



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**



*Gabriela de Melo Franco*

**ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A  
TORRES DE RESFRIAMENTO DE UMA  
REFINARIA DE PETRÓLEO**

Belo Horizonte  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

*Gabriela de Melo Franco*

**ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A  
TORRES DE RESFRIAMENTO DE UMA  
REFINARIA DE PETRÓLEO**

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte  
2013

Dedico este trabalho aos meus pais, aos verdadeiros amigos, aos companheiros de laboratório e à minha orientadora.

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho seria impossível de ser concluído se não fosse pelo apoio, paciência, suporte e ajuda das pessoas que me rodeiam.

Agradeço aos meus pais pelo apoio, pelos sábios conselhos e pela motivação para que eu seguisse sempre em frente;

Obrigada, meus amigos e companheiros de sala, Aline Afonso, Luciana Madeira, Mateus Otoni, Fernanda Cristina, Dayane Nunes, Natália Anício, Isabel Sabino, Cristiano Cambraia, entre outros, pelo compartilhamento dos momentos difíceis e conversas;

Obrigada aos outros amigos, Livia Gonzaga, Kleiton Rainer, Marlúcia Mendes, Péricles Fernandes, Victor Fernandes, Francisco Wagner, Mariana Castro, Thaís Nascimento, Rodrigo Campolina, Gabriel Lopes, Felipe Butcher, Luciano Antonacci, entre outros, pelo apoio infundado e sempre me encherem de pensamentos positivos e me encorajarem a continuar, pelos conselhos e pela paciência;

Agradecimento especial aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Aline Julio, Vitor Domingues, Spencer Santos, Rafael Mendonça, Irary Mesquita, Natália Oliveira, Daniel Bonoto, Marcus Vinicius, Fernanda Fraga, Alessandra Resende, entre outros, pois tudo o que eu aprendi em um laboratório de Microbiologia, na prática, eu devo a vocês;

Obrigada aos funcionários do departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais;

Obrigada aos funcionários da refinaria de petróleo;

Obrigada à professora Doutora Vera Lúcia dos Santos pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos e paciência;

Por último, mas não por ser menos importante, agradeço à Deus, pois nada disso seria possível sem a fé que possuo Nele.

## RESUMO

Biofilmes são comunidades complexas de micro-organismos aderidos a superfícies. Sistemas de resfriamento de água fornecem um ambiente aquático ideal para a multiplicação dos micro-organismos, aumentando o risco da ocorrência de corrosão microbiologicamente induzida e o decréscimo da eficiência do resfriamento. Portanto, a avaliação de biofilmes em superfície de metal é essencial para compreender o processo de corrosão e desenvolver alternativas para reduzir esse problema. O presente estudo teve como objetivo comparar a formação de biofilme em superfícies de aço carbono, aço inoxidável e vidro. Esses materiais foram inseridos verticalmente em bacias de água de torres de resfriamento de uma refinaria de petróleo e removidos após diferentes intervalos de tempo para quantificar bactérias aeróbias heterotróficas totais, bactérias nitrificantes, bactérias oxidantes de ferro, *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias redutoras de sulfato e fungos. Três cupons de aço inoxidável, biocupons de aço carbono e lâminas de vidro foram removidos da bacia, mergulhados em água destilada para a remoção de células não aderidas e transferidos para frascos contendo solução salina estéril. Os frascos foram submetidos a banho de ultrassom para remoção do biofilme. A suspensão resultante foi serialmente diluída e inoculada em meios de cultura para o isolamento dos micro-organismos mencionados. Amostras da água da torre também foram examinadas. Em conjunto, três cupons e lâminas foram utilizados para a verificação da biomassa seca do biofilme. Esses materiais foram lavados em água destilada e mergulhados em metanol para a fixação da microbiota aderida, secos em estufa, pesados em balança analítica, lavados, secos e pesados novamente. A população planctônica de BHT e *P. aeruginosa* variou entre  $1,45 \times 10^3$  e  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL. As análises demonstraram que as contagens de BHT foram maiores na superfície de aço carbono, seguido por vidro e aço inoxidável. Os materiais foram rapidamente colonizados por micro-organismos (3 dias). Os biofilmes nas superfícies se tornaram estáveis no período de 21 dias, exceto para aço carbono, onde as populações microbianas alcançaram nível máximo aos 10 dias. Não houve crescimento de BRS, e as bactérias oxidantes de ferro e nitrificantes tiveram ocorrências pontuais e em baixos níveis. Os testes para biomassa mostraram crescimento da microbiota até o período de 7 dias para todos os materiais (0,0006g para lâminas e 0,0003g para cupons), decaindo nas amostras seguintes. Foi possível concluir que biofilmes não aderem da mesma forma em diferentes materiais, sendo necessário selecionar o material adequado para minimizar a possibilidade de desenvolvimento de biofilme associado ao sistema de torres de resfriamento e o desenvolvimento de metodologias mais simples para o monitoramento na indústria.

**Palavras-chave:** Biofilme, torre de resfriamento, biocorrosão, biomassa seca

## ABSTRACT

Biofilms are complex communities of microorganisms attached to surfaces. Cooling water systems provide ideal aquatic environment for the microorganism multiplication, increasing the risk of occurrence of microbiologically influenced corrosion, and decreasing the efficiency of a heat exchanger. Therefore, evaluation of biofilms on metal surfaces is essential to understand the corrosion process and to develop alternatives that will minimize this problem. The current study aimed to compare biofilm formation in carbon steel, stainless steel and glass surfaces. Those materials were inserted vertically into water basins in a cooling tower of a petroleum refinery, and removed after different time intervals to quantify total aerobic heterotrophic bacteria, nitrifying bacteria, iron bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, sulfate-reducing bacteria and fungi. Three stainless steel coupons, carbon steel bio coupons and glass slides were removed from the basin, dip-rinsed in distilled water to remove unattached cells and transferred into flasks containing sterile saline. The flasks were subjected to ultrasonic bath for biofilm removal. The resulting suspensions were serially diluted and inoculated culture media to isolate the microorganisms mentioned before. Samples of water from the water basins also were examined. Also, three coupons and glass slides were utilized to verify the dry biomass of the biofilm. Those materials were too dip-rinsed in distilled water to remove unattached cells and next in methanol to fix the cells, dried in a heater, weighed on an analytical balance, washed, dried and weighed again. The planktonic populations of AHB and *P. aeruginosa* varied between  $1.45 \times 10^3$  and  $3 \times 10^4$  CFU/mL. The analysis demonstrated that AHB counts were higher on the carbon steel surface, followed for glass and stainless steel. The materials were rapidly colonized by microorganisms (3 days) The biofilms on surfaces reached steady state at 21 days, except for carbon steel, where microbial populations reached maximum level at 10 days. There was no growth of SRB, and IB and NIT occurrence were punctual and at low levels. The biomass tests demonstrated maximum microbial growth at the 7<sup>th</sup> day to both materials (0.0006g to glass slides and 0.0003g to coupons), decreasing on the next samples. It could be concluded that biofilms do not attach in the same way in different materials, being necessary the selection of the suitable material to minimize the possibility of biofilm development associated with the operation of cooling tower systems and new methodologies simpler to be used in the industry.

**Key Words:** Biofilm, cooling tower, biocorrosion, dry biomass

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT .....	V
SUMÁRIO .....	VI
LISTA DE SIGLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE EQUAÇÕES .....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 BIOFILMES EM PROCESSOS INDUSTRIAIS E BIOCORROSÃO .....	20
1.2 ÁGUA DE REUSO .....	23
1.3 BACTÉRIAS NITRIFICANTES .....	25
1.4 BACTÉRIAS OXIDADORAS DE FERRO .....	26
1.5 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO.....	27
1.6 Pseudomonas sp. ....	27
1.7 Legionella sp.....	28
1.8 FUNGOS.....	28
2 JUSTIFICATIVA.....	29
2 OBJETIVOS .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
3 METODOLOGIA .....	31
3.1 TORRE DE RESFRIAMENTO DE ÁGUA.....	31
3.2 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA .....	31

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E TRANSPORTE.....	33
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO .....	36
3.3.1 Bactérias Heterotróficas Totais, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Legionella</i> sp. e Fungos .....	36
3.3.2 Bactérias Nitrificantes e Oxidantes de Ferro .....	37
3.3.3 Bactérias Redutoras de Sulfato .....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1 QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA SÉSSIL ASSOCIADA AOS DIFERENTES CORPOS DE PROVA.....	40
4.2 MICROBIOTA PLANCTÔNICA.....	45
6 CONCLUSÕES .....	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXO I.....	55

## **LISTA DE SIGLAS**

A - Área do Corpo de Prova

BHT - Bactérias Heterotróficas Totais

BRS - Bactérias Redutoras de Sulfato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTI - Estação de Tratamento de Resíduos Industriais

EPS - Extracelular Polymeric Substance

FD - Fator de Diluição

Mg - miligramas

MIC - *Microbiological Induced Corrosion*

N - Quantidade de Corpos de Prova

NMP - Número Mais Provável

pH - Potencial Hidrogeônico

PVC - Polyvinyl Chloride

QS - Quorum Sensing

RNA - Ribonucleic Acid

TSA - Tryptone Soy Agar

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

Vi - Volume do Inoculo

VT - Volume Total

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de biofilme de acordo com o tempo (PEREIRA, 2001) .....	16
Figura 2: Ilustração das principais etapas da formação do biofilme.....	18
Figura 3: Esquema de uma torre de resfriamento .....	21
Figura 4: Posicionamento das lâminas de vidro e cupons de aço inox foram alocados nas torres de resfriamento. ....	32
Figura 5: Sistema de árvore montado em refinaria de petróleo para monitoramento de biofilme em biocupons de aço carbono .....	33
Figura 6: Imagens dos corpos de prova.....	33
Figura 7: Desenho esquemático do processamento das amostras coletadas. ....	35
Figura 8: Caldo Citrato Férrico Amoniacal.....	39
Figura 9: Densidade de <i>Legionella</i> séssil removidos dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias .....	40
Figura 10: Densidade de bactérias heterotróficas totais séssil removidos dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias.....	41
Figura 11: Densidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> séssil removidos dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias..	41
Figura 12: Densidade fungica séssil removida dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias .....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Densidade de ferrobactérias e Nitrosomonas associada aos biofilmes removidos dos corpos de prova expressos em NMP/cm<sup>2</sup>.....44

Tabela 2: Densidade de *Nitrobacter* e bactérias redutoras de sulfato associada aos biofilmes removidos dos corpos de prova expressos em NMP/cm<sup>2</sup> .....45

## **LISTA DE EQUAÇÕES**

Equação 1: Determinação das unidades formadoras de colônia por  $\text{cm}^2$  .....37

Equação 2: Determinação das unidades formadoras de colônia por mL. ....37

# 1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos não vivem como colônias isoladas de células, como são vistos em laboratório e preparos de microscopia, mas se acumulam em superfícies para formar agregados polimicrobianos, os biofilmes (FLEMMING & WINGENDER, 2010; TORTORA *et al.*, 2005). O biofilme consiste de células imobilizadas em um substrato e frequentemente incorporadas em uma matriz polimérica orgânica de origem microbiana, ou como comunidades de micro-organismos que se aderem a superfícies submersas em ambientes aquosos (CHARACKLIS & MARSHALL, 1989; O'TOOLE *et al.*, 2000, BEECH, 2004), em interfaces sólido-líquido, líquido-líquido, líquido-ar e sólido-ar (PEREIRA, 2001).

O substrato, ou superfície, pode ser de origem não-biológica, como dentes, válvulas cardíacas artificiais, parede interna de um canos de água (PALMER & WHITE, 1997; DONLAN, 2002), ligas metálicas, cerâmica, polímeros sintéticos (STEPHENS, 2002), paredes e monumentos de pedra, minas, cavernas (COOMBS *et al.*, 2010) e instrumentos médicos, como cateteres (RAMAGE *et al.*, 2012), ou de origem biológica, como tecidos da cavidade oral (PALMER & WHITE, 1997), ferimentos e epitélios de plantas e animais (STEPHENS, 2002), válvulas coronárias e articulações (ESTRELA *et al.*, 2009; RAMAGE *et al.*, 2012) (). Os primeiros estudos sobre biofilmes datam do século XVII, quando Antonie van Leeuwenhoek observou ao microscópio minúsculos seres, descritos como “animaculos” em placas nos próprios dentes (DOLAN & COSTERTON, 2002). Sabe-se que, apesar de biofilmes serem formados principalmente por bactérias, grande parte dos biofilmes encontrados na natureza inclui organismos eucariotos, como fungos, algas e protozoários (PALMER & WHITE, 1997), além dos vírus (CHARACKLIS *et al.*, 1990).

Os biofilmes podem conter uma única ou várias espécies microbianas. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, (O'TOOLE *et al.*, 2000), *Candida albicans*, *Coccidioides*, *Aspergillus* e *Cryptococcus neoformans* (RAMAGE *et al.*, 2011) podem formar biofilmes compostos por uma única espécie e estão mais relacionados a infecções humanas (endocardite associada a estreptococos, e fibrose cística a *P. aeruginosa*). Aqueles compostos por múltiplas espécies

estão presentes na maior parte dos ambientes (O'TOOLE *et al.*, 2000; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

A maior parte da biomassa de biofilmes microbianos na natureza é constituída por bactérias heterotróficas. Sua principal fonte de nutriente é o carbono, que pode ser proveniente de quatro fontes potenciais: (1) o filme condicionante; (2) componentes do próprio biofilme; (3) a superfície em que se encontra; e (4) a matéria orgânica dissolvida, proveniente do meio circundante (MELO & AZEVEDO, 2008). O filme condicionante é uma fina camada de compostos orgânicos e íons inorgânicos que estão dissolvidos no ambiente aquoso, sendo formado minutos após a imersão do substrato, nesse tipo de ambiente, e se desenvolve por algumas horas após esse início (MELO & AZEVEDO, 2008). Esse filme altera as propriedades físico-químicas, cargas eletrostáticas e a molhabilidade (tendência do líquido se espalhar ou aderir a superfícies sólidas) das superfícies, facilitando futuras colonizações por bactérias e, após pouco tempo, o aumento de micro-organismos e a produção de matriz extracelular resultam em um biofilme maduro (DONLAN, 2002; VIDELA & HERRERA, 2005; MELO & AZEVEDO, 2008). Outros fatores que afetam o desenvolvimento de biofilmes são: pH, temperatura, força iônica do meio, velocidade do escoamento do líquido, qualidade e concentração de nutrientes do meio líquido circundante, características dos micro-organismos, material e rugosidade do substrato, presença de material particulado, presença de micro-nutrientes e agentes antimicrobianos (CHARACKLIS & MARSHAL, 1989; VIEIRA & MELO, 1995; BOTT, 1996). Em sistemas industriais, os seguintes fatores afetam o crescimento de biofilmes: a disponibilidade de nutrientes mostra efeito sobre a espessura do biofilme formado, sendo que quanto maior a quantidade de nutrientes, a estrutura do biofilme será mais aberta e quanto menor, a estrutura será mais compacta; a velocidade e turbulência dos líquidos afetam tanto a espessura quanto a densidade do biofilme formado; a temperatura de aproximadamente 40°C, encontrada em torres de resfriamento, é ideal para o desenvolvimento de biofilme; as condições da superfície do substrato, como os níveis de rugosidade, afetam a habilidade de aderência dos micro-organismos; e, as partículas inorgânicas presentes no meio, como areia e ferro (como consequência da corrosão do metal), são incorporadas pela matriz orgânica e podem alterar a estrutura e atividade do biofilme (MELO & BOTT, 1997). Os biofilmes são constituídos por

células microbianas e seus produtos, solutos, partículas inorgânicas, substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (CHARACKLIS & MARSHALL, 1989), água, partículas adsorvidas e retidas (FLEMMING, 1993), além de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas (VIANA, 2009). A matriz orgânica se faz necessária para prender os componentes inorgânicos e formar um depósito (CHARACKLIS & MARSHALL, 1989).

A EPS é o componente que forma o esqueleto da estrutura tridimensional do biofilme e consiste de lipídeos, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos (DNA ou RNA), substâncias húmicas, fosfolipídeos, glicoproteínas e ácidos urônicos sendo que a quantidade dessas macromoléculas e sua síntese são variáveis de acordo com as espécies bacterianas, condições de crescimento do biofilme e propriedades químicas e físicas (SUTHERLAND, 2001; BEECH, 2004; VIANA, 2009; FLEMMING & WINGENDER, 2010). As EPSs estão envolvidas na biocorrosão de superfícies metálicas, como aço inoxidável, cobre e aço carbono (BEECH, 2004). Ela também facilita a adesão bacteriana a superfícies biológicas e sintéticas (LUTZ, 2010), promovendo a coesão do biofilme, imobilizando suas células, mantendo-as unidas, permitindo as interações entre si e a comunicação célula-célula, o que pode servir como fonte de nutriente e proteger os micro-organismos contra dessecação, oxidação, ação de biocidas (agentes químicos e físicos), cátions metálicos e radiação ultravioleta (VIANA, 2009; FLEMMING & WINGENDER, 2010).

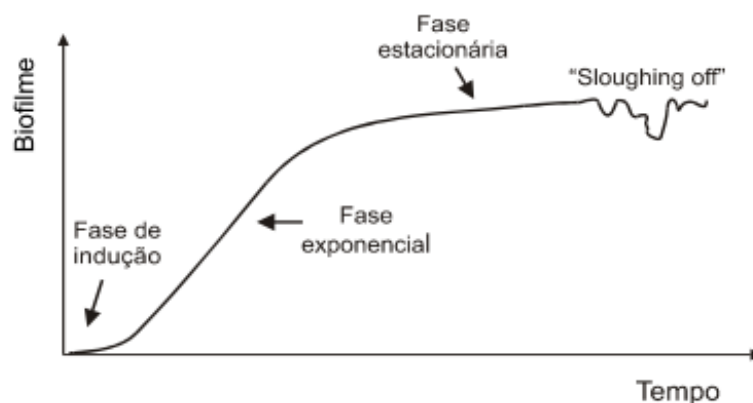
Vários biocidas são menos eficientes contra micro-organismos sésseis do que de vida livre (planctônicos) (LUDENSKY, 2003). Lucchesi (2012) informou que a concentração de agente ativo necessário para a erradicação do biofilme é de 100 a 1.000 vezes maior do que a requerida para o controle de células planctônicas. A tolerância de biofilmes aos antimicrobianos, combinado com sua arquitetura complexa e natureza dinâmica, dificulta a sua quantificação, monitoramento e controle (LUDENSKY, 2003). Além da resistência a antimicrobianos, a formação de biofilmes proporciona outros benefícios aos micro-organismos, como: aumento da concentração de nutrientes; proteção contra fatores ambientais agressivos; capacidade para estabelecer e colonizar nichos ecológicos; facilidade no desenvolvimento de relações simbióticas (PEREIRA, 2001), mutualísticas, comensais, antagonistas e saprofitas (LUCCHESI, 2012); e, aumenta a possibilidade de troca de

material genético, principalmente por plasmídeos (LUCCHESI, 2012). Na maioria dos biofilmes, a biomassa seca de micro-organismos é menor que 10%, enquanto os outros 90% são constituídos por matriz extracelular (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Uma propriedade importante desses exopolímeros é sua habilidade para se complexar com íons metálicos e em alguns sistemas experimentais, as células bacterianas colonizam materiais como vidro, aço inoxidável, aparas de madeira, espumas reticuladas e cloreto de polivinilo (PVC) para formar biofilmes (BEECH, 2004).

O mecanismo de formação e desenvolvimento do biofilme é um processo complexo, dinâmico e envolve várias etapas, começando com células individuais se aderindo a um substrato e depende da presença, além dos próprios micro-organismos, da disponibilidade de nutrientes, fonte de energia e água (PALMER & WHITE, 1997; STEPHENS, 2002; COOMBS et al., 2010; LUTZ, 2010). Seu crescimento é considerado resultado de um complexo processo que envolve transporte de moléculas orgânicas e inorgânicas e células microbianas à superfície, adsorção das moléculas à superfície do substrato (formação do filme condicionante) e a aderência inicial dos micro-organismos envolvidos, seguido da adesão irreversível, que é facilitada pela produção de EPS (BEECH, 2004). Contudo, os biofilmes não são formados ao acaso, mas sim estruturados de acordo com o ambiente que os rodeia, condições nutricionais e processos metabólicos; são dinâmicos, mas respeitam sua estrutura e composição (JAYARAMAN & WOOD, 1998).

A colonização bacteriana segue os seguintes estágios: (a) transporte de células para o substrato (VIDELA & CHARACKLIS, 1992); (b) adesão da célula ao substrato; (c) adesão irreversível mediada pelo EPS (SANTANA et al., 2012); (d) crescimento e outros processos metabólicos; e (e) desagregação de partes do biofilme (VIDELA & CHARACKLIS, 1992).

Pereira (2001) informou que a formação do biofilme é um processo natural que resulta de um balanço entre processos físicos, químicos e biológicos ocorrendo simultaneamente, podendo ser ilustrado na figura 1:



**Figura 1:** Formação de biofilme de acordo com o tempo (PEREIRA, 2001)

A fase definida como “sloughing off” se refere ao desprendimento de células do biofilme.

Videla e Characklis (1992) descreveram os seguintes passos para a formação de biofilme:

1 - Moléculas orgânicas são transportadas para o substrato, onde algumas vão adsorver, formando um substrato condicionado, ou o filme condicionante (PEREIRA, 2001);

2 - Uma fração dos micro-organismos planctônicos (VIDELA E CHARACKLIS, 1992) e outras partículas do meio aquoso são transportadas para o substrato condicionado (PEREIRA 2001). Esse processo ocorre nas seguintes etapas:

2.1 - Ocorre a colisão de algumas células com esse substrato e as mesmas são adsorvidas por uma fração de tempo e em seguida são desagregadas. Esse processo é chamado adesão reversível (VIDELA & CHARACKLIS, 1992). A adesão é controlada por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionante formado (CAPELLETTI, 2006) e é comumente induzida por sinais do ambiente como alterações na concentração de nutrientes, oxigênio, pH e temperatura (LUTZ, 2010);

2.2 - A dessorção pode resultar da força de cisalhamento do fluido, mas outros fatores químicos, físicos ou biológicos também podem influenciar esse processo.

Cisalhamento é o termo utilizado quando o líquido é submetido a condições dinâmicas (AMORIM, 2003);

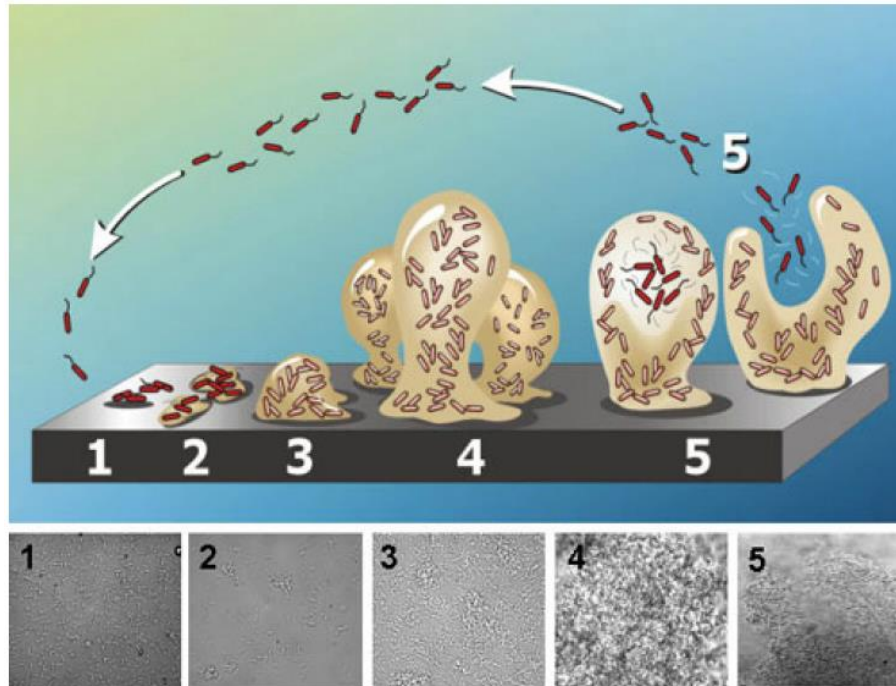
2.3 - Uma fração das células adsorvidas (na adesão reversível) permanece imobilizada por um longo tempo e essa adesão se torna irreversível (VIDELA & CHARACKLIS, 1992). À medida que ocorre a multiplicação bacteriana e aumento da aderência de microorganismos, é desencadeada a formação de EPS, estabelecendo, assim, o biofilme (LUTZ, 2010). Uma vez que as células estão aderidas ao substrato, o crescimento começa a ocorrer e microcolônias são formadas (PALMER & WHITE, 1997).

3 - As células aderidas multiplicam utilizando o substrato e os nutrientes presentes na água, aumentando assim a densidade celular do biofilme. Ocorre também o transporte de nutrientes da fase aquosa para a superfície e para o interior do biofilme (PEREIRA, 2001). Esse seria o primeiro estágio de maturação do biofilme, quando os agregados celulares são produzidos de forma progressiva em camadas, com uma espessura maior do que 10 $\mu$ m (LUTZ, 2010);

4- Outras células e particulados também aderem ao biofilme, aumentando seu tamanho (VIDELA & CHARACKLIS, 1992). O segundo estágio de maturação do biofilme é quando este alcança uma espessura maior do que 100 $\mu$ m (LUTZ, 2010).

5- Porções do biofilme são desagregadas, retornando ao sistema aquoso (VIDELA & CHARACKLIS, 1992). Segundo Lutz (2010), nesse estágio, as bactérias desenvolvem o fenótipo planctônico e por esse motivo deixam o biofilme.

A desagregação se refere a perda de material do biofilme e a dessorção à perda de células e material do substrato. A maturidade e morte do biofilme são difíceis de serem determinados *in vivo*, seu desenvolvimento é constante e depende das condições ambientais (PALMER & WHITE, 1997). Bott (1993) mostra as cinco principais fases do desenvolvimento do biofilme (figura 2).



**Figura 2:** Ilustração das principais etapas da formação do biofilme: (1) formação do filme condicionante; (2) adesão de micro-organismos e partículas da água; (3) produção de EPS; (4) desenvolvimento do biofilme; e (5) desagregação de células do biofilme. (VIANA, 2009).

A formação do biofilme depende também de um mecanismo denominado *quorum-sensing* (QS), que é a capacidade que os micro-organismos tem de se comunicar e coordenar seu comportamento através de sinais moleculares (VIANA, 2009; LUTZ, 2010). Em outras palavras, é a sinalização entre as células (ANNOUS *et al.*, 2009). Esse sistema funciona através da secreção e detecção de moléculas autoindutoras que se acumulam na célula de forma a ser um sinal dependente de densidade que é produzido pela bactéria (NADELL *et al.*, 2008; ANNOUS *et al.*, 2009). Essas moléculas se ligam aos reguladores da transcrição quando as populações bacterianas atingem os limites do *quorum* e é seguido pela ativação ou repressão dos genes alvo (ANNOUS *et al.*, 2009). Quando as concentrações desses autoindutores alcançam o limite, o sistema QS responde permitindo as células alterar seu comportamento, cujo benefício depende da presença ou ausência de outras células (NADELL *et al.*, 2008). O QS apresenta diversas respostas benéficas para a população bacteriana, incluindo a melhoria ao acesso a nutrientes e a nichos mais favoráveis, além disso, aumenta a ação contra competidores e ambientes estressantes (ANNOUS *et al.*, 2009). São exemplos de processos mediados pelo sistema *quorum-sensing*: simbiose, transferência de plasmídeos

via conjugação, síntese de peptídeos antimicrobianos, formação de biofilme (ANNOUS *et al.*, 2009), aderência a superfícies, produção de polímeros extracelulares, síntese de biosurfactantes, esporulação, competência, bioluminescência, secreção de fatores sequestrantes de nutrientes e fatores de virulência (NADELL *et al.*, 2008).

Biofilmes são muito comuns na biosfera (COOMBS *et al.*, 2010) e é provável que eles compreendam a grande maioria da biomassa microbiana da biosfera. Costerton e colaboradores (1987) afirmaram que cerca de 90% dos micro-organismos do planeta existem sob a forma de biofilme, predominando em diversos ambientes e ecossistemas, desde ambientes ácidos até os desertos de gelo da Antártica (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

A participação dos micro-organismos nos mais diferenciados casos de corrosão tem estimulado o interesse pelo entendimento do seu papel neste processo. Entretanto, na prática, o monitoramento e a avaliação de procedimentos para testes de controle de biofilme no campo ainda são baseados nas formas planctônicas. Mesmo sabendo que muitos micro-organismos estão associados a superfícies dos sistemas industriais, os mesmos têm recebido menos atenção que seus homólogos planctônicos, tornando essencial o monitoramento e controle da formação do biofilme (ALMEIDA *et al.*, 2002; LUDENSKY, 2003; TÜRTGEN *et al.*, 2004).

Contudo, biofilmes não são apenas prejudiciais aos humanos: sistemas de tratamento de águas residuárias e instalações de processamento de lodo ativado devem sua eficiência aos biofilmes (PALMER & WHITE, 1997). Esses sistemas utilizam micro-organismos para mineralizar poluentes orgânicos, transformando-os em compostos inertes ou não tóxicos (SILVA *et al.*, 2010). Na natureza, os biofilmes desempenham papéis cruciais nos ecossistemas e nos ciclos de nutrientes (ciclos do azoto, enxofre, fósforo, etc.) (PEREIRA, 2001). Na indústria alimentícia a produção de ácido cítrico é um exemplo tradicional da sua utilização e também em processos biotecnológicos, como a produção de vinagre (PEREIRA, 2001).

## **1.1 BIOFILMES EM PROCESSOS INDUSTRIAIS E BIOCORROSÃO**

É praticamente impossível falar sobre problemas relacionados aos biofilmes na indústria de uma forma geral (LUDENSKY, 2003). Suas propriedades variam de acordo com as especificações dos processos tecnológicos onde ocorrem, assim como os fatores ambientais tais como a superfície dos materiais, condições nutricionais, hidrodinâmica, fontes da contaminação microbiológica, distribuição das espécies, entre outros (LUDENSKY, 2003).

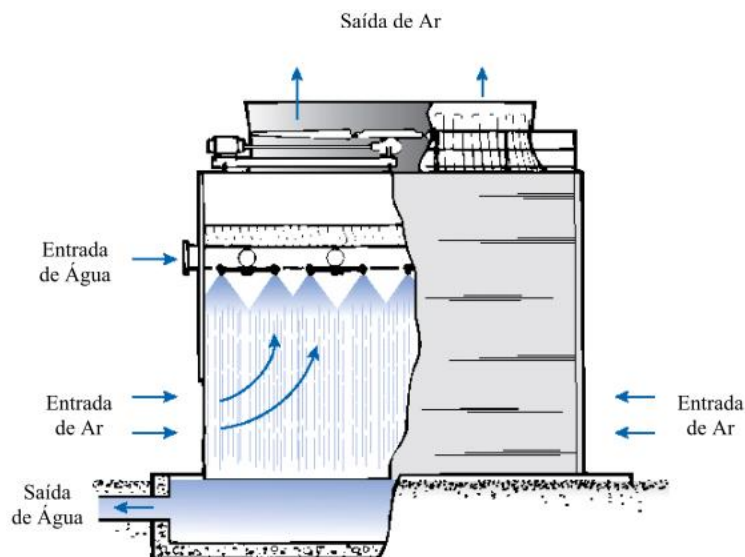
Biologistas industriais que lidam com problemas relacionados com biofilmes em campo os culpam pela maior parte dos problemas microbiológicos nos processos industriais e sabe-se que os biofilmes causam mais problemas aos processos tecnológicos que os micro-organismos planctônicos (LUDENSKY, 2003). Portanto, o monitoramento e controle do biofilme é uma tarefa desafiadora para a indústria (LUDENSKY, 2003).

A corrosão é um tipo de deterioração que pode ser facilmente encontrada em estruturas metálicas presentes em ambientes aquosos. A biocorrosão refere-se a corrosão influenciada pela presença e /ou atividade metabólica de micro-organismos em uma superfície metálica, alterando a química da interface entre o metal e o fluido (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004; ANUNZIATO, 2008). A biocorrosão ocorre quando um complexo de diferentes tipos de micro-organismos interage com a superfície metálica, polimérica e concreto influenciando a corrosão através dos seus produtos metabólicos, como, por exemplo, o EPS (FANG *et al.*, 2002; BEECH, 2004; JAN-ROBLERO *et al.*, 2004). Esta corrosão influenciada por micro-organismos (MIC) representa mais de 20% das corrosões de sistemas industriais, sendo de grande preocupação na indústria de óleo e gás (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004; TÜRTGEN, 2004; KAKOOEI *et al.*, 2012). Segundo Videla & Characklis (1992), os biofilmes afetam a interação entre superfícies metálicas e o ambiente não somente em processos de biodeterioração, como a biocorrosão, mas também em muitos outros processos biotecnológicos aplicados a recuperação e manuseio.

Torres de resfriamento são parte integrante de processos industriais como usinas de energia, sistemas de condicionamento de ar, telecomunicação e refinarias de petróleo. As condições oferecidas por essas torres favorecem o crescimento microbiano e formação de

biofilme, levando a formação de depósitos nos equipamentos e a corrosão do sistema, causando perda na produção e aumento dos custos de manutenção (LUDENSKY, 2003; TÜRTGEN, 2004; TÜRTGEN *et al.*, 2010). No sistema de torre de resfriamento, o crescimento microbiano pode ser bastante alto devido a presença de nutrientes, temperaturas favoráveis, alto tempo de residência, grande proporção da área de superfície com o volume, etc., ou seja, torna-se o local ideal para o crescimento e multiplicação de organismos vivos, pois fornece ar, calor e luz (LUDENSKY, 2003; TÜRTGEN *et al.*, 2010). A população bacteriana nesses sistemas pode exceder um milhão de unidades formadoras de colônia por mililitro de água (UFC/mL), aumentando o risco de biocorrosão (DOĞRUÖZ *et al.*, 2009). Assim, o tratamento da água que circula nestes sistemas é essencial (LUDENSKY, 2003).

O tipo mais comum de torre de resfriamento é o úmido evaporativo, o qual é planejado para proporcionar um contato íntimo entre o ar e a água, para assim elevar a taxa de evaporação e o resfriamento da água remanescente (SOUZA, 2007). Neste tipo de torre, a água quente é bombeada para uma área de ventilação no topo da torre e distribuída uniformemente em contra-corrente com o ar (SOUZA, 2007). Esse tipo de torre está ilustrado na figura 3.



**Figura 3:** Esquema de uma torre de resfriamento. A água aquecida é gotejada na parte superior da torre e desce lentamente através de “enchimentos” de diferentes tipos, em contracorrente com uma corrente de ar frio (normalmente à temperatura ambiente). No contato direto das correntes de água e ar ocorre a evaporação da água, principal fenômeno que produz seu resfriamento. (SOUZA, 2007)

Os maiores impactos econômicos causados por biofilmes em sistemas de resfriamento são devido à perda de energia resultante do aumento da resistência de atrito da água e aumento da resistência da transferência de calor em condensadores de usinas e no processo de troca de calor, causando também perdas e quedas de energia (LUDENSKY, 2003; TÜRTGEN, 2004; DOĞRUÖZ *et al.*, 2009). A formação de biofilme na superfície de tubos de transferência de calor reduz expressivamente as taxas de transferência de calor, porque a condutividade térmica dos biofilmes é significativamente menor que a dos materiais metálicos (LUDENSKY, 2003). Outro impacto negativo da formação de biofilme inclui o aumento dos custos de excedente utilização da capacidade dos equipamentos e substituição prematura dos mesmos devido a biocorrosão, sem mencionar o tempo de inatividade não-programado devido a limpeza do equipamento que foi incrustado por micro-organismos, bem como problemas de saúde dos operários, incluindo casos relacionados a presença de *Legionella* (LUDENSKY, 2003).

Uma das grandes preocupações das áreas de engenharia, em geral, é a construção de equipamentos com materiais resistentes, principalmente, à corrosão, biocorrosão, dureza e ductilidade (propriedade física dos materiais de suportar a deformação) (LUCCHESI, 2012). A escolha do tipo de material para a fabricação de cada equipamento deve basear-se na especialidade de cada segmento industrial, evitando incompatibilidades entre produto e equipamento (LUCCHESI, 2012). Dentre os tipos de materiais cujo uso se destaca em processos industriais podem ser citados o vidro, os metais e as ligas metálicas (como o aço) e os polímeros (como o PVC) (BEECH, 2004; LUCCHESI, 2012).

Lucchesi (2012) aplicou um questionário em indústrias de diversos segmentos de norte a sul do Brasil para saber qual metal é o mais utilizado pela maioria das indústrias e verificou que o aço inoxidável, devido à sua resistência mecânica, à corrosão e facilidade de limpeza. Verificou também que o aço carbono prevalece nas indústrias do segmento de óleo de corte devido ao menor custo, embora seja mais susceptível à corrosão, além disso, que o vidro é o material mais utilizado no segmento farmacêutico e químico devido à facilidade de limpeza e baixa capacidade de troca iônica.

Na indústria, dentre os diversos tipos de vidros, a escolha é efetuada de acordo com sua utilização, principalmente, devido às características e propriedades obtidas através da alteração de seus componentes, podendo-se destacar sua resistência em ambientes corrosivos, a capacidade de não reagir com outros materiais, sua resistência térmica, ótica e acústica, a relativa facilidade de limpeza e a transparência (LUCCHESI, 2012).

O aço carbono consiste de ligas de ferro-carbono e suas propriedades mecânicas estão ligadas diretamente ao teor de carbono, normalmente inferior a 2,1% (LUCCHESI, 2012). O aço carbono é o metal mais comum, mais barato e mais versátil dentre os materiais metálicos (LUCCHESI, 2012). O aço carbono comum é utilizado em alguns tipos de conexões, canaletas, estruturas de fundações e tubulações e é amplamente utilizado na indústria petrolífera (KAKOOEI *et al.*, 2012; LUCCHESI, 2012).

O termo aço inoxidável é empregado para identificar aços contendo, no mínimo, 11% de cromo, o que garante aos mesmos uma elevada resistência à corrosão, pois a combinação do oxigênio do ar com o cromo do aço forma uma película na superfície da liga chamada de camada passiva que é extremamente fina, contínua, estável e muito resistente ao ataque de elementos provenientes do ambiente (LUCCHESI, 2012). Os aços austeníticos, um tipo de aço inoxidável, são utilizados para fins estruturais, em equipamentos para indústria alimentícia, aeronáutica, ferroviária, petrolífera, química e petroquímica, papel e celulose e na construção civil (KAKOOEI *et al.*, 2012; LUCCHESI, 2012).

Devido à suscetibilidade dos materiais metálicos ao fenômeno da biocorrosão, surge a necessidade do desenvolvimento de novos materiais que possuam uma resistência maior a formação de biofilme e conseqüentemente à biocorrosão (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004).

## **1.2 ÁGUA DE REUSO**

As refinarias de petróleo são grandes consumidoras de água, uma vez que o processo de refino consiste de uma série de etapas no melhoramento do petróleo, classificado como separação, ou os processos de conversão, que utilizam elevada quantidade de água e soluções aquosas (MELO & AZEVEDO, 2008; SILVA *et al.*, 2010). Dependendo do processo industrial, a água pode ser tanto matéria-prima, sendo

incorporada ao produto final, como um auxiliar no processamento de matérias-primas, fluido de transporte, fluido de aquecimento e/ou refrigeração ou nos processos de limpeza de equipamentos, etc. (POMBO, 2011). As unidades de dessalgação e resfriamento de uma refinaria são os setores que mais consomem água: cerca de 250 a 350 litros por barril processado (ou aproximadamente 2 litros de água por litro de óleo processado) (BARBOSA, 2007).

Os padrões de qualidade da água dependem de como ela será aplicada, podendo ser mais rigorosos, como no caso de indústrias alimentícias e farmacêuticas, ou menos rigorosos, como no caso de sistemas de resfriamento (POMBO, 2011). Em torno de 90% da vazão de água captada é utilizada em sistemas de resfriamento e em caldeiras e 10% em outras atividades, como combate ao incêndio e fins potáveis (HIGA *et al.*, 2007; POMBO, 2011). Essa situação contribui para piorar a poluição ambiental, com conseqüente risco à qualidade da água (HIGA *et al.*, 2007). Como conseqüência, regras estritas sobre o uso das fontes de água foram criadas no Brasil, levando os setores produtivos a racionalização de seu consumo (HIGA *et al.*, 2007). A Lei Federal nº 9.433/97, conhecida como Lei dos Recursos Hídricos, argumenta sobre o reconhecimento da água como um bem finito e vulnerável, e alerta para a necessidade de uma utilização preservacionista desse bem natural. A legislação para controle da qualidade e vazão de descarte de efluentes está cada vez mais rigorosa a fim de manter a qualidade dos recursos hídricos (HIGA *et al.*, 2007; SCHNEIDER, 2010). Assim, em função da disponibilidade hídrica a indústria de refino de petróleo enfrenta cada vez mais desafios para fazer com que o uso deste recurso cause menos impacto ao meio ambiente, procurando reduzir a vazão de efluentes gerados através do reuso de água (BARBOSA, 2007; HIGA *et al.*, 2007). Portanto, as refinarias brasileiras de petróleo devem se adequar aos padrões definidos na Lei Federal nº 9.433/97 antes do descarte dos efluentes aos corpos hídricos receptores (POMBO, 2011).

As refinarias de petróleo têm feito um esforço considerável para tratar seus efluentes, o que pode representar uma difícil tarefa devido a complexidade de sua composição química (SILVA *et al.*, 2010). O processamento do petróleo gera efluentes com altas concentrações de compostos tóxicos, os quais provocam danos ao meio ambiente.

Portanto, devem-se buscar formas de reduzir a presença destas substâncias nos efluentes da indústria de petróleo ou desenvolver processos que permitam a sua destruição. Todavia, efluentes tratados ainda podem apresentar compostos tóxicos, podendo tornar limitado o reuso da água (SCHNEIDER, 2010; SILVA *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, vários tipos de tratamento de efluentes industriais foram desenvolvidos e aperfeiçoados para que o reuso da água possa ser realizado (SCHNEIDER, 2010).

Uma alternativa que o setor industrial adotou para a redução da utilização de recursos hídricos foi a reutilização dos efluentes tratados, denominados água de reuso, que é o aproveitamento de águas previamente utilizadas (SCHNEIDER, 2010). A água de reuso na indústria pode ser aplicada em torres de resfriamento, na alimentação de caldeiras, na lavagem de peças, equipamentos, pisos e veículos, ou no próprio processo (SCHNEIDER, 2010).

### **1.3 BACTÉRIAS NITRIFICANTES**

Bactérias nitrificantes convertem amônia em nitrato via nitrito, processo referido como nitrificação, que é a oxidação biológica da amônia (EATON *et al.*, 2005; BUENO, 2011). Essas bactérias tem grande importância para o meio ambiente e agricultura (TORTORA, *et al.*, 2005). Esse grupo inclui espécies de diferentes formas, tais como bastonetes, vibriões, esféricos, espiralados e lobulares, e uma diversidade de tamanhos, que variam entre 0,3 e 11,7 $\mu$ m (EATON *et al.*, 2005). Esse grupo microbiano é aeróbio, gram-negativo, heterotrófico, quimiolitotrófico e tem grande importância nos sistemas de água residuárias (EATON *et al.*, 2005), pois auxilia na remoção de compostos nitrogenado do mesmo e na ciclagem de nitrogênio do meio.

As bactérias oxidadoras de amônia mais comumente isoladas são classificadas nos gêneros *Nitrospira* e *Nitrosomonas* e o gênero de bactéria oxidante de nitrato mais comumente identificado em amostras de água é o *Nitrobacter*, que são também os mais comumente encontrados em sistemas de lodos ativados (EATON *et al.*, 2005).

Dois grupos de bactérias nitrificantes são necessários para o processo completo de nitrificação: as bactérias do gênero *Nitrocabter* oxidam o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), e

as bactérias do gênero *Nitrosomonas* oxidam este nitrito, convertendo a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (EATON *et al.*, 2005; TORTORA, *et al.*, 2005; BUENO, 2011; NETO, 2011). Como este processo metabólico apresenta baixo rendimento em ATP, o crescimento desse grupo microbiano é muito mais lento que o da maioria das bactérias heterotróficas (EATON *et al.*, 2005).

As bactérias nitrificantes podem ocorrer em uma diversidade de habitats, incluindo água doce e marinha, solo, água salobra, águas residuárias e de abastecimento para consumo humano (EATON *et al.*, 2005). Em sistemas de águas residuárias, a nitrificação é um processo importante na remoção do nitrogênio amoniacal, que pode ser tóxico para algumas formas aquáticas (EATON *et al.*, 2005). Na agricultura, elas são de extrema importância devido ao fato de o nitrato ser a forma de nitrogênio encontrada no solo e utilizada pelas plantas (TORTORA *et al.*, 2005).

Essas bactérias são bastante sensíveis a fatores ambientais que podem influenciar diretamente em seu metabolismo de forma a interferir na taxa de crescimento e, como consequência, a taxa de oxidação da amônia (BUENO, 2011). Dentre os principais fatores, pode-se citar temperatura, pH, oxigênio dissolvido, nitrogênio, matéria orgânica, substâncias tóxicas e populações de bactérias heterotróficas e até nitrificantes (EATON *et al.*, 2005).

De maneira geral, os micro-organismos podem induzir a corrosão de metais (incluindo componentes das torres de resfriamento incluídas neste estudo) por suas atividades enzimáticas (hidrogenases, oxidação do ferro – ferrobactérias – e redução de outros metais, como o manganês, que pode ocorrer por *Pseudomonas*) e por seus produtos metabólicos, como sulfetos (bactérias redutoras de sulfato), ácidos inorgânicos (bactérias heterotróficas, ou o ácido nítrico por bactérias nitrificantes) ou ácidos orgânicos (fungos filamentosos e leveduriformes e bactérias heterotróficas) (SCHNEIDER, 2010).

#### **1.4 BACTÉRIAS OXIDADORAS DE FERRO**

As bactérias deste grupo oxidam compostos de ferro reduzido para obtenção de energia levando a sua precipitação como hidróxido de ferro ( $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ) (EATON *et al.*, 2005; GARCÍA-BALBOA *et al.*, 2009). Em sistemas de tubulação, esse ferro pode ser obtido do

encanamento, caso seja feito desse material, ou dos sais minerais provindos da própria água que circula na tubulação (EATON *et al.*, 2005).

### **1.5 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO**

As bactérias redutoras de sulfato (BRS), ou bactérias sulfurosas, são anaeróbias, não-patogênicas, oxidam ou reduzem enxofre inorgânico e apresentam grande diversidade morfológica e características bioquímicas. As BRS reduzem o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) em sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e utilizam lactato, acetato ou hidrogênio como doadores de elétrons e sulfato comoceptor final de elétrons na respiração anaeróbica (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004; EATON *et al.*, 2005; KAKOOEI *et al.*, 2012).

As BRS contribuem para a corrosão galvânica e para problemas de odor e sabor da água e são os micro-organismos mais estudados quando se diz respeito à biocorrosão, cuja participação nesse processo foi evidenciada há décadas atrás (EATON *et al.*, 2005; JAN-ROBLERO *et al.*, 2004). A produção do sulfeto de hidrogênio é a principal causa da corrosão, devido a despolarização do cátodo pelo consumo biológico do hidrogênio e produção de exopolímeros viscosos (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004).

As BRS são comumente detectadas em instalações industriais que produzem, armazenam e transportam petróleo e gás e estão relacionadas aos processos de biocorrosão dos mesmos. Portanto, grande parte das pesquisas tem focado nesse grupo bacteriano, apesar de estudos recentes sugerirem que outros tipos de bactérias também podem estar envolvidas nesse processo, incluindo as bactérias redutoras de metais e as metanogênicas (JAN-ROBLERO *et al.*, 2004).

### **1.6 *Pseudomonas* sp.**

*Pseudomonas* é um gênero amplo e complexo de bactérias que apresentam-se na forma de bacilos gram-negativos, aeróbios, que não esporulam, não fermentam glicose, são oxidase e catalase positivas e, geralmente, móveis com um ou muitos flagelos polares, incluindo espécies com implicações clínicas e ambientais e são muito comuns no solo e ambientes naturais (TORTORA *et al.*, 2005; LUTZ, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* serve

como exemplo para ambos os casos: pode formar biofilmes nos pulmões, causando a fibrose cística (LUTZ, 2010) e em sistemas de tratamento de águas residuais (MERWE, 2008).

### **1.7 Legionella sp.**

A família Legionellaceae é composta por um único gênero, *Legionella*, e mais de 35 espécies diferentes (EATON *et al.*, 2005). Esses micro-organismos são aeróbios, gram-negativos, não formam esporos e possuem flagelo e, com exceção de *L. oakridgensis*, todas as espécies necessitam de cisteína e sais de ferro para o crescimento (EATON *et al.*, 2005). Estudos epidemiológicos mostraram que esses micro-organismos podem ser transmitidos através do ar e que são ubíquos em muitos ambientes (EATON *et al.*, 2005).

Surtos de legionelose reportados tiveram como reservatório os biofilmes formados em sistemas de tubulações de água potável, em sistemas de resfriamento de água (TÜRTGEN, 2004; EATON *et al.*, 2005) em sistemas de suprimento de água quente em hospitais e sistemas de ar condicionado (TORTORA *et al.*, 2005).

### **1.8 FUNGOS**

Fungos são classificados no reino Fungi, grupo de micro-organismos que inclui fungos filamentosos e leveduriformes. São seres eucariotos, quimiolitotróficos e podem ser uni ou multicelulares. São abundantes em todo o mundo e tem modo de vida associado, muitas vezes, à matéria morta, sendo de grande importância na sua decomposição, e como simbiontes ou parasitas de plantas, animais e outros fungos, além de causar doenças em seres humanos (TORTORA *et al.*, 2005). Fungos dos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* e *Pneumocystis* são de importância médica e são também capazes de produzir biofilmes (FANNING & MITCHELL, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os biofilmes são formados por micro-organismos em forma de vida sésil, mas mesmo assim, o monitoramento da eficiência do controle da formação de biofilmes realizado em campo ainda é baseado principalmente em micro-organismos planctônicos. Caso a água de resfriamento não seja tratada, os problemas relacionados à formação de biofilmes, como a biocorrosão, podem causar redução da eficiência da transferência de calor e conseqüentemente quedas de energia.

Bactérias heterotróficas, como *Pseudomonas*, *Legionella*, nitrificantes, oxidantes de ferro e redutoras de sulfato e fungos são formadoras de biofilmes. Como já mencionado, eles são grandes responsáveis pelos processos de biocorrosão em sistemas de resfriamento de água na indústria petrolífera, causando assim grandes prejuízos às mesmas, uma vez que os custos relacionados a essas ocorrências resultam em grandes gastos na exploração, transporte e refino do petróleo. Entretanto, ainda não há um método eficaz para a pesquisa e manutenção de biofilmes nestes sistemas.

Diante deste panorama, o presente trabalho justifica-se uma vez que o entendimento dos processos de formação de biofilmes é de fundamental importância para o desenvolvimento de alternativas que minimizem ou debelem este problema. A inibição da formação de biofilmes é a chave para o combate às alterações de superfícies metálicas. Para tanto, é necessário a aquisição de conhecimento sobre a microbiota associada a esses substratos, bem como seu perfil de formação de biofilme em diferentes materiais metálicos e não metálicos utilizados pela indústria, tornando possível a minimização dos seus danos à mesma.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente a microbiota planctônica e aderida em corpos de prova de três materiais distintos (vidro, aço inoxidável e aço carbono) depositados na bacia de uma refinaria de petróleo alimentados por água de reuso como forma de avaliar a eficiência dos processos do tratamento da água e a viabilidade do uso de efluentes secundários tratados como água de reposição.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Monitorar e comparar o crescimento de bactérias heterotróficas totais, *Legionella sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* e fungos em UFC/cm<sup>2</sup> e bactérias nitrificantes, bactérias oxidantes de ferro e bactérias redutoras de sulfato em NMP/mL nos corpos de prova metálicos (aço inoxidável e aço carbono) e não metálicos (vidro);
- Avaliar o crescimento de bactérias planctônicas presentes na água de reuso, utilizada em torres de resfriamento;
- Comparar corpos de prova metálicos e não metálicos quanto à formação de biofilme, sugerindo o mais adequado para monitoramentos futuros.

### **3 METODOLOGIA**

Todas as soluções e meios de cultura utilizados neste tópico estão descritos detalhadamente no Anexo 1.

#### ***3.1 TORRE DE RESFRIAMENTO DE ÁGUA***

O estudo foi realizado em uma torre de resfriamento de uma refinaria de petróleo alimentada com água reciclada tratada que é obtida após tratamento dos efluentes secundários, provenientes do sistema de tratamento biológico baseado em lagoas aeradas e biodisco, em uma unidade protótipo com capacidade para tratar 90 a 110 m<sup>3</sup>/h de efluente. Essa unidade apresenta duas etapas de pré-tratamento antes de passar pelo sistema de eletrodialise reversa: a primeira para remoção de sólidos em suspensão por processos físicos e químicos de coagulação, floculação, sedimentação e filtro de areia; e a segunda baseada em filtros de carvão ativado para remoção de compostos orgânicos dissolvidos.

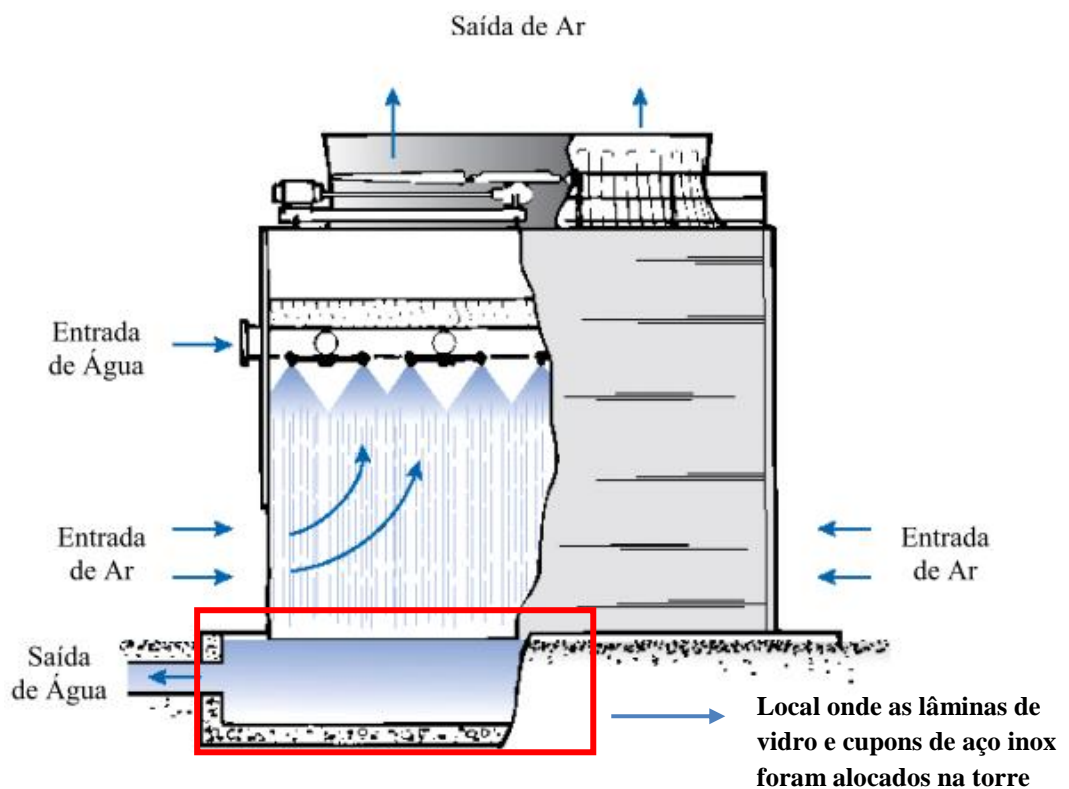
Durante o processo, o efluente é clorado com hipoclorito de sódio (NaOCl) e, então passa por um processo de clarificação e, depois, recebe outra dosagem de cloro sendo direcionado para um filtro de areia que remove a turbidez da água. Na saída do filtro de areia, nova dosagem de NaOCl é aplicada e então o efluente é direcionado para os filtros de carvão ativado. Por fim, outra dosagem de cloro é efetuada até que o efluente chega à unidade protótipo de eletrodialise reversa. Assim, esse efluente é enviado para tanques de armazenamento de água e direcionado para a torre que é, então, alimentada com água reciclada (TRAR). Nestes tanques, o cloro residual livre é mantido em torno de 0,5 mg/L, e de cloraminas (cloro combinado a amônia - NH<sup>3</sup>) em torno de 1,0-1,5 mg/L.

#### ***3.2 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA***

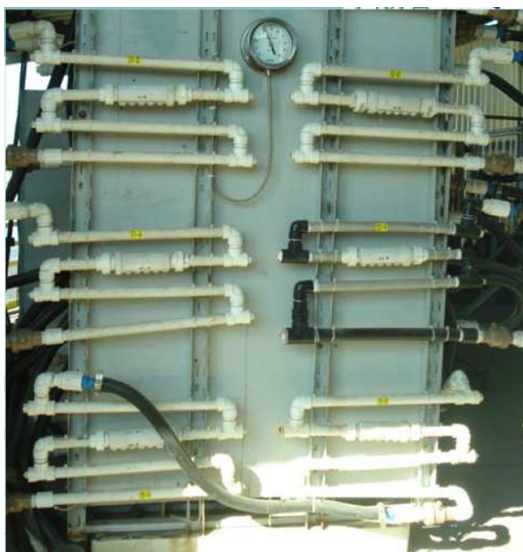
Os cupons e biocupons foram limpos com papel absorvente para a remoção do excesso de óleo, lixados uniformemente com lixa 400 e imersos em tolueno (P.A.) por 2 minutos. A seguir, foram transferidos para outro recipiente com tolueno limpo antes de serem colocados na estufa a 80<sup>o</sup> C por aproximadamente 20 minutos. Os corpos de prova foram transferidos para um dessecador e pesados. Após a limpeza dos corpos de prova, todo o manuseio dos mesmos foi feito com luvas.

As lâminas foram lavadas com água e detergente para a remoção do excesso de óleo, secas com o auxílio de papel absorvente, mergulhadas em álcool etílico por alguns minutos e novamente secas com o auxílio de uma gaze.

Após esses procedimentos de limpeza, os corpos de prova foram instalados na torre de resfriamento (figura 4). As lâminas de vidro foram encaixadas em suporte plástico e tanto esses quanto os cupons de aço inoxidável foram presos com o auxílio de um suporte metálico. Por sua vez, os biocupons foram instalados em um outro sistema, denominado árvore (figura 5), constituído por tubulações de PVC, alimentado com a água circulante na torre.



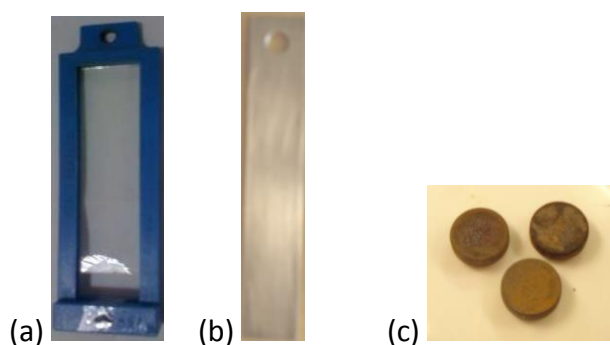
**Figura 4:** Posicionamento das lâminas de vidro e cupons de aço inox foram alocados nas torres de resfriamento.



**Figura 5:** Sistema de árvore montado em refinaria de petróleo para monitoramento de biofilme em biocupons de aço carbono. Os biocupons foram colocados dentro dos tubos de PVC, onde a água proveniente da torre de resfriamento circula.

### ***3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E TRANSPORTE***

Na bacia da torre (figura 4) foram instaladas 42 lâminas de vidro e 72 cupons metálicos de aço inoxidável. Na árvore foram instalados 48 biocupons de aço carbono (figura 6).



**Figura 6:** Imagens dos corpos de prova. (a) lâmina de vidro no suporte (38,71cm<sup>2</sup>); (b) cupom de aço inoxidável (18,75cm<sup>2</sup>); e (c) biocupons de aço carbono (1,8cm<sup>2</sup>).

Após intervalos de 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28 dias, os corpos de prova foram retirados da torre de resfriamento e enviados para o Laboratório de Microbiologia Aplicada, localizado na Universidade Federal de Minas Gerais, para processamento. Para cada data, foram coletados

2 lâminas de vidro, 3 cupons de aço inox e 3 biocupons de aço carbono para quantificação de micro-organismos aeróbios; e, 2 lâminas de vidro, 3 cupons de aço inox e 3 biocupons de aço carbono para quantificação de bactérias redutoras de sulfato. O modelo experimental descrito está esquematizado na figura 7.

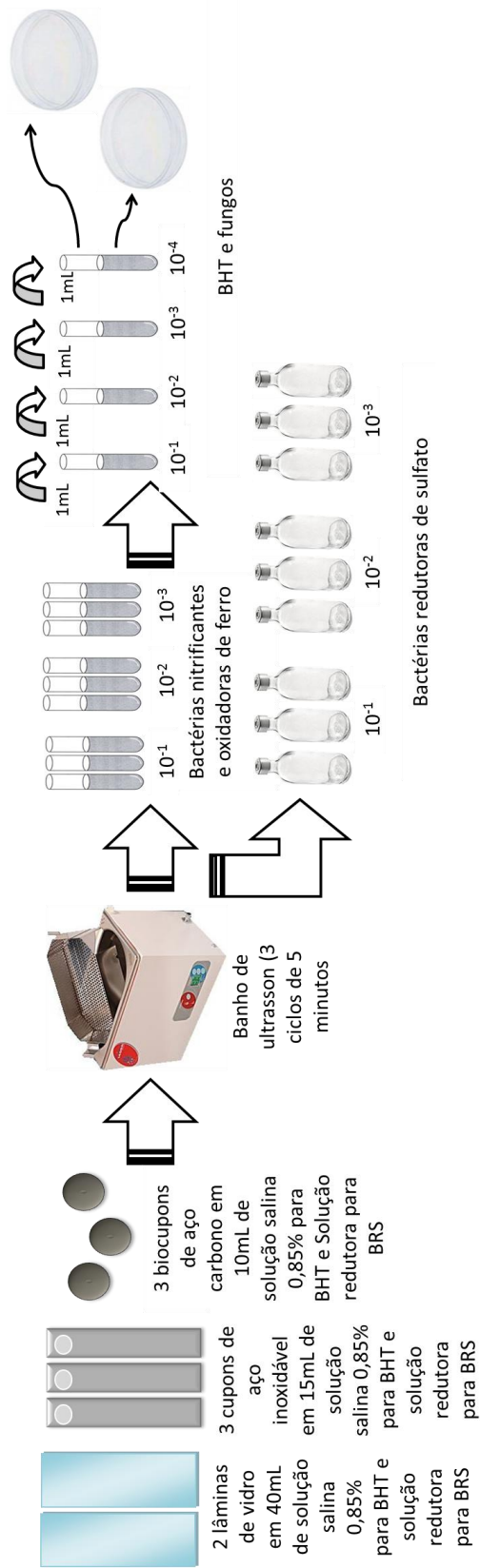


Figura 7: Desenho esquemático do processamento das amostras coletadas.

No momento da coleta, os corpos de prova destinados ao monitoramento de bactérias aeróbias heterotróficas totais (BHT), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella sp.*, bactérias nitrificantes, bactérias oxidantes de ferro e fungos foram retirados e imersos em água destilada, para retirada de micro-organismos não aderidos, e colocados em frascos contendo solução salina 0,85% (anexo 1) estéril para transporte. As lâminas de vidro foram transportadas em tubo porta lâminas contendo 40mL de solução salina, os cupons de aço inox em tubo Falcon de 15mL completo com solução salina e os biocupons de aço carbono em frasco tipo penicilina de 10mL também completo com solução salina. Os corpos de prova destinados ao monitoramento de bactérias redutoras de sulfato foram retirados da torre e rapidamente colocados nos frascos contendo solução redutora para transporte. As lâminas de vidro em tubo porta lâminas contendo 40mL de solução redutora (anexo 1), cupons em tubo Falcon de 15mL completo com solução redutora e os biocupons de aço carbono em tubo tipo penicilina de 10mL contendo mesmo volume de solução redutora).

Para a quantificação de bactérias planctônicas presentes na bacia da torre, amostras de 100mL de água foram coletadas nos mesmos períodos de tempo utilizados para a avaliação dos corpos de prova e enviadas para o laboratório em frascos âmbar estéreis e sob refrigeração.

### **3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO**

Os corpos de prova imersos em solução salina 0,85% e solução redutora foram submetidos a 3 ciclos de 2 minutos em banho de ultrassom, aparelho UltraCleaner 1650A, para desprendimento do biofilme formado, como sugerido por Shaule e colaboradores (1999). A suspensão obtida foi utilizada nos ensaios para quantificação dos diferentes grupos microbianos em estudo.

#### **3.3.1 Bactérias Heterotróficas Totais, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella sp.* e Fungos**

As suspensões obtidas pelo desprendimento do biofilme e as amostras de água da bacia da torre foram diluídas serialmente nas diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . A seguir, alíquotas de 0,1mL foram inoculadas pelo método de espalhamento em placa em meio TSA

(Ágar Triptona de Soja), para contagem de bactérias heterotróficas totais, em meio Ágar Cetrimida Base, para contagem de *Pseudomonas aeruginosa*, em Agar *Legionella* Base para quantificação presuntiva de *Legionella* e em meio Agar Sabouraud Dextrose para quantificação de fungos filamentosos e leveduras. Todos os meios de cultura utilizados estão descritos no anexo 1. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48h, exceto para fungos, que foram incubados à 27 °C por 3-7 dias.

Após a incubação foi feita a enumeração das colônias para a determinação do número de unidades formadoras de colônias por ml (UFC/mL). Para transformar os dados em (UFC/cm<sup>2</sup>), utilizou-se a expressão 1, que relaciona o volume total da amostra (VT), a densidade da suspensão expressa em UFC/mL, a área do corpo de prova em cm<sup>2</sup> (A) e o número de corpos de prova imersos no volume total da amostra (n).

$$UFC/cm^2 = \frac{VT \times UFC}{A \times n}$$

**Equação 1:** Determinação das unidades formadoras de colônia por cm<sup>2</sup>.

Os resultados das amostras de água foram expressos em UFC/mL, obedecendo a equação 2, onde UFC é a média da contagem das colônias em placa, FD é o fator de diluição da amostra e V<sub>i</sub> é volume da alíquota plaqueada:

$$UFC/mL = \frac{UFC \times FD}{V_i}$$

**Equação 2:** Determinação das unidades formadoras de colônia por mL.

Nos casos em que a contagem de colônias foi bastante alto, foi necessário repetir a análise utilizando diluições maiores. Todas as análises foram feitas em triplicata.

### 3.3.2 Bactérias Nitrificantes e Oxidantes de Ferro

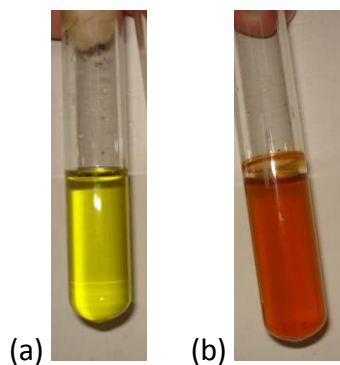
Para a quantificação de bactérias nitrificantes, foi utilizado o Caldo Amônio - Carbonato de Cálcio (anexo 1). As amostras foram homogeneizadas e inoculadas em 3 séries de 3 tubos, sendo que cada série corresponde a uma diluição diferente (EATON et al., 2005). Os tubos da 1ª série continham 2 mL de meio de cultura de concentração dupla e 2mL da amostra foi inoculado nos mesmos. Os tubos da 2ª série continham 5mL de meio de cultura

e 500µL da amostra foi inoculado, obtendo-se diluição equivalente a  $10^{-1}$  e, por fim, os tubos da 3ª série também continha 5mL do meio de cultura e neles foi inoculado 50µL da amostra, obtendo a diluição equivalente a  $10^{-2}$  (figura 7). Os tubos foram incubados a 28°C por 21 dias. A alteração dos volumes foi feita, devido aos volumes das suspensões obtidas não serem suficientes para a inoculação dos volumes indicados no método padrão, descrito por Eaton et al., 2005.

Após a incubação, os tubos foram adicionados de 3 gotas (aproximadamente 150µL) do reagente de Griess-Illorvay (anexo 1). O aparecimento da cor vermelho-púrpura indica a presença de nitrito, sendo o teste, portanto, considerado positivo para presença de bactérias oxidantes de amônia. Para os tubos que não apresentaram resultado positivo, foi feito o teste para nitrato, adicionando uma gota do reagente de difenilamina (anexo 1). O desenvolvimento de uma cor azul indica positividade no teste para *Nitrosomonas*, significando que o nitrito produzido pelas *Nitrosomonas* tinha sido convertido pelas *Nitrobacter* em nitrato. Os tubos positivos foram contados e os resultados foram expressos em NMP/mL (número mais provável por mililitro) com auxílio da tabela de número mais provável publicada por Oblinger e Kolburguer (1975).

Para a quantificação de bactérias oxidantes de ferro, as amostras foram inoculadas em Caldo Citrato Férrico Amoniacal (anexo 1). As amostras foram homogeneizadas e inoculadas em 3 séries de 3 tubos, sendo que cada série corresponde a uma diluição diferente. Os tubos da 1ª série continham 5mL de meio de cultura e 500µL da amostra foi inoculado nos mesmos. Os tubos da 2ª série continham 5mL do meio de cultura e 50 µL da amostra foi inoculado, obtendo-se a diluição correspondente a  $10^{-2}$  e, por fim, os tubos da 3ª série também continha 5mL de meio de cultura e neles foi inoculado 5µL de amostra, obtendo a diluição equivalente a  $10^{-3}$  (figura 7). Os tubos foram incubados a 28°C por 20 dias.

Os tubos positivos foram aqueles que apresentaram coloração avermelhada (ferruginosa), devido a oxidação do ferro, podendo também apresentar precipitações (figura 8). Os tubos positivos foram também contados e os resultados expressos em NMP/mL com o auxílio da tabela de NMP (OBLINGER & KOLBURGUER, 1975).



**Figura 8:** Caldo Citrato Férrico Amoniacal (a) antes do inoculo e (b) indicando resultado positivo.

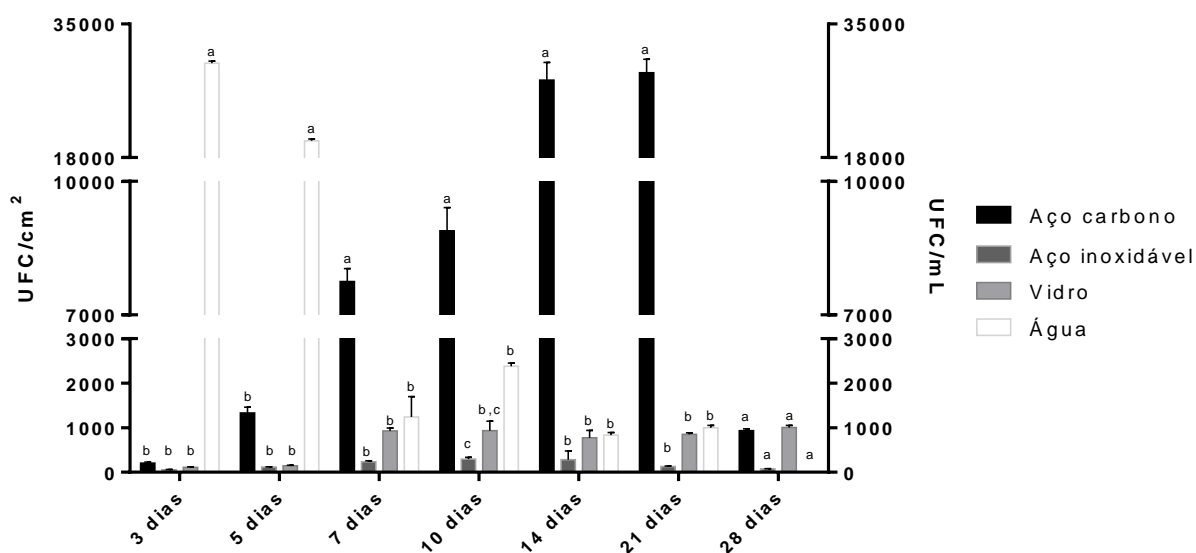
### 3.3.3 Bactérias Redutoras de Sulfato

Assim como nos ensaios de monitoramento de bactérias aeróbias, os frascos contendo corpos de prova imersos em solução redutora também foram submetidos ao banho de ultrassom e inoculações foram feitas em 3 séries de 3 frascos de vidro de 10 mL tipo penicilina, vedados, com atmosfera de nitrogênio e meio Postgate E modificado (anexo 1). Essa análise não foi realizada com as amostras de água e foi feita de forma diferenciada para as lâminas de vidro. Nesse caso, a 1ª série continha 5mL de meio de cultura 2 vezes concentrado e foi inoculado também 5mL da amostra. Os tubos da 2ª série continham 10mL de meio de cultura e foram inoculados com 1mL da amostra, obtendo-se uma diluição de  $10^{-1}$ . Na 3ª série, de diluição correspondente a  $10^{-2}$ , os tubos contendo 10 mL de meio foram inoculados com 100 $\mu$ L de amostra. Para cupons de aço inoxidável e biocupons de aço carbono, 1mL, 100 $\mu$ L e 10 $\mu$ L foram inoculados em 10mL de meio de cultura, obtendo-se as diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , nas séries 1, 2 e 3, respectivamente (figura 7). Para evitar contato com oxigênio atmosférico, esses inóculos foram realizados com o auxílio de seringas graduadas estéreis e sem abertura das tampas dos frascos contendo as amostras. Esses frascos foram incubados a 30°C por 28 dias. A positividade dos tubos foi evidenciada pelo aparecimento de coloração preta, devido a redução do sulfato e consequente depósito de sulfeto ferroso. Os tubos positivos foram contados e os resultados expressos em NMP/MI com o auxílio da tabela de NMP (OBLINGER & KOLBURGUER, 1975).

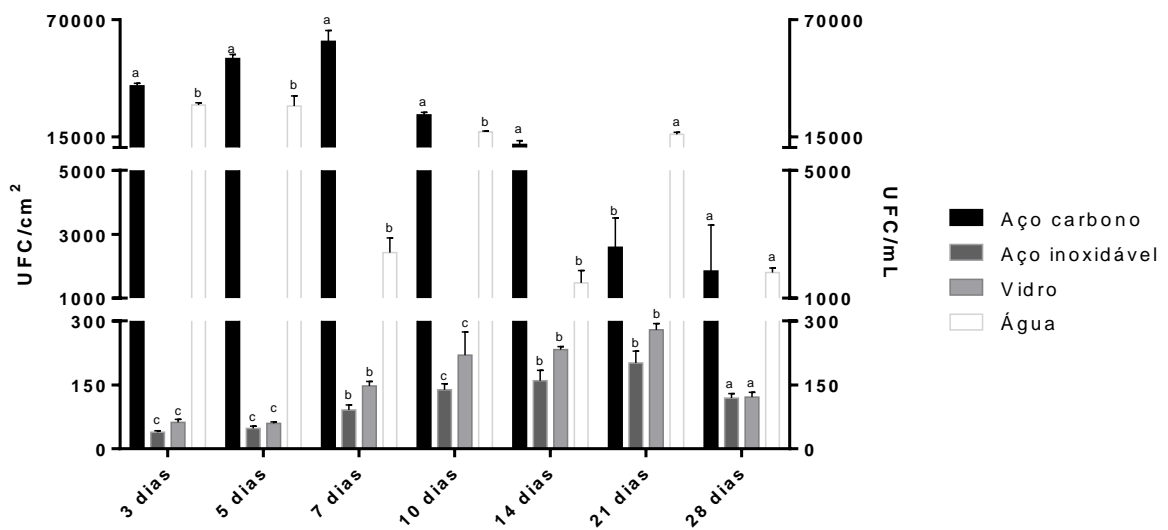
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA SÉSSIL ASSOCIADA AOS DIFERENTES CORPOS DE PROVA

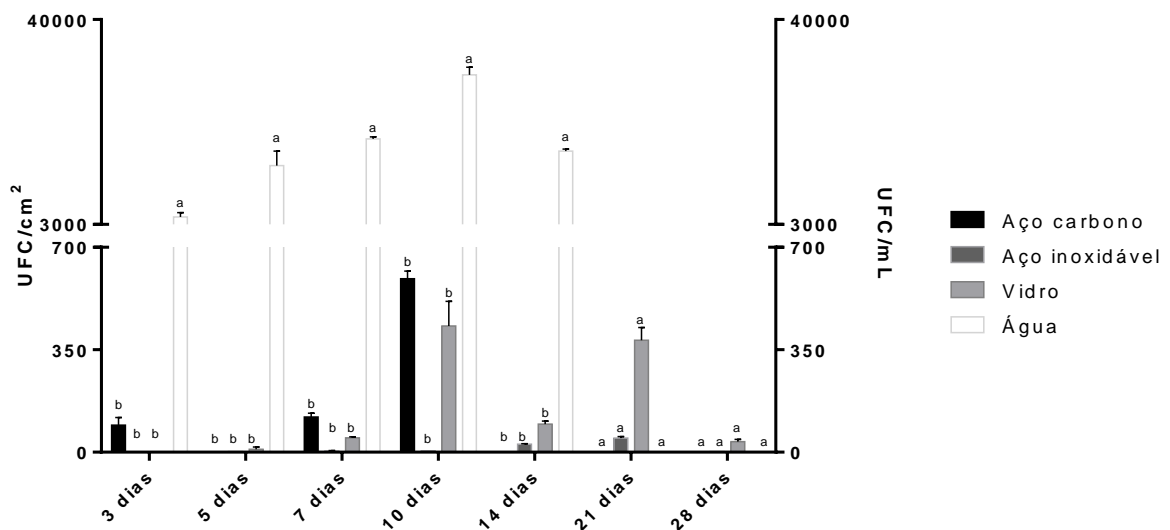
Os dados de densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* e fungos associados aos diferentes corpos de prova em estudo nos diferentes intervalos de tempo estão apresentados nas figuras 9, 10, 11 e 12. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 6.0 com teste Two-Way Anova e pós teste de Tukey, sendo que os diferentes materiais utilizados foram comparados entre si nos diferentes intervalos de tempo.



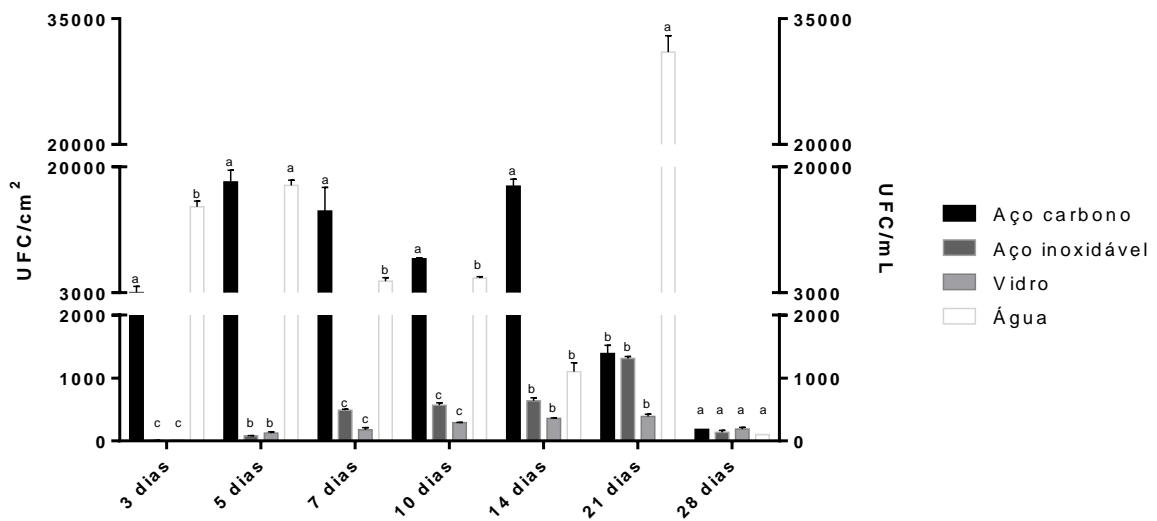
**Figura 9:** Densidade de *Legionella* sésil removidos dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6.0 com teste Two-Way Anova e pós teste de Tukey levando em consideração os diferentes materiais em um mesmo intervalo de tempo. As análises sugerem que o aço carbono e a água obtiveram diferença de  $p < 0.05$  quando em comparação com o vidro e o aço inoxidável.



**Figura 10:** Densidade de bactérias heterotróficas totais sésil removidos dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6.0 com teste Two-Way Anova e pós teste de Tukey levando em consideração os diferentes materiais em um mesmo intervalo de tempo. As análises sugerem que o aço carbono e a água obtiveram diferença de  $p < 0.05$  quando em comparação com o vidro e o aço inoxidável.



**Figura 11:** Densidade de *Pseudomonas aeruginosa* sésil removidos dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6.0 com teste Two-Way Anova e pós teste de Tukey levando em consideração os diferentes materiais em um mesmo intervalo de tempo. As análises sugerem que o aço carbono e a água obtiveram diferença de  $p < 0.05$  quando em comparação com o vidro e o aço inoxidável.



**Figura 12:** Densidade fungica séssil removida dos diferentes materiais (aço carbono, aço inoxidável e vidro) depositados na árvore alimentada com água da bacia da torre de resfriamento, e planctônica proveniente da mesma água, ao longo de 28 dias. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6.0 com teste Two-Way Anova e pós teste de Tukey levando em consideração os diferentes materiais em um mesmo intervalo de tempo. As análises sugerem que o aço carbono e a água obtiveram diferença de  $p < 0.05$  quando em comparação com o vidro e o aço inoxidável.

Em relação aos biocupons de aço carbono, a densidade de BHT (figura 10) e de *Pseudomonas aeruginosa* (figura 11) aumentou com o tempo de amostragem, atingindo populações máximas após 7 dias ( $5,99 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>) e 10 dias ( $5,93 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>), respectivamente. Não foi observado crescimento de *P. aeruginosa* no intervalo de cinco dias e nas três últimas coletas. A população de *Legionella* (figura 9) aumentou até o período de 21 dias, atingindo o valor de  $2,88 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>. A densidade de fungos filamentosos e leveduras (figura 12) variou de  $3,01 \times 10^3$ , aos 3 dias, para  $1,74 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>, aos 14 dias. A partir deste período, foi observado decréscimo constante na densidade desta microbiota.

Quanto aos cupons de aço inoxidável, pôde-se observar que a população de bactérias heterotróficas totais (figura 10) e de fungos (figura 12) aumentou até o período de 21 dias, atingindo valores de  $2,01 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $1,31 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. A população de *Legionella* (figura 9), por sua vez, aumentou até o período de 10 dias, atingindo  $2,91 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>, e apresentou decaimento nas amostragens que se seguiram. *P. aeruginosa* (figura 11) não estava presente no primeiro período de tempo, mas aumentou gradativamente até

o período de 21 dias, quando atingiu seu valor máximo (47,8 UFC/cm<sup>2</sup> e), a partir do qual, também apresentaram decaimento.

Já para as lâminas de vidro, diferentemente do aço carbono, as populações de BHT e fungos se mostraram crescentes por um período maior, até o intervalo de 21 dias, com valores de 2,79x10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e 3,88x10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. As densidades de *Legionella* e *P. aeruginosa* se mostraram oscilantes no decorrer do tempo.

As análises estatísticas foram realizadas comparando os intervalos de tempo em relação aos materiais utilizados. As bactérias presentes na água, ou seja, sésseis, estavam presentes em maior quantidade do que as aderidas em todos os períodos de tempo (p<0,05). Ao comparar os materiais utilizados, pôde-se inferir que os micro-organismos estudados (BHT, *Legionella*, *P. aeruginosa* e fungos) aderem mais ao aço carbono (p<0,05), seguido pelo vidro e aço inoxidável (exceto para fungos, que tiveram maior aderência em aço inoxidável do que no vidro), entretanto, essa diferença não é estatística.

Sungur e colaboradores (2010) verificaram em seu trabalho que a colonização de bactérias heterotróficas totais em aço inoxidável atingiu o valor máximo após 3 meses com 204,173 UFC/cm<sup>2</sup>. Morvay et al (2009) verificaram que após 28 e 30 dias o maior número de células aderidas em aço inoxidável foi verificado no valor de 107 unidades/cm<sup>2</sup>.

Lucchesi (2012) realizou testes de aderência de biofilmes em cinco superfícies, dentre elas o aço carbono, aço inoxidável e o vidro, concluindo que em todos eles, há adesão bacteriana até 48h após o inóculo, havendo decréscimo após esse período. Tal fato explica o decaimento da quantidade de células aderidas nos materiais testados, típico da curva de crescimento de biofilmes (apresentada neste trabalho). Lucchesi (2012) também apresentou dados referentes ao crescimento de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, informando que o mesmo ocorre de forma variável, porém em crescimento, até o período de 48 horas, decaindo logo em seguida. Neste trabalho, o crescimento de *P. aeruginosa* se deu até o período de 10 dias em aço carbono e vidro, enquanto que em aço inoxidável, ocorreu até o 21º dia. Soininen et al. (2009) informou em seu trabalho que não há diferenças na formação de biofilmes quando comparando diferentes materiais, mas sim uma diferença quantitativa

entre os micro-organismos encontrados. Entretanto, Maragoni (2010) verificou que em seu experimento, a população de BHT apresentou maior densidade no aço carbono que no aço inoxidável.

Os dados obtidos para ferrobactérias (bactérias oxidantes de ferro) foi pontual, ocorrendo nos dias 3 e 10 no vidro e 3, 5, 7 e 10 em aço inoxidável (tabela 1). *Nitrosomonas* também apresentou crescimento pontual no vidro (dias 14 e 28) e em aço inoxidável (14, 21 e 28 dias) (tabela 1). *Nitrobacter* e bactérias redutoras de sulfato (BRS) não foram observadas (tabela 2). Sungur *et al.* (2010) verificaram que as contagens de BRS aumentaram de acordo com o tempo de formação do biofilme em aço inoxidável, atingindo o nível máximo ( $1,4 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>) após 6 meses. Sobre esse fato, pode-se inferir na presente pesquisa que houve pouco tempo para que o biofilme se tornasse maduro e espesso suficiente para que a presença de bactérias redutoras de sulfato pudesse ser observada. Maragoni (2010) observou que tanto em cobre quanto em aço inoxidável não houve presença de BRS, sendo este grupo evidenciado apenas após dois meses de exposição em aço carbono. Morvay *et al.* (2009) afirmaram que no vigésimo dia do experimento foram identificadas em cupons de aço carbono regiões com mais de duas camadas de bactérias, sendo esta a espessura máxima determinada (experimento que ocorreu até o trigésimo dia). Torres (2001) corrobora afirmando que há relação entre as BRS e BHT devido à necessidade da criação de condições de anaerobiose na base do biofilme. Não houve crescimento de nenhum desses grupos nos cupons de aço carbono (tabelas 1 e 2).

**Tabela 1:** Densidade de ferrobactérias e *Nitrosomonas* associada aos biofilmes removidos dos corpos de prova expressos em NMP/cm<sup>2</sup>. Em destaque o crescimento pontual desses grupos microbianos.

Intervalo de tempo (dias)	Ferrobactérias (NMP/cm <sup>2</sup> )			<i>Nitrosomonas</i> (NMP/cm <sup>2</sup> )		
	Vidro	Aço inoxidável	Aço carbono	Vidro	Aço inoxidável	Aço carbono
<b>3</b>	<b>0,2</b>	0	0	0	0	0
<b>5</b>	0	0	0	0	0	0
<b>7</b>	0	<b>0,1</b>	0	0	0	0
<b>10</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0
<b>21</b>	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0
<b>28</b>	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0

Os métodos padrões de quantificação destes grupos não incluem aeração. Entretanto, Torres (2001) realizou experimentos comparando o teor de oxigênio e presença de micro-organismos em biofilmes, comprovando em seus resultados que a queda do oxigênio dissolvido leva a redução da população de ferrobactérias sésseis. Esse estudo fato pode explicar o baixo crescimento desse grupo microbiano, visto que a incubação não foi feita sob agitação.

**Tabela 2:** Densidade de *Nitrobacter* e bactérias redutoras de sulfato associada aos biofilmes removidos dos corpos de prova expressos em NMP/cm<sup>2</sup>

Intervalo de tempo (dias)	<i>Nitrobacter</i> (NMP/cm <sup>2</sup> )			BRS (NMP/cm <sup>2</sup> )		
	Vidro	Aço inoxidável	Aço carbono	Vidro	Aço inoxidável	Aço carbono
3	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0

## 4.2 MICROBIOTA PLANCTÔNICA

As análises da água proveniente da torre de resfriamento demonstraram crescimento máximo da biomassa planctônica até a quarta potência para todos os grupos microbianos, sendo que o crescimento máximo de *Legionella* (figura 9) se deu na primeira coleta (três dias), sendo o valor  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL e chegou a ser nula na última coleta; o mesmo crescimento inicial pode ser observado para o grupo das bactérias heterotróficas totais (figura 10), cujo crescimento maior também foi no primeiro dia, apresentando o mesmo valor, variando no decorrer do tempo. *P. aeruginosa* (figura 11) apresentou crescimento constante até o período de 14 dias, chegando ao valor de  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL, decaindo na amostra seguinte e sendo nulo nas duas últimas amostras. Os fungos (figura 12) apresentaram crescimento variável e o maior crescimento foi no período de 21 dias, sendo no valor de  $3,1 \times 10^4$  UFC/mL (figura 12). Sungur *et al.* (2010) concluíram em seu trabalho que há correlação entre microbiota heterotrófica planctônica e formadora de biofilme nos

materiais que utilizou em seu experimento (aço inoxidável, aço galvanizado e cobre), sendo que a contagem de BHT máxima se deu no terceiro mês de experimento e atingiu o valor de  $1,4 \times 10^7$  células/mL.

## 6 CONCLUSÕES

- Os biocupons de aço carbono apresentaram maior crescimento de BHT, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* e fungos, sugerindo que este seja o melhor material para pesquisa de biofilmes em torres de resfriamento;
- Os cupons de aço inoxidável e as lâminas de vidro se mostraram melhores para determinação de bactérias nitrificantes e ferrobactérias, apesar do seu crescimento ter sido de forma pontual;
- O método por cultivo é por si só confiável, pois determina quantitativamente a microbiota presente nos corpos de prova e na microbiota planctônica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.A.N; SÉRVULO, E.F.C & FRANÇA, F.P. 2002. Monitoramento da formação de biofilme em torre de refrigeração. *6ª Conferência sobre tecnologia de equipamentos*, Salvador-Bahia.
- AMORIM, L.V. 2003. *Melhoria, proteção e recuperação da reologia de fluidos hidroargilosos para uso na perfuração de poços de petróleo*. 326f. Tese - Centro de Ciências e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande.
- ANNOUS, B.A; FRATAMICO, P.M; SMITH, J.L. 2009. Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *Journal of Food and Science*, **74(1)**: 24-37.
- ANUZIATO, P.A. 2008. *Efeito Do Thiobacillus Thiooxidans Na Corrosão Do Aço 430*. 84f. Dissertação - Universidade Estadual do Centro-Oeste.
- BARBOSA, F.L. 2007. *Regulamentação do reuso de água em refinarias - análise do modelo americano e perspectivas para o cenário nacional*. 273p. Dissertação - COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- BEECH, I.B. 2004. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms - current understanding and state-of-the art methods of study. *International Bioremediation & Biodegradation*, **53**: 177-183.
- BEECH, I; BERGEL, A; MOLLICA, A; FLEMMING, H.C. SCOTTO, V; SAND, W. 2000. Simple methods for the investigation of the role of biofilms in corrosion. *Biocorrosion*, **00-02**: 1-27
- BUENO, R. F. 2011. Nitrificação e desnitrificação simultâneas em reator com biomassa em suspensão e fluxo contínuo de esgoto. 143f. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
- CAPELLETTI, R.V. 2006. *Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte na usinagem de metais*. 97f. Dissertação - Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas.

- CHARACKLIS, W.G; MARSHALL, K.C. 1989. *Biofilms*. United States of America: John Wiley & Sons. 796p.
- CHAVES, L.C.D. 2004. *Estudo da cinética e formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável*. 186f. Dissertação - Escola de Engenharia. Universidade do Minho.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 18 de março de 2005.
- Constituição Federal. Lei nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Diário Oficial da União. 9 de janeiro de 1997.
- COOMBS, P; WAGNER, D; BATEMAN, K; HARRISON, H; MILODOWSKI, A.E; NOY, D; WEST, J.M. 2010. The role of biofilms in subsurface transport processes. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, **43**: 131-139.
- COSTERTON, J.W; CHENG, K.-J; GEESEY, G.G; LADD, T.I; NICKEL, J.C; DASGUPTA, M; MARRIE, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review in Microbiology*, **41**: 435-464.
- COSTERTON, J.W; LEWANDOWSKI, Z; CALDWELL, D.E; KORBER, D.R; LAPPIN-SCOTT, H.M. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, **49**: 711-745.
- DAVEY, M.E; O'TOOLE, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64(4)**: 847-867
- DOĞRUÖZ, N; MINNOS, B; ILHAN-SUNGUR, E; ÇOTUK, A. 2009. Biofilm Formation on Copper and Galvanized Steel Surfaces in a Cooling-Water System. *Journal of Biology*, **68(2)**: 105-111.

- DOMINGUES, V.O; TAVARES, G.D; STÜKER, F; MICHELOT, T.M; REETZ, L.G.B; BERTONCHELI, C.M; HÖRNER, R. 2007. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. *Saúde, Santa Maria*, **33(1)**: 15-19.
- DONLAN, R.M. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **8(9)**: 881-890.
- EATON, A.D; CLESCERI, L.S; RICE, E.W; GREENBERG, A.E. 2005. *Standard methods for the examination of water & wastewater*. 21 ed. Maryland: Port City Press. 10-167.
- FANG, H.H.P; XU, L.C & CHAN, K.Y. 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, **36**: 4709-4716.
- FANNING, S.; MITCHELL, A.P. Fungal biofilms. *Plos Pathogens*, v. 8, n. 4, 2012.
- FLEMMING, H.C; WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews - Microbiology*, **8**: 623-633.
- GARCÍA-BALBOA, C; PEDRAZZA, A; BLÁQUEZ, M.L; GONZÁLEZ, F; MUÑOZ, J.A; BALLESTER, A. 2009. The role of iron bacteria on weathering and attenuation processes at acidic environments. *Water Air Soil Pollut*, **199**: 203-217.
- HALL-STOODLEY, L; COSTERTON, J.W; STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews - Microbiology*, **2**: 95-108.
- HIGA, C.M; DELGADO, B.E.P; QUEIROZ, E.M; PESSOA, F.L.P. 2007. Minimização do consumo de água: o caso de uma refinaria de petróleo. 4º PDPETRO, Campinas, São Paulo.
- JAN-ROBLERO, J; ROMERO, J.M; AMAYA, M; LE BORGNE, S. 2004. Phlogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. *Environmental Biotechnology*, **64**: 862-867.
- JAYARAMAN, A.; SUN, A.K. & WOOD, T.K. 1998. Characterization of axenic *Pseudomonas fragi* and *Escherichia coli* biofilms that inhibit corrosion of SAE 1018 steel. *Journal of Applied Microbiology*, **84**: 485-492.

- KAKOOEI, S; ISMAIL, M.C; ARIWAHOEDI, B. 2012. Mechanisms of microbiologically influenced corrosion: a review. *World Applied Sciences Journal*, **17(4)**: 524-531.
- LUCCHESI, E.G. 2012. *Influência de diferentes materiais na formação e susceptibilidade de biofilmes a agentes antimicrobianos*. 178f. Tese - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- LUDENSKY, M. 2003. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeterioration & Biodeterioration*, **51**: 255-263.
- LUTZ, L. 2010. *Prevalência de Pseudomonas aeruginosa hipermutante em pacientes com fibrose cística e associação com resistência antimicrobiana em condições planctônicas e em biofilme*. 105f. Tese - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MARAGONI, P.R.D. 2010. *Caracterização de biofilmes formados em superfícies metálicas e biocorrosão*. Dissertação - Departamento de Patologia Básica. Universidade Federal do Paraná.
- MATA, P.T.G; ABEGG, M.A. 2007. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. *Arquivos do Mundi*, **11(2)**: 20-25.
- MELO, I.R; FILHO, S.L.U; OLIVEIRA, F.J.S; FRANÇA F.P. 2011. Formation of biofilms and biocorrosion on AISI-1020 carbon steel exposed to aqueous systems containing different concentrations of a diesel/biodiesel mixture. *International Journal of Corrosion*, **2011**: 1-6.
- MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. 2008. *Microbiologia Ambiental*. 2 ed. Jaguaríuna: Embrapa. 647p.
- MELO, L.F; BOTT, T.R. 1997. Biofouling in water systems. *Experimental Thermal and Fluid Science*, **14**: 375-381.

- MERWE, A.V.D. 2007. *Detachment of single-and multi-species bacterial biofilms by crude enzymes extracted from wastewater biofilms and bacteria*. 160f. Dissertação - Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Pretoria.
- Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. 14 de dezembro de 2011
- MORTON, L.H.G; SURMAN, S.B. 1995. Biofilms in biodeterioration - a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 203-221.
- MORVAY, A.A; DECUN, M; SALA, C; MORAR, A. 2009. Dynamics of microbial biofilms on different materials in drinking water systems. *Faculty of Veterinary Medicine*, 87-89
- NADELL, C.D; XAVIER, J.B; LEVIN, S.B; FOSTER, K.R. 2008. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. *Plos Biology*, **6(1)**: 171-179.
- NETO, I.F.F. 2011. *Estudo dos processos de nitrificação e desnitrificação numa estação de tratamento de águas residuais*. 176f. Dissertação - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- O'TOOLE, G; KAPLAN, H.B; KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews of Microbiology*, **54**: 49-79.
- PALMER, R.J & WHITE, D.C. 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology*, **5**: 435-440.
- PEREIRA, M.O.B.O. 2001. *Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. 234f. Dissertação - Escola de Engenharia. Universidade do Minho.

- POMBO, F.R. 2011. *Gestão da demanda de água na indústria de refino de petróleo: desafios e oportunidades de racionalização*. 169f. Tese - Instituto Alberto Luiz Coimbra, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SANTANA, J.J; SANTANA, F.J; GONZÁLEZ, J.E; SOUTO, R.M; GONZÁLEZ, S; MORALES, J. 2012. Electrochemical Analysis of the Microbiologically Influenced Corrosion of AISI 304 Stainless Steel by Sulphate Reducing Bacteria Associated with *Bacillus Cereus*. *International Journal of Electrochemical Science*, **7**: 711-724.
- SCHAULE, G; GRIEBE, T; FLEMMING, H. 1999. Steps in biofilm sampling and characterization in biofouling cases. *Microbially Influenced Corrosion Of Industrial Materials*, **99(2)**.
- SCHNEIDER, E.E. 2010. *Avaliação de um reator de leito móvel com biofilme para tratamento de efluente da indústria do petróleo, com posterior ozonização acoplada a carvão ativado granular com biofilme*. 215f. Dissertação -Instituto Alberto Luiz Coimbra, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SILVA, C.C; JESUS, E.C; TORRES, A.P.R; SOUSA, M.P; SANTIAGO, V.M.J; OLIVEIRA, V.M. 2010. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20(3)**: 447-459.
- SOININEN, A; TIAINEN, V; KONTTINEN, Y.T; VAN DER MEI, H.C; BUSSCHER, H.J; SHARMA, P.K. 2009. Bacterial adhesion to diamond-like carbon. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 882-885.
- STEPHENS, C. 2002. Microbiology: breaking down biofilms. *Current Biology*, **12**: 132-134.
- SUNGUR, E.I; TÜRETGEN, I; JAVAHERDASHTI, R & ÇOTUK, A, 2010. Monitoring and disinfection on biofilm-associated sulfate reducing bacteria on different substrata in a simulated recirculating cooling tower system. *Tübitak*, **34**: 389-397.
- SUTHERLAND, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**: 3-9.

- TANJY, Y; NISHIHARA, T; MIYANAGA, K. 2007. Monitoring of biofilm in cooling water system by measuring lactic acid consumption rate. *Biochemical Engineering Journal*, **35(2007)**: 81-86.
- TELLES E.M. 2011. *A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão*. 44f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- TORRES, E.S. 2001. *Cinética de parâmetros microbiológicos na formação de biofilmes*. 91f. Tese - Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. 2005. *Microbiologia*. 8ed. São Paulo: Artmed. 894p.
- TÜRETGEN, I, 2004. Comparison of the efficacy of free residual chlorine and monochloramine against biofilms in model and full scale cooling towers. *Biofouling*, **20 (2)**: 81-85.
- VIANA, M.G. 2009. *Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico*. 90f. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- VIDELA, H.A & HERRERA, L.K. 2005. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, **8**: 169-180.
- VIDELA, H.A; CHARACKLIS, W.G. 1992. Biofouling and Microbially Influenced Corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **29**: 195-212.
- VIDELA, H.A; QUINTERO, L.K.H. 2007. Biocorrosion in oil recovery systems. Prevention and protection. An update. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, **30**: 272-279.

## **ANEXO I**

As soluções utilizadas para transporte dos corpos de prova citados no texto, bem como os meios de cultura utilizados para o cultivo dos micro-organismos estão discriminadas neste anexo.

### **1 - Solução salina 0,85%**

NaCl	8,5g
Água destilada	1000mL

### **2 - Solução redutora**

Tioglicolato de sódio	0,124g
Ácido Ascórbico	0,1g
NaCl	12,0g
Resazurina (0,025%)	4,0mL
Água destilada	1000mL

Os reagentes de ambas as soluções foram pesados, diluídos na água destilada e esterilizados por autoclavação por 15 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 121°C.

### **3 - TSA - Ágar Triptona de Soja (Himedia)**

Caseína enzimática hidrolisada	15,0g
Digestão papaica da soja	5,0g
NaCl	5,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1000mL

### **4 - Ágar Cetrimida Base (Himedia)**

Digestão pancreática de gelatina	20,0g
Cloreto de magnésio	1,4g

Sulfato de potássio	10,0g
Cetrimida	0,30g
Ágar	15,0g
Água destilada	1000mL

#### 5 - Ágar Legionella (Acumedia)

Extrato de levedura	11,5g
Carbano ativado	1,5g
Tampão ACES	6,0g
$\alpha$ – cetogluturato	1,0g
Agar	17g
Água	1000mL

Após esterilização por autoclavação, foi adicionado 10mL de uma solução estéril de L-cisteína (4%) e pirofosfato férrico (2,5%).

#### 6 - Agar Sabouraud Dextrose (Himedia)

Peptona	10,0g
Dextrose	20,0g
Agar	15,0g
Água	1000mL

Todos os meios citados foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a pressão de 1atm e temperatura de 121°C e posteriormente, aproximadamente 20mL foi vertido em placas de petri descartáveis e armazenados em câmara fria.

#### 7 - Caldo amônio – carbonato de cálcio (*Nitrosomonas*)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,302g
------------------------------	--------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03g
NaCl	0,3g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3g
CaCO <sub>3</sub>	3,33g
Água destilada	1000mL

O carbonato de cálcio foi solubilizado primeiro com o auxílio de ácido clorídrico com homogeneização constante. Após completa solubilização, os outros reagentes foram adicionados.

A quantidade necessária (2mL e 5mL) foi transferida para tubos de ensaio que foram vedados com rolhas de algodão envoltos com gaze ou rolhas e esterilizados em autoclave por 15 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 121°C.

## 8 - Reagente de Griess-Ilosvay

### Solução A

Ácido sulfanílico	0,6g
Ácido clorídrico concentrado	20mL
Água destilada	80mL

O ácido sulfanílico foi dissolvido em 70mL de água destilada quente. Após resfriar a solução, foram adicionados 20mL de ácido clorídrico concentrado, diluindo a seguir a mistura para 100mL com água destilada e misturando bem.

### Solução B

α - naftalamina	0,6g
Ácido clorídrico concentrado	1mL
Água destilada	99mL

A  $\alpha$  - naftalamina foi dissolvida em 10 a 20mL de água contendo 1mL de HCl concentrado, diluindo em seguida para 100mL com água.

### Solução C

$\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	16,4g
Água destilada	100mL

O  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  foi dissolvido em água e completado o volume da solução para 100mL com água.

As soluções foram acondicionadas em vidros escuros, separadamente, e estocadas sob refrigeração. Após o período de incubação, partes iguais dos três reagentes foram misturadas e três gotas adicionadas na cultura a ser testada.

### 9 - Reagente de nitrato,

Difenilamina	50mg
Ácido Sulfurico concentrado	25mL

A difenilamina foi dissolvida em de ácido sulfúrico e a solução armazenada em frascos protegidos da luz por no máximo 14 dias.

### 10 - Meio Citrato Férrico Amoniacal (Ferrobactérias)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5g
$\text{NaNO}_3$	0,5g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5g
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
$\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2g
$\text{NaCl}$	12,0g

Citrato férrico amoniacal verde	10,0g
Água destilada	1000mL

A quantidade necessária (5mL) foi transferida para tubos de ensaio que foram vedados com rolhas de algodão ou roscas envoltos com gaze e ser esterilizados em autoclave por 15 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 120°C.

### 11 - Meio Postgate E modificado

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,67g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,68g
Lactato de Sódio	7,0mL
Extrato de Levedura	1,0g
Ácido Ascórbico	0,1g
Ágar-ágar	1,9g
NaCl	12,0g
Resazurina (0,025%)	4,0mL
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
Tioglicolato de sódio (1,25%)	10,0mL
Água destilada	1000mL

Os reagentes foram homogeneizados em água e submetidos a aquecimento para completa solubilização do Agar e a resazurina, indicador de oxigênio, ficasse transparente. A quantidade necessária (5mL na o dobro concentrado e 10mL concentração normal) foi transferida para tubos tipo penicilina, vedados com rolha de borracha, lacrados com lacre de alumínio e esterilizados em autoclave por 15 minutos sob pressão de 1atm e temperatura de 120°C.