos testes microbiológicos com solução aerada de DTPA. A incubação de BRS sésseis e planctônicas na presença de água corrente aerada deverá ser realizada em experimentos futuros para avaliação dessa variável no controle do crescimento bacteriano. Mas, certamente, a presença do oxigênio, por mais lesiva que seja para as células, não teria efeito sobre a rápida desestruturação do biofilme bacteriano observada após tratamento com DTPA.

Os compostos inorgânicos presentes no biofilme variam de acordo com a composição química do fluido em que eles são encontrados e, provavelmente, afetam sua estrutura física e biológica. Elementos como o cálcio, o magnésio e o ferro interferem diretamente nas ligações entre as SPE do biofilme. SPE medeiam processos de adesão e são responsáveis pela integridade estrutural do biofilme (Characklis, 1981; Applegate e Bryers, 1991). Turakhia e cols. (1983) expuseram um biofilme bacteriano ao ácido triaminoetilenoglicol (EGTA), agente quelante específico de cálcio, induzindo a remoção do biofilme. O níquel, o selênio, o cálcio e o ferro também são cofatores para várias enzimas de BRS, cujas presenças, em uma concentração mínima, são necessárias para o crescimento dessas bactérias (Barton e Tomei, 1995). O DTPA é um composto químico capaz de formar complexos hidrosolúveis com os íons cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco, bário, estrôncio entre outros, em diversas faixas de pH (manual BASF-Trilon C, 1988). Sabendo-se que o EGTA é capaz de desestruturar e destacar biofilmes bacterianos (Characklis, 1979; Turakhia e cols., 1983), acreditamos que o efeito da solução de DTPA, utilizada no presente trabalho, sobre os biofilmes formados sobre os corpos-de-prova e no oleoduto, possa ser atribuído a um mecanismo de ação semelhante,

isto é, complexando íons necessários para o crescimento bacteriano e, principalmente, para a manutenção estrutural do biofilme.

Através da microanálise de raios-X por MET, constatamos a presença dos elementos bário, estrôncio, enxofre e ferro associados à matriz extracelular de BRS antes do tratamento com o DTPA no oleoduto PCH II / PCH I. Esses resultados confirmam a presença dessas bactérias junto a incrustações de sulfato de bário (barita) e de estrôncio (celestita), além de evidenciar a presença de produtos de corrosão como o sulfeto de ferro. Quando avaliamos o resíduo após o tratamento, verificamos a ausência dos íons bário e estrôncio na matriz do biofilme, provavelmente devido à complexação do DTPA com esses elementos e conseqüente solubilização das incrustações. Portanto, verificamos, além do efeito biocida, o efeito antiincrustante da solução de DTPA, dissolvendo as incrustações de sulfato de bário e de estrôncio, detectadas em amostras de resíduo retiradas do oleoduto PCH II / PCH I.

A microanálise de raios-X também nos permitiu mapear a presença do elemento químico Ru nas bactérias e biofilmes estudados. As micrografias eletrônicas de transmissão mostram que Ru foi detectado não somente associado às substâncias poliméricas extracelulares, mas também está presente em estruturas densas e amorfas no interior do citoplasma de bactérias sésses (Figs. 27A e 27G). O Ru detectado é originário do composto vermelho de rutênio (VR), usado nos processamentos para microscopia eletrônica. VR é um composto inorgânico catiônico capaz de detectar a presença de carboidratos ácidos e fosfolipídeos através de interações eletrostáticas (Luft, 1971). Vários autores têm utilizado esse composto para mostrar detalhes ultra-estruturais das SPE e diversas variações dos protocolos sugeridos por Luft (1971) já estão disponíveis para os diferentes tipos de bactérias encontrados na natureza (Revisto por Fassel e Edmiston, 1999). VR já foi usado anteriormente pelo nosso grupo para estudar a morfologia do glicocálice e da matriz extracelular de biofilmes bacterianos sulfidogênicos ricos em BRS e envolvidos em processos de biocorrosão em tubulações de petróleo da costa brasileira (Coutinho, 1991; Coutinho e cols., 1994b, 1994c). Nesses estudos, imagens ultra-estruturais sugeriram que as SPE eram sintetizadas no interior do citoplasma bacteriano e, posteriormente, passavam a tomar parte do biofilme. A liberação dos elementos de matriz extracelular poderia acontecer através da lise celular e conseqüente liberação para o biofilme dos polímeros acumulados no citoplasma das bactérias. Essa hipótese foi proposta com base nas imagens que mostravam, em áreas próximas do biofilme, a presença de células mortas ("fantasmas") imersas em exopolímeros morfológicamente semelhantes àqueles encontrados no interior de células íntegras. Nossos dados atuais não só corroboram com os dados anteriores, como também fornecem evidências mais diretas para essa hipótese, pela identificação do Ru associado às estruturas densas de

exopolímeros acumulados no citoplasma de algumas células, cujo aspecto amorfo e denso se assemelha às SPE que constituem o biofilme.

Com relação ao padrão morfológico do glicocálice das bactérias estudadas em nosso trabalho, verificamos que os microrganismos planctônicos possuíam a forma filamentosa enquanto nos sésseis prevaleceu o tipo de cápsula densa e amorfa. Esses dados também estão de acordo com os resultados anteriores do nosso grupo, que mostram que cápsulas de BRS, apresentam três tipos morfológicos distintos: filamentosas para bactérias planctônicas, tubulares e amorfas densas para bactérias sésseis (Coutinho, 1991; Coutinho e cols., 1994b, 1994c). Os estudos de caracterização das SPE produzidas por bactérias são muito importantes se levarmos em consideração as numerosas funções que são atribuídas à matriz extracelular como, por exemplo, adesão ao substrato e proteção contra a ação de biocidas e agentes surfactantes (Costerton, 1995).

O produto de corrosão sulfeto de ferro foi frequentemente encontrado associado à matriz do biofilme e à superfície bacteriana, detectado tanto por sua morfologia característica em MEV quanto por microanálises de raios-X por MET. A presença de sulfeto de ferro em biofilmes compostos por BRS já é bastante difundida na literatura relativa à biocorrosão (Lewandowski, 2000; Videla, 2000; Ma e cols., 2000).

Trabalhos de laboratório têm demonstrado que microrganismos em biofilmes (existência sésseis) 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 os elementos de matriz extracelular (Sutherland e cols., 1999; Costerton e cols., 1999). Existe uma vasta gama de dados na literatura sugerindo que SPE poderiam fisicamente dificultar a difusão e o acesso de agentes antimicrobianos às células do interior do biofilme (Costerton e cols., 1987; Slack e Nichols, 1981, 1982; Suci e cols., 1994). Por outro lado, outros autores verificaram que reduções nos coeficientes de difusão para alguns antibióticos não são suficientes para justificar as mudanças observadas na suscetibilidade de células sésseis (Gordon e cols., 1988; Nichols e cols., 1988, 1989). As SPE podem inativar quimicamente biocidas como o cloro e peróxidos e, também, se ligar a antibióticos altamente carregados fornecendo alguma proteção para as células que se encontram em regiões mais profundas. Esse efeito protetor está principalmente relacionado ao poder de troca iônica da matriz, fazendo com que moléculas carregadas possam ser ativamente removidas da solução. Para atingir as bactérias no interior do biofilme é necessário que as moléculas dos compostos bactericidas saturam todos os sítios de ligação disponíveis na matriz extracelular. Através desse mecanismo, acredita-se que as SPE reduzam o acesso, ou, até mesmo, neutralizem o efeito dos biocidas através de enzimas extracelulares localizadas em

seu interior, capazes de degradar os agentes de tratamento utilizados para o controle do biofilme bacteriano (Foley e Gilbert, 1996; Allison, 1998; Schierholz e cols., 1999). Outros fatores como o tempo de contato e concentração do biocida, estado fisiológico das células, taxa de crescimento das populações bacterianas, posicionamento das células dentro do biofilme e até mesmo mecanismos de sinalização intracelular estão envolvidos com a resistência bacteriana (LeChevallier e cols., 1988; Gilbert e cols., 1990; Gaylarde e Videla, 1994; Morton e cols., 1998; Davies e cols., 1998).

Cheung e Beech (1996) estudaram o efeito do formaldeído, da isotiazolona e do GA no processo de adesão de duas diferentes cepas de BRS sobre o aço-carbono. Eles verificaram que as BRS planctônicas foram mais suscetíveis à ação dos três biocidas do que as sésseis e que o GA foi o composto mais eficiente em controlar os dois estados de existência bacteriana. Esses autores também relataram que a taxa inicial de adesão das BRS variava com o tempo de incubação e com a cepa de BRS utilizada. Grab e Theis (1992) compararam a eficiência de alguns biocidas, entre eles o GA e o GA-QAT, sobre bactérias aeróbias e sobre BRS cultivadas em laboratório e presentes em um sistema de recirculação de água de uma fábrica de bebidas. Novamente, as soluções biocidas foram mais eficazes em controlar as populações planctônicas do que as sésseis e o maior tempo de contato também mostrou ser um fator importante para o sucesso dos experimentos. Dentre os biocidas testados por eles, o GA-QAT foi o mais eficaz em controlar os biofilmes de BRS crescidos em laboratório, seguido pelo GA. O interessante é que em campo, o tratamento prévio com o QAT resultou em problemas sérios de incrustação biológica ("biofouling") e de corrosão das superfícies metálicas. Eles trataram, então, o sistema apenas com GA e a população de BRS foi controlada.

Os nossos resultados se assemelham àqueles descritos na literatura em relação à susceptibilidade de bactérias sésseis e planctônicas aos tratamentos químicos. Através das técnicas microbiológicas, observamos que as bactérias sésseis foram menos suscetíveis à ação dos biocidas do que as bactérias planctônicas, nos ensaios tanto no sistema estático quanto no sistema dinâmico de fluxo d'água "loop". Também verificamos que, em geral, quanto maior o tempo de contato dos biocidas com as bactérias sésseis e planctônicas, maior a eficiência dos compostos testados. As análises de microscopia eletrônica também revelaram que as soluções de DTPA e de GA-QAT, utilizadas nos testes estáticos, foram mais eficientes na desorganização dos biofilmes após tempos maiores de contato com as amostras.

No presente estudo, foram aplicados diferentes critérios de eficiência biocida para análise dos resultados obtidos nos ensaios em sistemas estático e dinâmico de fluxo d'água. No sistema estático, os biocidas testados foram classificados como eficiente ou não eficiente, sendo considerado eficiente quando inibiu completamente o crescimento das BRS. Já no

sistema dinâmico, a eficiência biocida foi classificada como baixa, média ou alta, de acordo com critérios preestabelecidos para detecções de atividade e concentração de BRS (ver Resultados). O sistema dinâmico "loop" foi testado pela primeira vez em nosso trabalho como uma metodologia a ser aplicada em estudos posteriores de formação, modelagem e controle de biofilmes. Testamos, em dois experimentos independentes, as soluções de GA e de GA-QAT em tempos curtos de tratamento (1 h, 4 h e 24 h). Em muitos sistemas industriais, é importante que os biocidas sejam capazes de 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 (De Beer e cols., 1994; Watkins e Costerton, 1994; Videla e cols., 1996; Al-Hashen, 1999). Em ambos os testes realizados no "loop", as bactérias planctônicas mostraram maior susceptibilidade aos biocidas. Com relação às bactérias sésseis, os biocidas apresentaram eficiência média ou baixa. Grupos de m-BRS e BANHT foram mais sensíveis a esses compostos após os tempos maiores de contato (24 h) quando GA foi usado isoladamente (eficiência média). Ao contrário do que se esperava, GA coadjuvado com QAT apresentou a mesma eficiência média sobre as bactérias sésseis somente nos menores tempos de contato (1h e 4 h), e eficiência baixa após 24 h. Ressalta-se, porém, que a dosagem de GA foi a mesma (250 ppm do produto) nos dois testes, mas a concentração das bactérias no "loop", imediatamente antes da aplicação do biocida, foi consideravelmente menor no primeiro teste com GA do que no segundo teste com GA-QAT. Esta variável pode ter influenciado a eficiência dos produtos no controle bacteriano, já que se recomenda que a dosagem do biocida seja proporcional à concentração de bactérias no sistema. Gaylarde e Gaylarde (1996) desenvolveram um modelo matemático visando descrever a difusão de compostos biocidas em biofilmes. Os autores acreditam que com o conhecimento das taxas de difusão e do estado fisiológico das bactérias em um tempo determinado, é possível estimar a concentração biocida necessária para matar tanto células sésseis quanto células em suspensão.

Através dos ensaios estáticos e dinâmicos de fluxo d'água, realizados no presente estudo, observou-se que as soluções de GA e de GA-QAT, mesmo que tenham apresentado eficiência contra bactérias sésseis e planctônicas nos testes microbiológicos, não foram capazes de remover completamente os biofilmes aderidos aos corpos-de-prova quando estes foram analisados por microscopia eletrônica. Ressalta, ainda, o fato de que o tratamento com GA alterou a estrutura morfológica da matriz extracelular, que se condensou mais intensamente sobre o substrato, constituindo uma camada mais espessa de material precipitado envolvendo as células. Esse fenômeno é, possivelmente, consequência das reações cruzadas do glutaraldeído com os grupos básicos de proteínas (-NH<sub>2</sub>, -OH, -COOH, -SH)

imobilizando essas moléculas na sua posição original. É conhecido que BRS podem potencializar o fenômeno da biocorrosão através de sua adesão e ao metal e formação de biofilmes funcionais ou ainda pela presença de restos celulares sobre o substrato metálico, pois gera pilhas de concentração iônica (Ford e cols., 1987; Videla, 2000). Além disso, a matriz extracelular de BRS apresenta propriedades corrosivas por possuir afinidade por íons metálicos (Beech e Cheung, 1995). Portanto, a simples permanência do biofilme aderido à superfície metálica, mesmo que as células estejam mortas, caracteriza-se como um problema para o controle da biocorrosão. Nesse sentido, é importante que, para o controle da biocorrosão, paralelo ao acompanhamento da concentração de bactérias num determinado sistema, sejam também monitoradas as taxas de corrosão do metal.

Ao término dos ensaios no "loop", analisamos a superfície de corpos-de-prova e da tubulação de PVC que compõe o sistema, e também amostras líquidas retiradas da solução final de lavagem. Essas análises permitiram avaliar o grau de contaminação resultante no sistema e a estrutura do biofilme sobre os corpos-de-prova após os testes biocidas. Verificamos, por microscopia eletrônica, que o biofilme bacteriano não só permanece aderido aos corpos-de-prova depois de prolongado contato com as soluções biocidas e lavagem do "loop", mas pode liberar células para o fluido (detectadas na água do mar estéril recém-injetada). Essas células em suspensão podem, em princípio, levar à contaminação e formação de biofilme em outras áreas do sistema. Além disso, ao examinarmos por MEV fragmentos de PVC extraídos do "loop" após sua lavagem e esvaziamento, encontramos um biofilme bacteriano denso sobre a superfície desse material. Algumas bactérias aparentavam, inclusive, processo de esporulação, fenômeno associado a desenvolvimento de resistência a agentes bactericidas (Russel, 1995; Russel e Day, 1996). Vess e cols. (1993) estudaram, por MEV, a capacidade de bactérias, normalmente encontradas na água, colonizarem uma tubulação de PVC sob o efeito de biocidas. Seus resultados mostraram que as bactérias podem aderir e colonizar a superfície interna dessas tubulações e desenvolver significativa resistência à ação de bases ativas, permanecendo aderidas à tubulação mesmo após procedimentos de desinfecção. Os autores concluíram que a proteção conferida por componentes de matriz extracelular que envolviam as bactérias aderidas representou um dos principais fatores que permitiram a sobrevivência desses microrganismos e seu restabelecimento em canos de PVC após tratamento com biocidas. A análise de nossos resultados, à luz desses dados da literatura, nos levam à conclusão que a própria tubulação do sistema "loop" pode ser fonte de contaminação de bactérias e apontam para a necessidade de métodos mais eficientes de desinfecção química e limpeza mecânica do sistema, intercalando ensaios de microbiologia. Com esse objetivo, vários testes com diferentes tipos de PVC já estão sendo realizados. Além

disso, o uso de uma metodologia de desinfecção do sistema entre cada ensaio microbiológico será adotada nos próximos testes. Pretendemos nos próximos ensaios seguir o protocolo sugerido por McCoy e Costerton (1982), em que o sistema é tratado por hipoclorito de sódio e álcool etílico e re-injetado com nitrogênio ultrapuro antes de ser utilizado.

Através dos ensaios por microscopia confocal fomos capazes de medir a espessura do biofilme formado sobre a superfície do corpo-de-prova, de avaliar a distribuição das colônias bacterianas sobre a área metálica colonizada pelas bactérias e ainda associar a presença do biofilme com áreas corroídas ("pits"). Utilizamos como sonda fluorescente marcadora das bactérias, o corante laranja de acridina, que possui afinidade por ácidos como o DNA ou o RNA. A aplicação do microscópio confocal de varredura a laser no estudo de biofilmes tem fornecido novas informações sobre a complexidade estrutural de biofilmes vivos (Palmer e Sternberg, 1999; Stoodley e cols., 1999). Em ensaios realizados com células vivas e hidratadas, Stoodley e cols. (1994) utilizaram o confocal para medir a velocidade de fluxo de líquidos no interior dos biofilmes. Além disso, alguns estudos utilizam, em conjunto, as técnicas de microscopia confocal associadas às diferentes técnicas de microscopia eletrônica para estudos relacionados à natureza e à estrutura dos biofilmes bacterianos nos diversos setores da indústria (Lawrence e cols., 1991; Mattila e cols., 1997; Massol-Deyá e cols., 1995). A microscopia confocal oferece grande potencial a ser explorado para estudo dos processos de biocorrosão associados a tubulações de plataformas de petróleo no Brasil. Várias abordagens podem ser feitas, entre elas: estudos da efetividade de biocidas contra bactérias sésseis, permitindo análises do efeito dos biocidas sobre células em diferentes profundidades do biofilme; medidas de profundidade dos "pits" e da distância entre eles; avaliação da ecologia e fisiologia microbiana; distribuição de espécies de BRS dentro de um biofilme através do uso de sondas imunológicas e moleculares específicas (Stoodley e cols., 1999). Pretendemos dar continuidade às pesquisas nessa área do conhecimento e aprimorar o uso da microscopia confocal para o estudo da biocorrosão de superfícies metálicas, buscando estreitar, ainda mais, a interface entre a pesquisa básica e a pesquisa aplicada a setores da indústria do petróleo.

## **Conclusões**

1. As técnicas de microscopia eletrônica e de microanálise de raios-X, assim como os protocolos utilizados, mostraram-se ferramentas úteis para o estudo do efeito de bases ativas sobre biofilmes bacterianos e incrustações associados a processos de biocorrosão na indústria do petróleo brasileira.
2. Dentre as soluções e combinações químicas testadas em sistema estático de fluxo d'água, DTPA e GA-QAT foram as que apresentaram os melhores resultados nos testes microbiológicos de avaliação de eficiência biocida. As duas soluções foram capazes de impedir o crescimento bacteriano sobre os corpos-de-prova, sendo que o DTPA foi mais eficiente.
3. As bactérias sésseis foram mais resistentes aos tratamentos químicos realizados do que as bactérias planctônicas, sendo que o grau de resistência foi, em geral, dependente do tempo de contato e da concentração de bactérias presentes nos sistemas.
4. As soluções de GA e de GA-QAT não foram capazes de remover os biofilmes aderidos aos corpos-de-prova nos ensaios estáticos nem dinâmicos de fluxo d'água. Considerando que a simples presença de restos celulares, matriz extracelular e produtos de corrosão sobre o metal pode levar ao processo corrosivo, o uso dessas soluções não é suficiente para o controle da biocorrosão nas tubulações das plataformas de petróleo.
5. DTPA foi eficiente tanto para desorganizar biofilme bacteriano corrosivo, em ensaios de laboratório e em tratamento de campo, quanto para dissolver incrustações de sulfato de bário presentes em oleodutos.
6. O efeito biocida do DTPA pode estar relacionado à formação de quelatos entre o DTPA e alguns elementos essenciais ao metabolismo bacteriano e à estrutura do biofilme, especialmente cátions divalentes.
7. O tratamento em campo deve abranger todas as partes contaminadas do sistema que apresentam comunicação de fluidos, caso contrário, áreas individualmente tratadas podem voltar a se contaminar imediatamente após intervenção química.

8. O sistema dinâmico de fluxo d'água "loop" mostrou-se uma eficiente ferramenta para estudos de monitoramento do crescimento de BRS e da seleção de bases ativas visando controlar os processos corrosivos nos sistemas de injeção de água do mar. Entretanto, métodos mais eficientes de desinfecção química e limpeza mecânica do sistema devem intercalar ensaios de microbiologia, a fim de prevenir contaminação do sistema que venha a comprometer testes futuros.
  
9. A técnica de microscopia confocal de varredura a laser mostrou-se útil para a avaliação da presença e densidade do biofilme bacteriano aderido ao metal e também para a detecção de profundidades de pontos de corrosão abaixo dos biofilmes. Essa técnica apresenta potencial para avaliações futuras de fenômenos associados à biocorrosão na indústria do petróleo brasileira.

**REFERÊNCIAS**

- Aguiar LEV 1998. A pesquisa e a experimentação como instrumentos de motivação no ensino e aprendizagem de ciências. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 151 págs.
- Aguiar LEV 1991. Estudos eletroquímicos para desenvolvimento de um método de identificação e semiquantificação de bactérias redutoras de sulfato envolvidas em processos de biocorrosão. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 68 págs.
- Al-Hashem A, Salman M, Carew J 1999. Screening and evaluation of microbiologically influenced corrosion (MIC) in seawater and effluent water injection systems in Kuwait. *Corrosion / 99*, paper n°. 182, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Allison DG, Heys SJD, Willcock L, Holah J & Gilbert P 1999. Cellular detachment and dispersal from bacterial biofilms: a role for quorum sensing? Em: *Biofilms: the good, the bad and the ugly*. Wimpenny J, Gilbert P, Walker J, Brading M & Bayston (eds), Bioline, Cardiff, p 279-286.
- Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A & Gilbert P 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 167: 179-184.
- Allison DG 1998. Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. *Biofilm Journal* 3(2): 1-12.
- Amjad Z 1996. Scale inhibition in desalination applications: an overview. *Corrosion / 96*, paper no. 230, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Angell P 1999. Understanding microbially influenced corrosion as biofilm-mediated changes in surface chemistry. *Curr Opin Biotechnol* 10: 269-272.
- Applegate DH & Bryers JD 1991. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnol Bioeng* 37: 17-25.

- Araújo-Jorge TC, Coutinho MLM, Aguiar LEV 1992. Sulphate-reducing bacteria associated with biocorrosion - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 329-337.
- Assad A 2000. *Jornal do Brasil*. Terça-feira, 18 de julho pág. 7.
- Barton LL, Tomei FA 1995. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. Em: Sulfate-reducing bacteria. Barton LL (ed), Plenum Press, New York. p 49-87.
- Battersby NS, Stewart DJ & Sharma AP 1985. A simple most probable number method for the enumeration of sulphate-reducing bacteria in biocide containing waters. *J Appl Bacteriol* 58: 425-429.
- Beech IB, Hanjagsit L, Kalaji M & Neal AL 1999a. Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas sp.* NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology* 145: 1491-1497.
- Beech IB, Zinkevich V, Tapper R, Gubner R, Avci R 1999b. Study of interection of sulphate-reducing bacteria exopolymers with iron using X-ray photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary ionization mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 36: 3-10.
- Beech IB, Campbell S, Mills G, & Walsh F 1996. Engineering problems caused by microbial corrosion and their prevention. *Corrosion Management*, June/July: 12-18.
- Beech IB 1996. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms - an overview. *International Biodeterioration* 141-149.
- Beech IB, Cheung CWS, Johnson DB, Smith JR 1996. Comparative studies of bacterial biofilms on steel surfaces using atomic force microscopy and environmental scanning electron microscopy. *Biofouling* 10: 65-77.
- Beech IB & Cheung CWS 1995. Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59-72.
- Bessems E 1984. The control of sulphate-reducing bacteria in pipe line systems in the oil

industry by quaternary ammonium compounds and by some newly developed products. *Int Biodet Symposium*, Washington DC, August, p 148-153.

Bessemis E & Clemmit AF 1983. Quaternary ammonium compounds; assesment and application in the control of sulphate reducing bacteria. Em: Chemicals in the oil industry, Ogden PH (ed), London WIV OBN: The Royal Society of Chemistry. p 159-170

Blanco FE, Pérez de Obanos BM & Freitez RN 1996. Experiences in the use of polymers for the prevention and control of corrosion in the venezuelan petrochemical industry. *Corrosion / 96*, paper n°. 399, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.

Boivin J 1995. Oil industry biocides. *Materials Performance* 34(2): 65-68.

Brown MRW & Williams P 1985. The influence of environment on the envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Ann Rev Microbiol* 39: 527-556.

Brözel VS, Pietersen B & Cloete TE 1995. Resistance of bacterial cultures to non-oxidising water treatment bactericides by adaptation. *Wat Sci Tech* 31(5-6): 169-175.

Bruhn CH, Rodrigues EB, Barros AP, Backheuser Y, Freitas LCS, Suarez CR 1996. Estratigrafia de alta resolução, heterogeneidades de reservatório e modelagem geológica tridimensional do reservatório do Campo de Marlim, Bacia de Campos. I Seminário de Reservas e Reservatórios, realizado pela PETROBRAS em setembro de 1996 no Rio de Janeiro, RJ.

Castro HF, Williams NH & Ogram A 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 1-9.

Characklis WG 1990. Biofilm processes. Em: Biofilms. Characklis WG & Marshall KC (eds), A wiley-interscience publication, John Wiley & Sons, Inc. p 195-230.

Characklis WG 1979. Biofilm development and destruction. Final report, Electric Power Research Inst. No. RP 902-1, Palo Alto, CA.

- Characklis WG 1981. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol Bioeng* 23: 1927-1960.
- Charaf UK, Bakich SL & Falbo DM 1999. A model for efficacy assessment of antimicrobials versus biofilm bacteria. Em: *Biofilms: the good, the bad and the ugly*. Wimpenny J, Gilbert P, Walker J, Brading M & Bayston (eds), Bioline, Cardiff, p 171-177.
- Chen G & Clayton CR 1999. X-ray photoelectron spectroscopy analysis of Mo metal surface exposed to sulfate-reducing bacteria. *Surface and Interface Analysis* 27(4): 230-235.
- Chen G & Clayton CR 1998. Interaction of sulfate-reducing bacteria with molybdenum dissolved from sputter-deposited molybdenum thin films and pure molybdenum powder. *Journal of Colloid and Interface Science* 204(2): 237-246.
- Cheung CWS & Beech IB 1996. The use of biocides to control sulphate-reducing bacteria in biofilms on mild steel surfaces. *Biofouling* 9: 231-249.
- Cheung CWS 1995. Biofilms of marine sulphate-reducing bacteria on mild steel. Tese de Doutorado, University of Portsmouth, Portsmouth, UK.
- Cheung CWS, Walsh FC, Campbell SA, Chao WT & Beech IB 1994. Microbial contributions to the marine corrosion of steel piling. *Int Biodeterior Biodegrad* 259-274.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-Scott HM 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
- Costerton JW 1995. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15: 137-140.
- Costerton JW, Lewandowski Z, De Beer D, Caldwell D, Korber D & James G 1994. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176: 2137-2142.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M & Marrie TJ 1987.

- Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Costerton JW, Geesey GG & Cheng KJ 1978. How bacteria stick. *Scientific American* 238: 86-95.
- Coutinho CMLM, Magalhaes FC & Araújo-Jorge TC 1994a. Ultrastructure of sulphidogenic biofilms rich in sulphate-reducing bacteria causing corrosion in offshore oil extraction platforms of Brazil's Atlantic coast. *J Gen Appl Microbiol* 40: 227-241.
- Coutinho CMLM, Magalhaes FC & Araújo-Jorge TC 1994b. Morphology of the surface coat and extracellular matrix of sulphidogenic biofilms enriched in sulphate-reducing bacteria involved in biocorrosion processes in the offshore oil extraction industry of Brazil's coast. *J Gen Appl Microbiol* 40: 271-276.
- Coutinho CMLM, Aguiar LEV, Magalhães FC, Araújo-Jorge TC 1994c. Ultrastructural study of sulphate-reducing bacteria involved in biocorrosion process. *Proceedings of the XIII International Congress of Electron Microscopy*, Paris, p 169-170.
- Coutinho CMLM, Magalhaes FC & Araújo-Jorge TC 1993. Scanning electron microscope study of biofilm formation at different flow rates over metal surfaces using sulphate-reducing bacteria. *Biofouling* 7: 19-27.
- Coutinho CMLM 1991. Estudo ultra-estrutural de biofilmes bacterianos envolvidos no processo de corrosão em plataformas marítimas da PETROBRAS. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 168 págs.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- Dalton HM & March PE 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol* 9: 252-255.
- De Beer D, Srinivasan R & Stewart PS 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 12: 4339-4344.

- Downward BL, Talbot RE & Haack TK 1997. Tetrakis(hidroxi)metilfosfônio sulfato (THPS): a new industrial biocida com baixa toxicidade ambiental. *Corrosion / 97*, paper n.º. 401, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Dunn K, Daniel E, Shuler PJ, Chen HJ, Tang Y & Yen TF 1999. Mecanismos de precipitação e dissolução de barita: uma abordagem morfológica. *Journal of Colloid and Interface Science* 214: 427-437.
- Eagar RG & Theis AB 1986. Glutaraldeído: impacto na corrosão causada por biofilmes. *Corrosion / 86*, paper n.º. 125, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Edyvean RGJ & Dexter SC 1993. MIC em indústrias marinhas. Em: A manual prático sobre corrosão influenciada microbiologicamente. Kobrin G (ed), NACE International, Houston, p 47-63.
- Fassel TA & Edmiston Jr. CE 1999. Rênio vermelho e o glicocalix bacteriano. *Biotech Histochem* 74(4): 194-212.
- Fauque GD 1995. Ecologia de bactérias redutoras de sulfato. Em: Bactérias redutoras de sulfato. Barton LL (ed), Plenum Press, New York. p 217-235.
- Fedorak PM, Westlake DW, Anders C, e cols. 1986. Liberação microbiana de  $^{226}\text{Ra}^{2+}$  de lamas de  $(\text{Ba,Ra})\text{SO}_4$  de resíduos de mineração de urânio. *Appl Environ Microbio.* 52: 262-268.
- Ferris FG, Schultze S, Witten TC, Fyfe WS & Beveridge TJ 1989. Interações metálicas com biofilmes microbianos em ambientes de pH ácido e neutro. *Appl Environ Microbiol* 55: 1249-1257.
- Fletcher M 1994. Biofilmes bacterianos e bioincrustação. *Curr Opin Biotechnol* 5: 302-306.
- Foley I & Gilbert P 1996. Resistência a antibióticos de biofilmes. *Biofouling* 10: 331-341.
- Ford TE, Maki JS & Mitchell R 1987. Ligação metálica a exopolímeros bacterianos e processo de corrosão. *Corrosion / 87*, paper n.º. 380, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.

- Fu SL, Griffin AM, Garcia Jr. JG & Yang B 1996. A new localized corrosion monitoring technique for the evaluation of oilfield inhibitors. *Corrosion* / 96, paper no. 346, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275.
- Gall JL & Xavier AV 1996. Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 2: 1-9.
- Gaylarde CC & Videla HA 1994. Control of biofilms by biocides. *Corrosion Reviews* 12(1-2): 85-93.
- Gaylarde C & Beech IB 1988. Bacterial polysaccharides and corrosion. *Biocorrosion-Biodeterioration Society* 85-98.
- Geesey GG 1993. Biofilm formation. Em: A practical manual on microbiologically influenced corrosion. Kobrin G (ed), NACE International, Houston, p 11-13.
- Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT & Costerton JW 1977. Microscopic examination of sessile bacterial populations from alpine stream. *Can J Microbiol* 23: 1733-1736.
- Gentil V 1996. Corrosão. 3<sup>a</sup> edição. LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. (ed), Rio de Janeiro. 345 págs.
- Gibson GR, Cummings JH & Macfarlane GT 1991. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol Ecol* 86: 1003-1111.
- Gibson GR 1990. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J Appl Bacteriol* 69: 769-797.
- Gilbert P, Collier PJ & Brown MRW 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response.

- Antimicrob Agents Chemother 34(10): 1865-1868.
- Gilbert P 1988. Microbial resistance to preservative systems. Em: Microbial assurance in pharmaceuticals, cosmetics and toiletries. Bloomfield SF, Baird R, Leak RE & Leech R (eds), Ellis Horwood, Chichester. p 171-194.
- Glein GA 1996. Metal, fiberglass and thermoplastic tanks and piping: a review of costs and other decision factors. *Corrosion / 96*, paper n°. 405, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Gómez de Saravia SG & Gaylarde CC 1998. The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Brassica negra*. *Int Biodeterior Biodegrad* 41: 145-148.
- Grab LA & Theis AB 1992. Comparative biocidal efficacy vs. sulfate-reducing bacteria. *Corrosion / 92*, paper n°. 184, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Guamet PS, Gómez de Saravia SG & Videla HA 1999. An innovative method for preventing biocorrosion through microbial adhesion inhibition. *Int Biodeterior Biodegrad* 43: 31-35.
- Hamilton WA 1998. Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact. *Biodegradation* 9: 201-212.
- Hamilton WA & Lee W 1995. Biocorrosion. Em: Sulfate-reducing bacteria. Barton LL (ed), Plenum Press, New York. p 243-264
- Hamilton WA 1985. Sulphate-Reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annu Rev Microbiol* 39: 195-217.
- Hamilton WA 1983. Sulphate-reducing bacteria and the offshore oil industry. *Trends Biotechnol* 1: 36-40.
- Hansen TA 1994. Metabolism of sulphate-reducing prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66: 165-185.

- Harrigan WF & McCance ME 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press.
- Herbert BN 1993. Biofilms and pipelines. Em: Bacterials biofilms and their control in medicine and industry. Wimpenny J, Nichols W, Stickler D & Lappin-Scott H (eds), Bioline, Cardiff, págs. 117-120.
- Hudgins Jr. CM 1992. Chemical treatments and usage in offshore oil and gas production systems. *Journal of Petroleum Technology*, p 604-611.
- Iverson W 1985. Mecanismos de corrosión anaeróbica. Reunion de Trabajo Argentino-Estadounidense sobre Biodeterioracion de Materiales (CORVICER-NSF). Ed. Aquate e Química S.A. p 33-42.
- Jack TR & Westlake WS 1995. Control in industrial settings. Em: Sulfate-reducing bacteria. Barton LL (ed), Plenum Press, New York. p 265-292.
- Kenisur 1996. Aplicação do molibdato em tratamento de águas de refrigeração. *Petro & Química*, Janeiro/Fevereiro, p 39-40.
- Lawrence JR, Wolfaardt GM & Korber DR 1994. Monitoring diffusion in biofilm matrices using confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 60: 1166-1173.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW & Caldwell DE. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 20: 6558-6567.
- Le Chevallier MW, Cawthon CD & Lee RG 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol* 54(3): 649-654.
- Lee W, Lewandowski Z, Nielsen PH & Hamilton WA 1995. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review. *Biofouling* 8: 165-194.
- Lenhinger AL, 1986. Princípios de bioquímica. Traduzido por Lodi WR e Simões AA, Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda (ed), São Paulo.

- Lewandowski Z 2000. MIC and biofilm heterogeneity. *Corrosion / 2000*, paper n°. 400, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Ludensky ML 1999. Biofilm monitoring in industrial applications. Em: "Biofilms: the good, the bad and the ugly". Wimpenny J, Gilbert P, Walker J, Brading M & Bayston (eds), Bioline, Cardiff, p 81-89.
- Luft JH 1971. Ruthenium red and violet. I. chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat Rec* 171: 347-368.
- Ma H, Cheng H, Li G, Chen S, Quan Z, Zhao S & Niu L 2000. The influence of hydrogen sulfide on corrosion of iron under different conditions. *Corrosion Science* 42: 1669-1683.
- McCoy WF & Costerton W 1982. Fouling biofilm development in tubular flow systems. Em: "Developments in industrial microbiology". A publication of the Society for Industrial Microbiology.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J 1997. Em: Brock biology of microorganisms, 8<sup>a</sup> ed. Prentice-Hall, Inc. Simon & Schuster, New Jersey.
- Magalhães FCM 1998. Manual de especificação de qualidade de água de injeção – fatores associados à ação de microrganismos. Referência interna CENPES/PETROBRAS.
- Magalhães FCM, Souza HA, Penna MO, Silva ED, Oliveira HB, Andrade, CA, Sebastian GV Moutinho JL & Ibaje S 1995. Estudo das causas prováveis de dano do riser de PCH-2 relacionadas à deposição de sulfato de bário e à ação localizada da bactéria redutora de sulfato. Referência interna CENPES/PETROBRAS.
- Magalhães FCM, Vital AAN & Gomes VLC 1993. Metabolização de sulfato de bário por bactérias redutoras de sulfato. 15 Mesa redonda sobre corrosão influenciada por microrganismos, CENPES.
- Manual BASF-Trilon 1988. Chelating agents. BASF Aktiengesellschaft, D-6700 Ludwigshafen.

- Marsh PD & Bradshaw DJ 1995. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15: 169-175.
- Marshall KC 1994. Microbial adhesion in biotechnological processes. *Curr Opin Biotechnol* 5: 296-301.
- Maruthamuthu S, Ponmariappan S, Indiral KR, Subramanian A & Rengaswamy NS 2000. Interference between biocides and inhibitors in cooling water systems. *Bulletin of Electrochemistry* 16(5): 209-213.
- Massol-Deyá AA, Whallon J, Hickey RF & Tiedje 1995. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated ground water. *Appl Environ Microbiol* 61(2): 769-777.
- Mattila K, Carpen L, Hakkarainen T & Salkinoja-Salonen MS 1997. Biofilm development during ennoblement of stainless steel in Baltic Sea water: a microscopic study. *Int Biodeterior Biodegrad* 40: 1-10.
- Morris EA, Pope DH, Fillo JP, Brandon DM, Fetsko ME & Fulton JW 1995. Current and future trends in biocide and corrosion inhibitor usage in the natural gas industry: efficacy and potential environmental impact. *Proceeding of 1995 International Conference on Microbially Influenced Corrosion*, NACE, p 51.1-51.13.
- Morris EA & Pope DH 1994. Field and laboratory investigations into the persistence of glutaraldehyde and acrolein in natural gas storage operations. *Corrosion / 94*, paper n°. 270, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Morton LHG, Greenway DLA, Gaylarde C & Surman SB 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int Biodeterior Biodegrad* 41: 247-259.
- National Bureau of Standards (US) 1978.
- Neu TR & Poralla K 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl Microbiol Biotechnol* 32: 521-525.

- Nichols WW, Evans MJ, Slack MPE & Walmsley HL 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 518-523.
- Nichols WW, Evans MJ, Slack MPE & Walmsley HL 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 35: 1219-1303.
- Nivens DE, Palmer RJ & White DC 1995. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *J Ind Microbiol* 15: 263-276.
- Palmer RJ & Sternberg C 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Opin Biotechnol* 10: 263-268.
- Paterek JR, Cepuritis A & Srivastava VJ 1998. Prevention and control of microbiologically influenced corrosion using environmentally benign natural products. *International Gas Research Conference*, p 681-691.
- Percival SL, Knapp JS, Wales DS & Edyvean RGJ 1999. Biofilm development in potable quality water. *Biofouling* 13: 259-277.
- Pelczar Jr. MJ, Chan ECS & Krieg NR 1997. *Microbiologia: conceitos e aplicações*, vol 1, 2<sup>a</sup> ed. Makron Books do Brasil Editora Ltda (ed). 524 págs.
- Pope DH, Zintel TP, Aldrich H & Duquette D 1990. Laboratory and field tests of efficacy of biocides and corrosion inhibitors in the control of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion / 90*, paper n<sup>o</sup>. 34, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Postgate JR 1984. *Em: The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Resoluções da CONAMA 1992. Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 20 de 18 de junho de 1986. *Resoluções da CONAMA - 1984 a 1991 - Secretaria de Meio Ambiente da Presidência da República, CONAMA/IBAMA, 4<sup>a</sup> edição, Brasília.*

- Reynolds ED 1963. The use of citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Ridgway HF, Kelly AC, Justice & Oslon BH 1983. Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological and ultrastructural analyses. *Appl Environ Microbiol* 45(1): 1066-1084.
- Ruseska I, Robbins J & Costerton JW 1982. Biocide testing against corrosion-causing oil field helps control plugging. *Oil & Gas Journal* 80: 253.
- Russel AD 1992. Plasmids and bacterial resistance. Em: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation, 2 ed., Russel AD, Hugo WB & Ayliffe GAJ (eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford. p 225-229.
- Russel AD & Day MJ 1996. Antibiotic and biocide resistance of bacteria. *Microbios* 85: 45-65.
- Russel AD 1995. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Int Biodeterior Biodegrad* 36: 247-265.
- Santegoeds CM, Ferdelman TG, Muyzer G & De Beer D 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 64: 3731-3739.
- Santos LCB & Melo BA 1981. Estudo da atuação de um derivado do Juá sobre a placa bacteriana. *Revista Odonto-estomacológica* 22: 28-29.
- Sasaki H 1997. Microbiologically influenced corrosion. *Corrosion Engineering* 46: 557-566.
- Schierholz JM, Beuth J, König D, Nürnberger A & Pulverer G 1999. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289: 165-177.
- Scholten MCTh, Karman CC & Huwer S 2000. Ecotoxicological risk assessment related to chemicals and pollutants in off-shore oil production. *Toxicology Letters* 112-113: 283-288.

- Siegele DA & Kolter R 1992. Life after log. *J Bacteriol.* 174: 345-348.
- Slack MPE & Nichols WW 1981. The penetration of antibiotics through sodium alginate and through the exopolysaccharide of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 11: 502-503.
- Slack MPE & Nichols WW 1982. Antibiotic penetration through bacterial capsules and exopolysaccharides. *Antimicrob Agents Chemother* 10: 368-372.
- Stein AA 1993. MIC treatment and prevention. Em: A practical manual on microbiologically influenced corrosion. Kobrin G (ed), NACE International, Houston, p 101-112.
- Stewart PS, Grab L & Diemer JA 1998. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *J Appl Microbiol* 85: 495-500.
- Stoodley P, Boyle JD, DeBeer D & Lappin-Scott M 1999. Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling* 14(1): 75-90.
- Stoodley P, De Beer D & Lewandowski Z 1994. Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol* 60: 2711-2716.
- Suci PA, Mittelman MW, Yu FU & Geesey GG 1994. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2125-2133.
- Surinach PP 1986. A new concept of treating surfaces exposed to oilfield water systems. Em: Antibiofoulants. Hoechst Ag. (ed). Págs. 1-27.
- Sutherland IW, Skillman LC & Hughes KA 1999. Polysaccharides in biofilms and their interactions with phage and antimicrobials. Em: Biofilms: the good, the bad and the ugly. Wimpenny J, Gilbert P, Walker J, Brading M & Bayston (eds), Bioline, Cardiff, p 179-187.
- Sutherland IW 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 10: 243-270.

- Tatnall RE 1993. Introduction. Em: A practical manual on microbiologically influenced corrosion. Kobrin G (ed), NACE International, Houston, p 1-9.
- Tiller AK 1983. Aspects of microbial corrosion. *Appl Sci Publ* 115-159.
- Tiller AK 1983. Aspects of microbial corrosion. *J Corrosion Processes*. Parkins RN (ed), p 115-159.
- Turakhia MH, Cooksey KE & Characklis WG 1983. *Appl Environ Microbiol* 46: 1236.
- Vees RW, Anderson RL, Carr JH Bond WW & Favero MS 1993. The colonization of solid surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *J Appl Bacteriol* 74: 215-221.
- Videla HA 2000. An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments. *Biofouling* 15 (1-3): 37-47.
- Videla HA, Swords C, Edyvean RGJ & Beech IB 1999. Comparative study of the corrosion product films formed in biotic and abiotic media. *Corrosion / 99*, paper n°. 163, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Videla HA, Guiamet PS, Viera MR, Gómez de Saravia SG & Gaylarde CC 1996. A comparison of the action of various biocides on corrosive biofilms. *Corrosion / 96*, paper n°. 286, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Videla HA, Guiamet PS, Sautú AE, Gómez de Saravia SG, de Mele MFL, Gaylarde CC & Beech IB 1991. Impact of glutaraldehyde on biofouling and MIC of different steels. A laboratory assesment. *Corrosion / 91*, paper n°. 105, National Association of Corrosion Engineers, Houston, Texas.
- Watkins BL & Costerton JW 1984. Growth and biocide resistance of bacterial biofilms in industrial systems. *Chemical Times & Trends* 23: 35-40.
- Wang KS, Resch R, Dunn K, Shuler P, Tang Y, Koel BE & Yen TF 1999. Dissolution of the barite (001) surface by the chelating agent DTPA as studied with non-contact atomic

force microscopy. *Colloids and Surfaces* 160: 217-227.

Whitfield C 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol* 34: 415-420.