

Copyright 2010, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2010, em Fortaleza/CE no mês de maio de 2010.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Análise de biofilmes em superfície metálica submetida a fluido oleoso com baixo BSW

¹Walter Barreiro Cravo Júnior, ²Karla de Avellar Mota, ³Ivani de S. Bott, ⁴Maria Isabel Pais da Silva, ⁵Mônica de Oliveira Penna

Abstract

The morphological analysis of biofilms formed on surfaces exposed to microorganism-carrying fluids is especially important in understanding the biocorrosion which can result from the presence of such films. In the oil industry, the deposition of biofilms is very common in product transfer systems such as pipelines, and often leads to intensified corrosion processes on the metallic surfaces of these pipes. Scanning electron microscopy (SEM) is performed to study the biofilms which form. When the films form on surfaces which are exposed to oil-rich fluids, the observation of the morphology of the biofilms becomes more difficult, as the fluid adheres to the samples. The current study was undertaken to evaluate the morphology of biofilms formed on the surface of API X80 steel in a dynamic flow system containing an oily fluid of low BSW.

Modifications were made to the standard sample preparation protocol in order to minimize any detrimental effects caused by remnants of oil on the SEM sample surfaces. Several new preparation protocols were evaluated and analyses were performed by SEM both to quantify the adhered microorganisms and the corrosion pits formed on the metal surface during the tests. Some of the tests included the introduction of biocide products into the oily fluid to permit an evaluation of the effect of such products on the morphology of any biofilms which formed. The results obtained revealed that modifications to the original sample preparation protocol permitted a significant improvement in the quality of the images obtained of the biofilms, and thereby, a better morphological characterisation. The presence of biocide resulted in a considerable reduction in the number of microorganism cells adhering to the sample surface and an alteration in the morphology of the films which formed.

Resumo

A análise morfológica de biofilmes formados sobre superfícies expostas aos fluidos carreadores de micro-organismos é de grande importância para uma melhor compreensão dos processos de biocorrosão ocasionados por estes. Na indústria do petróleo a deposição de biofilmes nos sistemas de escoamento de produção, como os oleodutos, é bastante comum, propiciando uma intensificação do processo de corrosão das superfícies metálicas destes dutos. Para a visualização dos biofilmes formados realiza-se análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para fluidos com alta concentração de óleo, a visualização

¹ Doutor, Engenheiro Químico – Pontifícia Universidade Católica (PUC-Rio)

² Mestre, Bióloga - Pontifícia Universidade Católica (PUC-Rio)

³ PHD, Física – Pontifícia Universidade Católica (PUC-Rio)

⁴ Doutor, Engenheira Química - Pontifícia Universidade Católica (PUC-Rio)

⁵ Mestre, Química de Petróleo – Petróleo Brasileiro S.A.

dos biofilmes formados fica dificultada comprometendo a análise morfológica destes biofilmes. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a morfologia dos biofilmes formados em superfície de aço API X80 em um sistema dinâmico de fluxo, utilizando-se fluido oleoso com baixo BSW. Para tanto realizaram-se alterações no protocolo original de preparo das amostras para análise por MEV a fim de minimizar os efeitos causados pela presença de alto teor de óleo. Foram comparados os diferentes protocolos através das análises por MEV. Também foram realizadas análises quantitativas dos microrganismos aderidos, bem como a contagem dos pites formados após o período de ensaio. Para alguns ensaios realizou-se a aplicação de produto biocida ao fluido oleoso a fim de avaliarmos possíveis alterações nas morfologias dos biofilmes formados. Os resultados obtidos revelaram que as alterações no protocolo original proporcionaram a obtenção de melhores imagens dos biofilmes, resultando em uma melhor caracterização morfológica dos mesmos. A presença de biocida ocasionou uma diminuição considerável do número de células aderidas e uma alteração na morfologia dos biofilmes formados.

Palavras-chave: Biofilme, Biocorrosão, Microscopia eletrônica de varredura, pites

Introdução

Atualmente bilhões de dólares são gastos pelas indústrias devido a problemas de corrosão, sendo em muitos casos intensificados pela ação de micro-organismos. Estima-se que, no Brasil, os prejuízos anuais causados com a corrosão chegam a somas equivalentes a 3,5% do Produto Interno Bruto (PIB), algo em torno de 10 bilhões de dólares (1). O percentual de participação dos micro-organismos nos processos de corrosão não é bem definido. Na Inglaterra calcula-se um custo de aproximadamente de 60 bilhões de dólares por ano ou 0,84% do PIB. Esses custos têm origens muito diversas e podem estar relacionados à paradas das instalações para substituição ou limpeza de estruturas corroídas, manutenção e substituição de elementos filtrantes ou de medição e remoção de depósitos biológicos em sistemas de armazenamento, tubulações e outros. A participação dos micro-organismos no processo apresenta algumas características e a mais significativa é a modificação na interface metal-solução devido a formação do biofilme. O biofilme pode ser considerado um material gelatinoso contendo 95% de água e uma matriz de substâncias exopolissacarídicas, na qual células microbianas e detritos inorgânicos estão suspensos (2). A formação do biofilme sobre superfícies metálicas é o resultado de um processo de acumulação não necessariamente uniforme no tempo e no espaço, que começa imediatamente após a imersão do metal em um ambiente aquoso. A compreensão dos fenômenos de deposição microbiana é de fundamental importância para a solução dos problemas ocasionados por estas formações. A obtenção de melhores imagens dos biofilmes formados pode proporcionar uma análise mais precisa dos produtos de corrosão formados, material extracelular produzido pelos micro-organismos constituintes dos biofilmes e mais precisamente dos micro-organismos que estão depositados nestas superfícies. Faz-se necessário então, o aprimoramento das técnicas de obtenção de imagens dos biofilmes depositados.

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar, através de análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e contagem microbiana, o desenvolvimento de biofilmes sobre superfície metálica na presença de fluido oleoso com baixo BSW e verificar a influência da formação dos biofilmes na presença de agente biocida.

Revisão bibliográfica

Os biofilmes microbianos são estruturas constituídas por comunidades de micro-organismos aderentes entre si e/ou a superfícies inertes ou vivas (existência sésil), envolvidas por matriz extracelular altamente hidratada. A superfície do biofilme é bastante adsortiva devido a sua natureza polieletrólítica, capaz de reter quantidades significantes de compostos orgânicos e inorgânicos do meio (3). Aproximadamente 80% - 90% da massa total dos biofilmes é constituída por água. As bactérias representam cerca de 70% do peso seco, enquanto o restante é atribuído aos elementos de matriz extracelular (4).

Nos primeiros momentos da formação do biofilme, bactérias sésseis encontram-se justapostas podendo formar microcolônias de espécies simples ou mistas (5). A microcolônia é a organização básica do biofilme em crescimento, podendo ser comparado ao tecido como organização fundamental na formação dos órgãos de organismos superiores. O ambiente interno de cada microcolônia é condicionado pelos elementos de matriz extracelular e pela atividade metabólica de suas células. Os biofilmes possuem um alto grau de organização, onde as bactérias se beneficiam da justaposição estável e da cooperatividade fisiológica para constituir uma comunidade funcional coordenada. Sabe-se, por exemplo, que essas populações microbianas aderidas se beneficiam dos nutrientes e são mais ativas metabolicamente do que as planctônicas (6).

A arquitetura dos biofilmes é formada por estruturas cônicas simples e por outras em forma de cogumelo. Essas estruturas formam poros e canais de água, pelos quais circulam os nutrientes entre microcolônias (7,8). As células em diferentes regiões de um biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética (9).

A formação de biofilmes é uma estratégia bacteriana universal para sobrevivência e posicionamento favorável em relação aos nutrientes disponíveis (10). Constitui, também, uma forma protegida de crescimento que permite a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis. O biofilme bacteriano pode atingir dimensões macroscópicas através da aderência de outros microrganismos (algas, fungos e protozoários) e /ou de macro-organismos (cracas, mexilhões, etc.) adquirindo a denominação de “biofouling”. O termo “fouling” (incrustação, acumulação de resíduos, depósitos, sujeira, etc.) está relacionado à formação indesejável de depósitos orgânicos e/ou inorgânicos em superfície, podendo causar problemas como, por exemplo, diminuição do fluxo de calor através de uma superfície em sistemas de resfriamento e o aumento de sua taxa de corrosão (11). A morfologia dos biofilmes e consistência variam dependendo dos tipos de bactérias presente e das condições do meio que o envolve. O tempo necessário para a formação de um biofilme maduro pode variar de alguns dias até várias semanas. Com o aumento da espessura do biofilme, fica prejudicada a difusão de gases dissolvidos e outros nutrientes vindos do meio para o substrato. Nesse caso, as condições podem se tornar inóspitas para as bactérias localizadas na base do biofilme, e que se encontram distantes dos canais de água; como consequência, essas bactérias acabam morrendo. A competição por nutrientes também faz com que sejam perdidas muitas das vantagens da vida protegida dentro dos biofilmes. As células mais superficiais tendem a se desprender, indo colonizar novas áreas. O deslocamento das bactérias para novas áreas também serve para dispersar o genótipo e, portanto, para expandir a diversidade genética. Com a necessidade nutricional e com a base do biofilme abalada devido à morte de bactérias, o estresse causado pelo fluxo do meio e mecanismos de sinalização celular denominados “quorum sensing” (sensibilidade à densidade celular, ou ao quorum) ocorre o desprendimento de partes do biofilme, expondo áreas descobertas na superfície. O “quorum sensing” é causado por um acúmulo de moléculas de baixo peso molecular que, uma vez atingindo uma concentração limiar crítica, constituem sinais para

que células individuais “sintam” que o limite da densidade populacional bacteriana foi atingido e iniciem uma resposta coordenada pela população (12).

O conhecimento sobre os biofilmes tem sido adquirido através de observações microscópicas e por análises bioquímicas e taxonômicas. A microscopia eletrônica trouxe um avanço considerável para a Microbiologia e é uma técnica muito utilizada para o estudo dos biofilmes. A microscopia eletrônica de varredura (MEV), além das análises ultra-estruturais convencionais, oferecem, como apoio metodológico, análise de imagens espectroscópicas (ESI) e microanálise de raio-X (EDS). Estas técnicas são eficientes na localização e identificação de elementos químicos presentes nas moléculas das SPE, na estrutura das bactérias e em outros elementos do biofilme bacteriano (13). A preparação de amostras biológicas para observação em MEV, necessita de um protocolo especial. A literatura apresenta vários trabalhos utilizando diferentes protocolos para amostras com formação de biofilme em diversos meios de cultivo, porém não foram encontrados trabalhos com formação de biofilme em estudo dinâmico na presença de fluido oleoso.

Existem métodos físicos e químicos de fixação de amostras biológicas. Os métodos físicos são a secagem ao ar e a criofixação, já os métodos químicos ocorrem através de substâncias químicas como aldeído glutárico, tetróxido de ósmio, formaldeído e outros. A fixação é o processo pelo qual se obtém estabilização das estruturas celulares e intercelulares. A fixação por melhor que seja realizada, inevitavelmente introduzirá perturbações no sistema.

Segundo Penna (14) o protocolo de preparo de amostras biológicas para MEV foi realizado fixando a amostra em 5,0% de glutaraldeído em 0,1M de solução de tampão Cacodilato de sódio, posteriormente é feita uma bateria de dessalinização (15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%) e depois a bateria de desidratação com a mesma porcentagem da anterior. As amostras são levadas ao ponto crítico e depois metalizadas.

Estudos realizados por Barreto (15) utilizaram um tratamento prévio com vapor de ósmio por 24 horas e depois foram fixadas com glutaraldeído por 3 horas. As amostras depois da fixação foram desidratadas em bateria de etanol à 4° C e levadas ao ponto crítico e depois metalizadas.

O presente trabalho só realizou fixação com métodos químicos, onde foram empregadas substâncias que reagem com determinados sítios das biomacromoléculas estabilizando-as. A fixação química além de estabilizar as moléculas visa torná-las, ao mesmo tempo, condutoras. Na formulação do fixador, ajustam-se as condições ideais de concentração, pH, molaridade, etc., de acordo com o material. O fixador é geralmente aplicado à temperatura ambiente, por imersão. O tempo de ação do fixador pode ser de algumas horas a vários dias, quando o objetivo é aumentar a rigidez do espécime .

O tetróxido de ósmio é um fixador já utilizado desde o começo do século XX para obtenção de uma melhor preservação citológica ao nível do microscópio ótico. Esta substância foi utilizada pela primeira vez por Palade em 1952 no preparo de amostras para microscopia eletrônica. O tetróxido de ósmio protege as lipoproteínas naturais das células e dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. O tetróxido de ósmio estabiliza e contrasta especialmente os fosfolípídeos constituintes da membrana citoplasmática.

A amostra é fixada por agentes químicos que a tornam resistente, é desidratada com acetona ou etanol que posteriormente serão substituídos por gás carbônico liquefeito, na câmara do aparelho de ponto crítico. O CO₂ líquido é lentamente aquecido, e passa imperceptivelmente da fase líquida para a gasosa; a expansão deste gás dentro da câmara faz a pressão subir, até acima da pressão crítica do CO₂ (73 atm). Mantendo-se a temperatura da câmara acima de 31° C (temperatura crítica do CO₂) não há risco de liquefação do gás. Nesta transição de fase gradual, a densidade da fase líquida iguala àquela da fase gasosa. Portanto,

a tensão superficial é zero e o espécime é seco sem a ultrapassagem de nenhum limite de fases, isto é, sem o efeito das forças atuantes de tensão superficial. Após a despressurização lenta da câmara até à pressão atmosférica, o espécime é removido seco da câmara, sem alterações sensíveis de forma (16).

A deposição de metais (Ag, Au) por pulverização catódica nas amostras biológicas de modo a torná-los bons condutores térmicos e elétricos é fundamental para se obter as imagens. A camada condutora é geralmente ouro ou carbono, evaporados em vácuo. O metal é usualmente depositado pelo processo de "sputtering", embora possam também ser evaporados em alto vácuo. No sistema de "sputtering" o depósito do metal é bastante eficiente, mesmo em objetos muito irregulares, pois os átomos atingem sua superfície oriundos de todas as direções. Tanto os espécimes, como as lamínulas de vidro ou as fitas adesivas usadas na montagem são isolantes elétricos e ficam carregados negativamente durante a varredura do feixe eletrônico. Devido ainda à irradiação do feixe, a amostra pode ficar aquecida e, se for sensível, pode mover-se ou mesmo ser destruída durante a observação no MEV (17).

Materiais e Métodos

Material

Foram confeccionados por usinagem, corpos-de-prova em aço API X80, material usado em dutos de petróleo, para todos os testes. A composição química, dada em porcentagem em peso, do aço utilizado está apresentada na tabela 1. A diferença no balanço de massa representa o percentual de ferro.

Antes dos testes os cupons foram jateados com microesfera de vidro em equipamento Poloar, cabine pp 50 para retirada de impurezas e incrustações. Após o tratamento descrito, os cupons foram colocados em acetona por 24 horas.

Fluido de processo

Foi utilizado óleo cru proveniente da produção de plataformas de petróleo localizados no ativo norte da Bacia de Campos – RJ. Este óleo foi coletado no terminal de Barra do Furado. A temperatura do local de coleta foi de aproximadamente 23° C e salinidade de 70g/L. O óleo apresenta um BSW (Basic Sediments Water) de 1%. Devido a limitação da capacidade de bombeio do sistema dinâmico utilizado, foi necessária à adição de 12% v/v de gasolina em 25L de fluido oleoso. O fluido oleoso utilizado para o ensaio apresentou então viscosidade $\eta = 0,02068\text{Pa}\cdot\text{s}$ (figura 2). Foi utilizado o mesmo fluido para todos os testes. No início dos experimentos foi realizada bioalimentação do sistema com culturas de BANHT e BRS mantidas no laboratório.

Foi utilizado um sistema dinâmico (Figura 3), fechado, onde tanto a base quanto a tubulação foram confeccionados em polipropileno. A tubulação possuía 1,9 cm de diâmetro interno, entrada para 20 corpos de prova, conectados a um reservatório de 25 litros de capacidade com tampa de acrílico. Todas as conexões foram feitas com material polimérico. Foi acoplado ao sistema um rotâmetro para medida da vazão, e sistema de registro para controle da vazão. Este equipamento simula as condições de campo, onde a vazão não varia durante o processo. Os dados do processo estão mostrados na tabela 2:

A circulação do fluido foi realizada com auxílio de uma bomba magnética NH-30PX-T em polipropileno, Motor 10 Watts e 220 Volts, conexão de sucção $\varnothing 3/4"$ Rosca NPT-M, conexão de descarga $\varnothing 3/4"$ Rosca NPT-M, Rotor $\varnothing 62$ mm, montagem horizontal, selagem

com acoplamento magnético, vazão de 8,3 LPM, pressão de descarga 3,0 m.c.a., pressão de sucção afogada, densidade 1, à temperatura ambiente.

Com a finalidade de simular as condições de escoamento de óleo nos oleodutos e as condições de crescimento das culturas mistas sésseis e planctônicas antes e após o tratamento com produto biocida, foram realizados ensaios em 3 etapas. Para a primeira etapa foram colocados 15 corpos-de-prova no sistema, onde a cada período de tempo eram retirados 3 corpos-de-prova (2 para MEV e 1 para análise microbiológica e contagem de pites) constituindo o ensaio 1. Após a retirada de todos os corpos-de-prova do ensaio 1 foram colocados 10 corpos-de prova e expostos por 15 dias para a formação do biofilme, em seguida foram acrescentados mais 10 corpos de prova, completando os 20 espaços do sistema. Foram adicionados então 30 ppm do agente biocida THPS. Após 24 horas da adição do biocida iniciou-se a avaliação da cinética de formação do biofilme (ensaio 2) e a avaliação do comportamento do biofilme já formado (ensaio 3). Abaixo estão descritos mais detalhadamente as etapas realizadas.

Ensaio 1 – Avaliação da cinética de formação do biofilme em fluido oleoso

Avaliação da cinética de formação do biofilme para períodos de 24, 96, 168, 264 e 360 horas por microscopia eletrônica e contagem bacteriana. Foram avaliados 15 cupons, sendo 5 para análises por MEV em amostras submetidas ao protocolo 1 de preparo (1 cupom para cada tempo), 5 para análises por MEV em amostras submetidas ao protocolo 2 de preparo (1 cupom para cada tempo) e 5 para contagem bacteriana (1 cupom para cada tempo). Foram analisadas bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias anaeróbicas heterotróficas (BANHT).

Ensaio 2 – Avaliação da cinética de formação do biofilme com adição prévia de THPS

Avaliação da cinética de formação do biofilme nos períodos de 24, 96, 168, 264 e 360 horas por MEV e contagem bacteriana, sob a influência de 30ppm de agente biocida THPS (sulfato tetrakis(hidroximetil)fosfônio). Foram analisados 10 cupons, sendo 5 para análises de microscopia (1 cupom para cada tempo) e 5 para contagem bacteriana (1 cupom para cada tempo). Foram quantificados os mesmos grupos bacterianos do ensaio 1. Para a análise por MEV foi utilizado o protocolo 1 de preparo de amostra.

Ensaio 3 – Avaliação da cinética de formação do biofilme com adição posterior de THPS

Avaliação da influência da adição de THPS (concentração 30ppm) sobre o biofilme já formado, a retirada dos cupons ocorreram nos períodos dos ensaios anteriores (24, 96, 168, 264 e 360 horas). Foram analisados 10 cupons, sendo 5 para análises de microscopia (1 cupom para cada tempo) e 5 para contagem bacteriana (1 cupom para cada tempo). Foram quantificados os mesmos grupos bacterianos do ensaio 1. Para a análise por MEV foi utilizado o protocolo 1 de preparo de amostra.

Para ambos os ensaios, após a retirada do sistema, os cupons destinados a contagem microbiana eram recolhidos em frascos contendo solução redutora, submetidos a raspagem do biofilme e posterior tratamento com ultra-som (choque de 5s), a suspensão celular formada era utilizada para as quantificações bacterianas. Foram utilizados meios de cultura específicos para as bactérias avaliadas, como descrito (...). As bactérias foram inoculadas através da técnica das diluições sucessivas e posteriormente quantificadas obtendo-se ao final do período de incubação para cada grupo (28 dias à $30\pm 1^\circ\text{C}$) o número mais provável de células (NMP). Os cupons destinados para análise por microscopia eletrônica de varredura foram coletados em solução de tampão cacodilato contendo Tween 80. Para o

ensaio 1 foram utilizados dois protocolos diferentes de preparo das amostras para análise por MEV . Abaixo estão descritos tais protocolos:

Protocolo 1 – os cupons foram lavados em solução de tampão cacodilato 0,1M com 3 gotas de tween 80 por 30 minutos, depois fixados por 3 horas em solução de glutaraldeído 5% em tampão de cacodilato 0,1M, pH 7,6 a temperatura ambiente. Após a retirada do fixador os cupons foram lavados novamente em solução de tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos, e em seguida, dessalinizados e parcialmente desidratados. A dessalinização consistiu em lavagens sucessivas em soluções contendo água do mar sintética esterilizada e água destilada também estéril em diferentes proporções, começando da solução mais concentrada (30% de água destilada) até chegar a 100% de água destilada. Para a etapa de desidratação mergulha-se a amostra em diversas soluções apresentando concentrações crescentes de acetona em água destilada entre 30% v/v e 100% v/v.

Protocolo 2 – Após a retirada do sistema, os cupons foram lavados em solução de tampão cacodilato 0,1M com 3 gotas de Tweem por 30 minutos, depois fixados por 3 horas em solução de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,6 a temperatura ambiente e protegido da luz. Após a retirada do fixador os cupons foram lavados novamente em solução de tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos, e em seguida, pós-fixados por 1 hora em tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato 0,1 M no escuro. Após esta etapa o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente.

Para as duas metodologias a secagem das amostras era concluída no aparelho de Ponto Crítico modelo CPD-030 do fabricante Balzers. Após estes procedimentos as amostras foram metalizadas no equipamento Sputter Coater Bal-Tec SCD 005 com alvos de prata (Ag) e com Carbon Evaporation Supply Bal-Tec CEA 035. Posteriormente, foi realizada análise por MEV e EDX utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Leica S440 (Figura 31), equipado com sistema de microanálise por dispersão de energia (EDS) Link ISIS L300 com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II, de resolução de 133 eV para 5,9 keV e software para operação automática, inclusive do MEV. A metalização com a prata tem o objetivo de visualizar o enxofre presente na amostra através da análise de EDS, tendo em vista que outros metais como o ouro, se superpõem ao pico do enxofre, impossibilitando a sua visualização.

Para os demais ensaios (2 e 3) Foi utilizado o protocolo 1 de preparo de amostras.

Para a contagem dos pites formados a medida que os cupons eram retirados do sistema, eram preservados em verniz. Após secagem dos cupons, estes foram acondicionados em dessecador. Antes de realizar o procedimento para contagem de pites, as amostras foram submetidas ao ultrassom por 25 minutos com acetona para remoção do verniz. Após esta etapa a acetona foi retirada e às amostras foram colocadas em solução de Clarke por 10 minutos, lavadas em água e preservadas em acetona. O processo foi realizado em capela.

As amostras após o procedimento foram levadas ao microscópio ótico utilizando como auxílio o programa Axion Vision. A contagem de pites foi realizada conforme a norma Standard Guide for Examination and Evaluation of Pitting Corrosion (G 46-94) – Annual Book of ASTM Standard, onde são analisadas 15 (quinze) áreas de $1.47E^{-6} \text{ m}^2$. Para cada pite foram medidas a área (abertura) e a profundidade.

Resultados e Discussão

Quantificação microbiológica nos ensaios realizados

Foi realizada a quantificação das bactérias planctônicas no início e no final dos experimentos. Avaliou-se o crescimento de BANHT, BRS. Os resultados (tabela 3) mostraram uma diminuição do número de células viáveis, para os dois grupos bacterianos, ao final dos experimentos. Para o ensaio 1 estes resultados evidenciam um ambiente desfavorável nutricionalmente para a propagação celular. Para os ensaios 2 e 3 pode ser uma evidência da ação biocida. Para os ensaios 2 e 3 não foi detectada a presença de BRS e o número de células cultiváveis de BANHT também diminuiu uma ordem de grandeza em relação ao período anterior a adição do biocida. Estes resultados demonstraram uma maior resistência do grupo das BANHT em relação as BRS. Convém ressaltar que este grupo apresenta uma maior abrangência de espécies bacterianas quando comparado com o grupo da BRS, o que aumenta a probabilidade de existência de espécies mais resistentes a ação biocida.

Convém ressaltar que para os ensaios 2 e 3 foi utilizado o mesmo fluido, sendo portanto o mesmo número de células planctônicas. A tabela 3 apresenta estes resultados.

A concentração de bactérias planctônicas presentes no fluido de processo exerce um papel fundamental na determinação da taxa inicial de colonização microbiana da superfície. Após a adesão, a população bacteriana sésil torna-se independente da planctônica (18).

Os resultados da contagem de bactérias sésseis evidenciam que o grupo das BANHT foi o único que demonstrou capacidade de adesão e viabilidade celular nas condições experimentais ensaiadas. A figura 4 apresenta os resultados do monitoramento deste grupo ao longo do tempo de processo para os 3 ensaios. Observa-se que com 96 horas de exposição houve uma diminuição da concentração celular no biofilme. Este fato pode ser explicado pela instabilidade do biofilme neste momento. Possivelmente, neste período inicial, o biofilme não está fortemente aderido (maduro). Devido ao regime turbulento de fluxo ocorre o fenômeno de destacamento ocasionando uma diminuição do número de células aderidas. Este fenômeno foi mais evidente para o ensaio 1. Nota-se que independente da adição ou não de biocida este fenômeno é sentido. Para o ensaio 1 no entanto, após 168 horas de processo ocorre uma recuperação do número de células viáveis atingindo um valor máximo ao final do experimento (360 horas). Para o ensaio 2 a diminuição do número de células viáveis se mantém até as 264 horas de processo só havendo recuperação ao final do experimento. Para o ensaio 3 com 264 horas já observa-se uma recuperação bacteriana que também atinge um valor máximo ao final do experimento. Estes resultados evidenciam que a ação do biocida sobre o biofilme já formado é menos efetiva comparada a adição antes da formação do biofilme. Como reportado na literatura (19) uma vez formado o biofilme a ação biocida é menos efetiva devido aos diversos mecanismos de defesa realizados pelos microrganismos como a produção de material polimérico extracelular.

As imagens por MEV (figura 5) evidenciaram que após 24 horas de exposição ao fluido oleoso, os cupons apresentam depósitos irregulares na sua superfície, possivelmente de produtos de corrosão, sem formação de biofilme. Após 96 horas é possível observar o início da formação de matriz extracelular. Para o ensaio 1 não é detectada a presença de bactéria. Para os ensaios 2 e 3 observa-se a presença de material extracelular e bactérias isoladas, não caracterizando a presença de biofilme. Com 168 e 264 horas de exposição ainda não é observada a presença de biofilme apenas de material polimérico. Após 360 horas de processo observa-se grande quantidade de material extracelular, o que é um indicativo da presença de micro-organismos. Para o ensaio 1 não foram observadas bactérias. Para o

ensaio 2 observa-se bactérias isoladas e para o ensaio 3 evidencia-se a presença de um biofilme maduro. A dificuldade de observação dos micro-organismos presentes nos biofilmes através das imagens por MEV, evidencia a necessidade de um tratamento diferenciado nas amostras que são submetidas a fluido com alto teor de óleo. Foi realizada, neste trabalho, alteração no protocolo 1 de preparo de amostras a fim de obtermos imagens mais representativas do processo. Estes resultados serão apresentados posteriormente.

As análises de EDS (Figura 6) realizadas nos cupons de 360 horas de exposição mostram para o ensaio 1 maiores teores de carbono e oxigênio e menores teores de ferro. Este resultado representa a região com maior concentração de material polimérico extracelular. Para o ensaio 2 observa-se a presença de sulfeto, possível produto do metabolismo bacteriano. Outros produtos como óxidos, hidróxidos e carbonatos também podem estar presentes, misturados na matriz extracelular. Foi observada a mesma característica no ensaio 3.

Foi realizada a contagem dos pites formados nos cupons expostos ao fluido oleoso para os mesmos períodos do monitoramento microbiológico e de imagem. A figura 7 apresenta os resultados destas contagens.

Observa-se um perfil de comportamento semelhante ao monitoramento bacteriano. Para o ensaio 1 ocorre uma pequena diminuição da densidade de pites com 96 horas de exposição e posteriormente um aumento gradativo até ao final do experimento. Para o ensaio 2, com 96 e 264 horas de processo ocorre uma menor densidade de pites havendo um aumento com 360 horas de experimento. Para o ensaio 3 com 168 horas de processo é apresentado o menor valor de densidade, perfil análogo a quantificação bacteriana. Esta semelhança de comportamento entre o número de células viáveis e a densidade de pites, evidencia a forma de corrosão ocasionada pelas bactérias envolvidas no processo.

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

Para o ensaio 1 realizou-se a preparação de amostras para análise por MEV também segundo o protocolo 2 a fim de compararmos as imagens obtidas após a utilização das duas metodologias. A figura 8 apresenta as imagens obtidas.

Para as imagens obtidas após preparo das amostras de acordo com o protocolo 2, onde foi realizada uma alteração utilizando uma pós-fixação com tetróxido de ósmio, foi possível observar mais detalhe do biofilme na superfície metálica. O tetróxido de ósmio protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. Essa observação não foi detectada apenas na análise de imagem mas também ao longo do processo de dessalinização e desidratação. Quando comparamos os procedimentos realizados para o protocolo 1 e 2, observamos que no primeiro, a medida que passamos pelas etapas de dessalinização e desidratação o óleo presente no fluido vai sendo retirado ao longo destes. Para o protocolo 2 não ocorre este despreendimento. Os micro-organismos presentes encontram-se na interface óleo-água. Com o despreendimento do óleo, possivelmente são arrastados micro-organismos ocasionando uma diminuição destes nos biofilmes observados. Este fato pode ser constatado pela imagem do biofilme após 360 horas de exposição. Para o protocolo 1 não foi observada presença de bactéria, diferentemente do protocolo 2 onde pode ser observada grande concentração bacteriana.

Conclusões

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que a presença de fluido com alto teor de óleo retarda a formação de um biofilme maduro. A adição de biocida anterior a formação de biofilme promove uma cinética de deposição também mais lenta sendo formado um biofilme maduro apenas com 360 horas de processo. Pode-se concluir também que a utilização de tetróxido de ósmio no preparo de amostras para análise por MEV, proporcionou uma melhor fixação das bactérias presentes nos biofilmes sendo, portanto, uma estratégia importante no preparo de amostras para obtenção de imagens mais representativas dos biofilmes formados.

Referências bibliográficas

- (1) Revista TI (Tecnologia da informação no setor de petróleo e gás). **De olho no planeta e na alta tecnologia** ano 7 número 30 Setembro. VIANA, C. 2008.
- (2) VIDELA, H.A. **Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais**, ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2003.
- (3) CHARACKLIS, W.G. Fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnol Bioeng** 23, 1981.
- (4) MARSH, P.D. & BRADSHAW, D.J. Dental plaque as a biofilm. **Journal Ind Microbiol** 15; 169-175. 1995.
- (5) COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R. & LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu Rev. Microbiol** 49: 711-745. 1995.
- (6) FERRIS, F.G.; SCHULTZE, S.; WITTEN, T.C.; FYFE, W.S. & BEVERIDGE, T.J.. Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. **Appl Environ Microbiol** 55; 1249-1257. 1989.
- (7) De Beer, D.; SRINIVASAN, R. & STEWART, P.S.. **Direct** measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Appl Environ Microbiol** 12: 4339-4344. 1994.
- (8) STOODLEY, P.; BOYLE, J.D.; De Beer, D. & LAPPIN-SCOTT, M.. Envolving perspectives of biofilm structure. **Biofouling** 14 (1): 75-90. 1999.
- (9) DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W. & GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science** 280: 295-298. 1998.
- (10) 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**. Ann. Rev. Microbiol. 41: 435 – 464.
- (11) CHARACKLIS, W.G. Fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnol Bioeng** 23: 1927-1960. 1981.
- (12) FUQUA, W.C.; WINANS, S.C. & GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal Bacteriology** 176: 269-275. 1994.
- (13) FLETCHER, M. Bacterial biofilms and biofouling. **Curr Opin Biotechnol** 5: 302-306. 1994.
- (14) PENNA, M.O. **Avaliação de Bases Ativas Biocidas para Controle de Microrganismos em Sistemas de Recuperação Secundária de Petróleo**. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica. 2004.

- (15) BARRETO, M.; MEYER, J.J.M. The preservation of biofilmes on macroalgae by osmium vapor. **Journal of Botany**. 2007.
- (16) SOUZA, W. **Livro – Técnica de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas**. 2 ed. 1 - 357 . 2003.
- (17) CASTRO, L.A.S. **Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. Embrapa – Documento 93. 2002.
- (18) FERRIS, F.G.; SCHULTZE, S.; WITTEN, T.C.; FYFE, W.S. & BEVERIDGE, T.J. Metal interations with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. **Appl Environ Microbiol** 55; 1249-1257. 1989.
- (19) RUSESKA, I.; ROBBINS, J. & COSTERTON, J.W. Oil & Gas Journal. **Biocide testing against corrosion-causing oil field control plugging**. 80: 253. 1992.



Figura 1 – Suporte com o corpo de prova

Tabela 1 – Composição química dos aços API X80 (% em peso).

Aço X80	C	Mn	Si	P	S	Nb	V	N	Ti	Cr	Mb	Al
	0,05	1,77	0,22	0,015	0,003	0,068	0,020	0,030	0,018	0,13	0,26	0,030

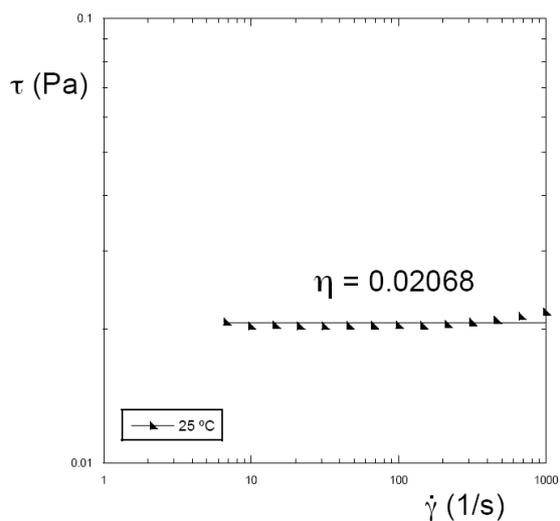


Figura 2 - Análise da viscosidade do óleo



Figura 3 – Sistema dinâmico.

Tabela 2 – Dados do processo.

• Vazão: 8,3 LPM	• Temperatura: 32±1 °C
• Velocidade de escoamento: 0,5 m/s	• Regime de processo: Turbulento Re= 9.481

Tabela 3 - Crescimento de bactérias Planctônicas nos ensaios 1, 2 e 3

Tempo de processo (horas)	BANHT		BRS	
	Ensaio 1	Ensaio 2 e 3	Ensaio 1	Ensaio 2 e 3
24	6,90E+04	3,30E+03	6,90E+03	1,1E+01
360	3,30E+03	6,90E+02	1,1E+01	ND

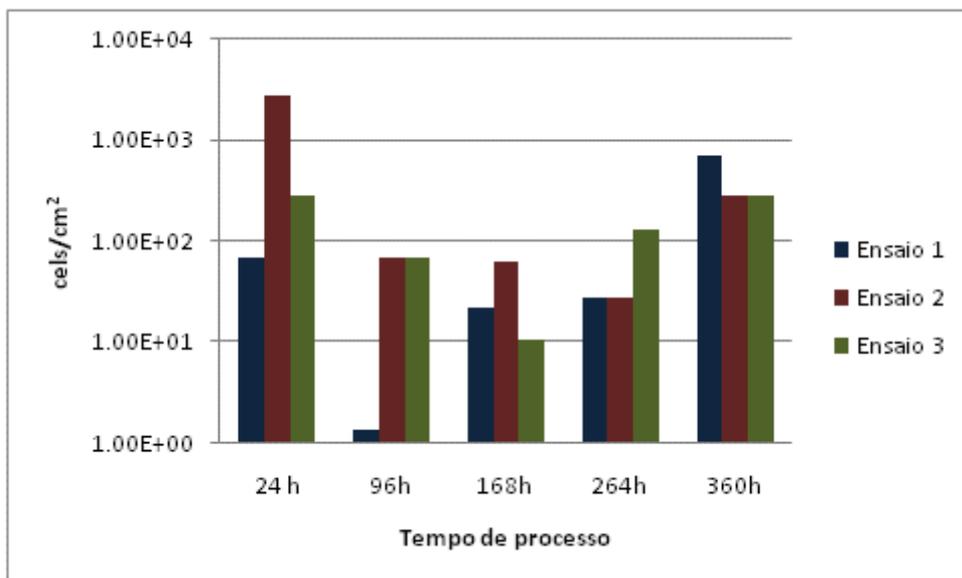


Figura 4 - Cinética de formação de biofilme em condições dinâmicas

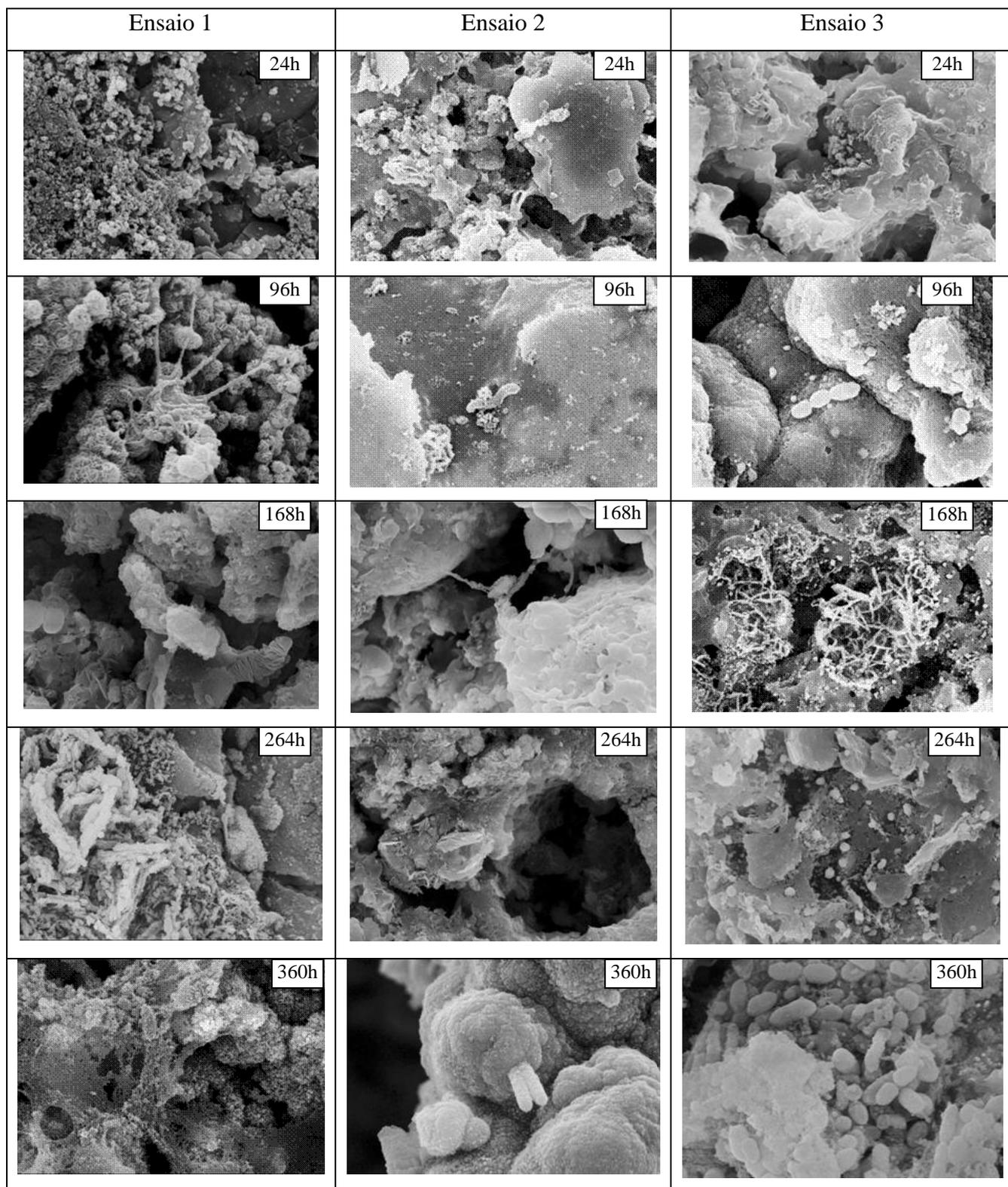


Figura 5 – Cinética de formação do biofilme – Análise por MEV (aumento 20KX)

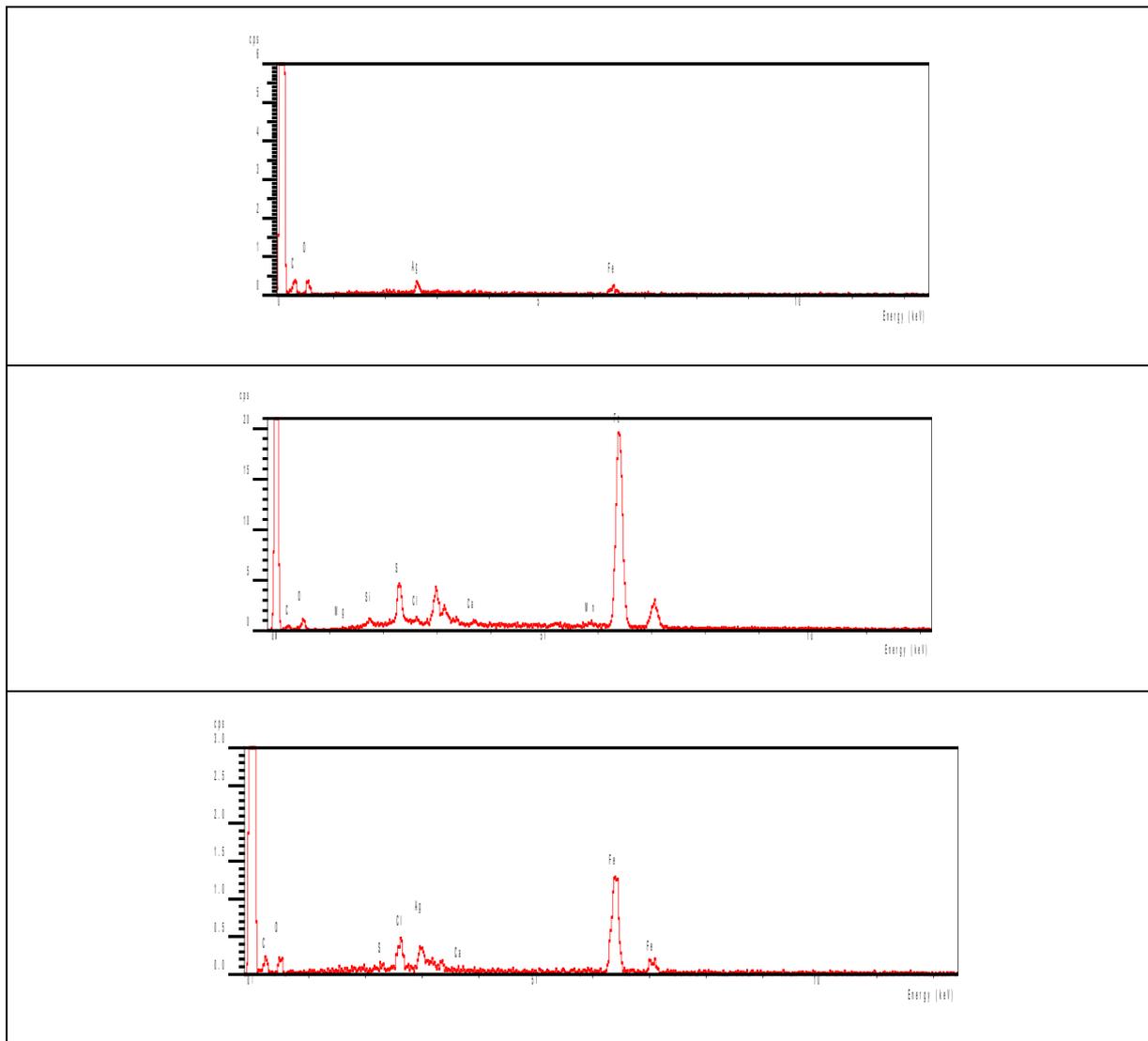


Figura 6 – Análise por EDS – cupons expostos por 360 horas

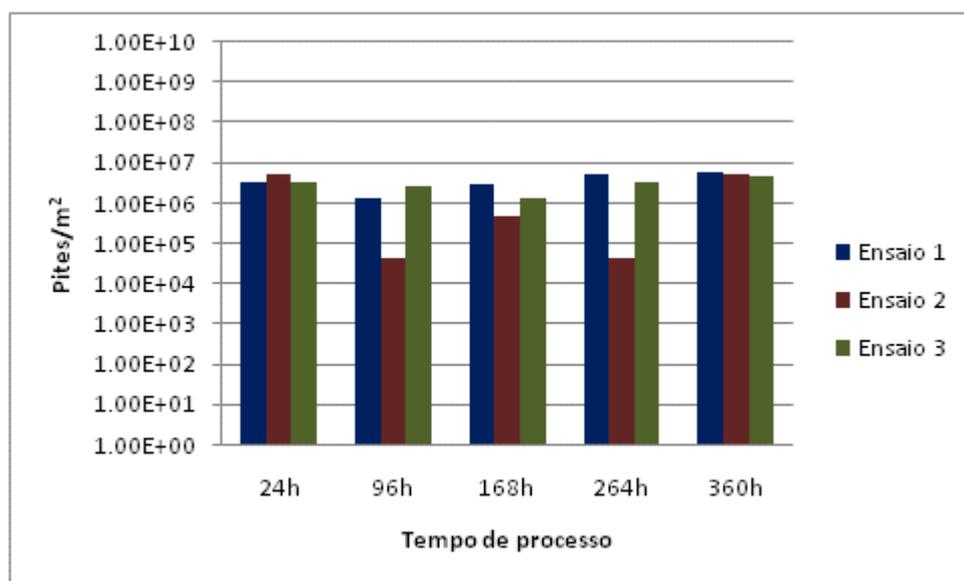
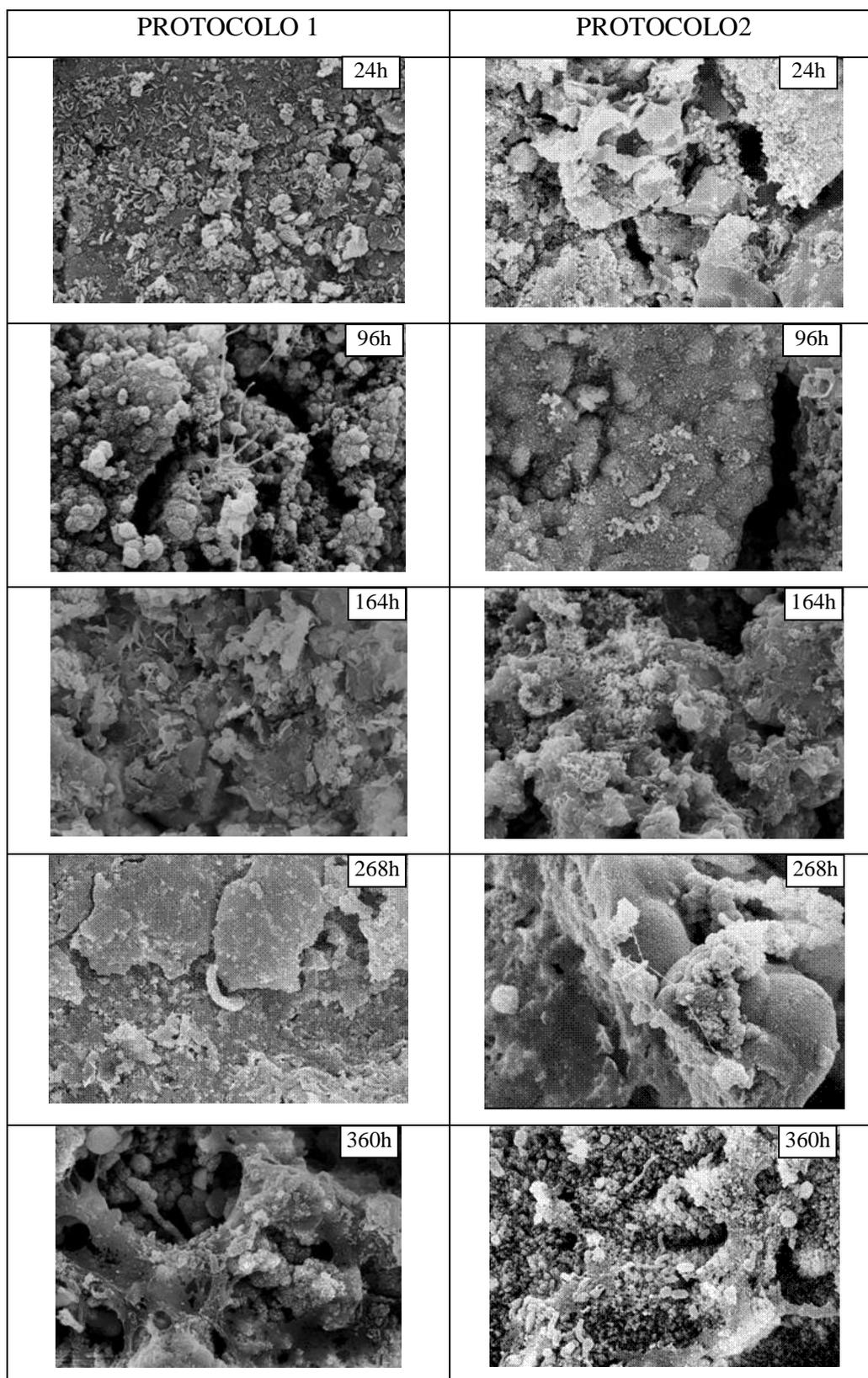


Figura 7 – Análise da densidade de pites nos ensaios realizados**Figura 8 - Cinética de formação do biofilme (ensaio 1) – Análise comparativa das imagens por MEV (aumento 10KX) obtidas após preparo por dois protocolos diferentes.**