

Copyright 2012, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2012, em Salvador/BA no mês de maio de 2012.

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

Estudo do desenvolvimento de micro-organismos utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica

Marcos A.C. Berton^a, Regina S.M. Amaral^b, Fernando S.C. Azevedo^b, Leonardo H.L.S. Oliveira^b, Denis R.A. Fernandes^{b*}, José C. Cardoso Filho^c, Patricia R. Dalzoto^{d1}, Vânia A. Vicente^{d2}, Ida C. Pimentel^{d3} Paulo R.D. Marangoni^{d4}

Abstract

The Tucuruí Hydroelectric Plant has a dam with 2850 km² of flooded area and 8005 m of length and 78 m of deep (free-board). The presence of micro-organisms in the interface metal / water of dam of the plant can cause damage to the efficiency of producing electricity and useful life of equipment. Microorganisms can trigger various processes such as corrosion, clogging and fouling on metal surfaces. In this paper an electrochemical study by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and microbiological adhesion of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* onto platinum electrode are presented. Using fermentation bioreactor for the production of biofilm, EIS measurements, count of colony forming units (CFU / mL) by spectrophotometry UV / VIS optical bench and metallographic analysis of the surface colonized, it was possible to investigate the phenomena involved in colonization and biofilm development. The optical images show the formation of biofilm with 15 min of culturing of the bacteria and the presence of polymeric extracellular materials in 1.5 h. The effect of biofilm formation and the growth on the response of EIS has been studied using equivalent circuit analysis.

Keywords: corrosion, biofilm, microbiologic corrosion, UHE-Tucuruí.

Resumo

A Usina Hidrelétrica de Tucuruí possui reservatório de água com 2850 km², formada por uma barragem de 8005 m de extensão e 78 m de profundidade (cota da crista). A presença de micro-organismos na interface metal/água do reservatório da usina pode trazer danos de elevada gravidade na eficiência de produção de energia elétrica e na vida útil de equipamentos. Micro-organismos podem desencadear vários processos, tais como a corrosão, entupimentos e incrustações nas superfícies metálicas. Este trabalho apresenta um estudo eletroquímico por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microbiológico da adesão da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* sobre um eletrodo de platina. Utilizando-se fermentação em biorreator para produção de biofilme, medidas de EIE, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC / mL) por espectrofotometria UV/VIS e análise ótica em banco metalográfico da superfície colonizada, foi possível investigar os fenômenos envolvidos na colonização e na formação do biofilme. As imagens óticas evidenciam a formação do biofilme a partir de 15 min de cultivo da bactéria e a presença do MPE a partir de 1,5 h. O efeito da formação e crescimento do biofilme sobre a resposta de EIE foi estudado utilizando análise de circuito equivalente.

^a Doutor, Pesquisador Senior, LACTEC

^b Sistema Eletrobras/Eletronorte – ^{b1} Eng. Química, Eng. Química, ^{b2} Eng. Químico, Eng. Químico, ^{b3} Técnico, técnico, ^{b4} Eng. Mecânico, Gerente.

^c Doutor, Prof. Adjunto – UFPA

^d Universidade Federal do Paraná - UFPR, ^{d1} Doutora, Prof^a Adjunta, ^{d2} Doutora, Prof^a Adjunta, ^{d3} Doutora, Prof^a Associada, ^{d4} Mestre, Aluno de Doutorado.

Palavras-chave: corrosão, biofilme, corrosão microbiológica, UHE-Tucuruí,

Introdução

A corrosão induzida por micro-organismos está sempre associada a biofilmes, os quais se desenvolvem progressivamente sobre superfícies metálicas. Os biofilmes são compostos de metabólito polimérico extracelular – MPE – (lipídios, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) e um consórcio de micro-organismos tais como bactérias, algas, fungos, etc. As características na interface metal/biofilme são alteradas pelo metabolismo dos micro-organismos presentes no biofilme. Um exemplo de metabolismo é a produção de MPE secretados por estes micro-organismos (1) e modificações no nível de secreção de fatores responsáveis pela comunicação entre células individuais, através da liberação de uma molécula de sinalização a partir da bactéria para coordenar seus esforços gerando um comportamento multicelular, conhecido na literatura microbiológica como *quorum sensing* – QS (2). Bactérias do gênero *Pseudomonas sp* estão entre os micro-organismos mais comumente envolvidos com a formação de biofilmes e *quorum sensing*, especificamente a *Pseudomonas aeruginosa* (3).

Sobre um metal em contato com água, podem ocorrer processos biológicos e processos inorgânicos, cujo resultado é a corrosão. Ambos os fenômenos modificam de forma intensa o comportamento da interface metal/solução. Os processos biológicos (*biofouling*) e os processos inorgânicos (corrosão) ocorrem de forma simultânea, mas seguem direções opostas. O *biofouling* é um processo de acumulação de micro-organismos, algas, etc., que se dirige do seio do líquido para a superfície metálica, já a corrosão transcorre no sentido oposto, da superfície metálica (que se dissolve) para o seio do fluido. Como consequência de ambos os processos, forma-se uma nova interface metal/solução, onde ocorre o desenvolvimento da corrosão microbiológica (4). A presença de micro-organismos e seus metabólitos (MPE) pode desencadear vários processos, dentre os quais, a corrosão influenciada por micro-organismos (CIM), entupimentos e incrustações (5,6). Os estudos dos mecanismos envolvidos neste processo fornecem suporte para que estratégias mais efetivas possam ser traçadas e efetivamente atingir estes micro-organismos (7) podendo, assim, estabelecer um controle eficaz e evitar os problemas decorrentes da formação de biofilmes.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o desenvolvimento de biofilmes sobre superfície metálica (platina) por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) correlacionando os dados com imagens óticas do recobrimento da superfície com biofilme.

Metodologia

Bactéria e meio de cultivo. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram cultivadas em caldo de soja (TSB- *Tryptic Soy Broth*, Himedia, HiMedia Laboratories, Índia) a 37 ° C por 18 h. Para os experimentos de adesão bacteriana e desenvolvimento de biofilme, as células foram colhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com sais mínimos M9 (8). Para os experimentos de adesão bacteriana o meio M9 foi suplementado com 2,0 g de glicose e 0,4940 g/L de MgSO₄.7H₂O. A densidade celular do inóculo foi ajustada para aproximadamente 10⁸ UFC / mL utilizando espectrofotômetro UV/visível (Shimadzu Corp.) em que uma densidade óptica na faixa entre 0,1 nm a 600 nm indicou 10⁸ UFC / mL.

Preparação do eletrodo de trabalho. Eletrodos de platina (Bioanalytical Systems Inc.) com 1,6 mm de diâmetro foram utilizados para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e, lâminas de platina (1,0 mm x 1,0 mm x 0,1 mm) embutidas em resina epóxi foram preparadas para as análises das imagens superficiais realizadas em banco metalográfico (Leica, modelo MM6). As lâminas foram polidas com pasta de diamante e de alumina. Os eletrodos permaneceram por 15 min em etanol a 70 % seguido de irradiação com luz ultravioleta (254 nm) por 15 min para o processo de esterilização.

Adesão de bactérias e formação de biofilme. Uma célula eletroquímica tradicional foi utilizada como reator. Para medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) o eletrodo de trabalho (platina), o contra eletrodo (platina) e o eletrodo de referência (Ag/AgCl, saturado em KCl) foram inseridos por orifícios da tampa superior do reator. Para a adesão inicial de células bacterianas na superfície da platina, o reator foi preenchido com o sal mínimo M9 suplementado com glicose e $MgSO_4$ e o sistema foi inoculado no tempo 0 h com 1,0 mL do inóculo ajustado (10^8 UFC / mL) e, dessa forma, iniciou-se a fermentação com uma concentração de 10^6 UFC / mL em 100 mL de meio M9. Durante o experimento o sistema foi mantido em temperatura de 37 °C. As análises das imagens das superfícies das amostras óticas foram conduzidas no mesmo período de tempo das medidas de EIE realizadas, isto é, para cada imagem ótica há um espectro de impedância eletroquímica associado. Adicionalmente, um experimento similar de controle sem a presença de bactéria foi realizado utilizando o meio de sal mínimo M9 suplementado com glicose e $MgSO_4$ e incubado a 37 °C de temperatura (não apresentado neste trabalho).

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Os experimentos foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research) com módulo de impedância e um software PowerSuite[®]. As medidas foram realizadas na faixa de frequência entre 100 kHz a 100 mHz com amplitude do sinal de 10 mV. Para todas as medidas foi aplicado um potencial DC de 0,0 V em relação ao potencial de circuito aberto, para minimizar o efeito da polarização sobre o processo de adesão das bactérias sobre a superfície da platina. Esse procedimento foi adotado uma vez que uma polarização anódica pode causar uma contração no biofilme enquanto que uma polarização catódica pode causar uma menor expansão do biofilme (7). As medidas de EIE foram conduzidas em tempos de cultivo predeterminados entre 15 min e 24 h, em temperatura de 37 °C. O tempo 0 h representa a condição sem bactéria, isto é, apenas o meio de cultivo M9 com seus suplementos. O meio de cultivo foi inoculado utilizando uma seringa estéril através da linha de alimentação da célula eletroquímica. Para efeitos de comparação dos diagramas de impedância, foram realizados experimentos nos mesmos intervalos de tempo sem a adição do inóculo, para verificar a influência do crescimento microbiano sobre a superfície da platina. O ajuste dos dados de impedância foi realizado pela análise de circuito equivalente utilizando o software Zview[®] (Scribner Associates Inc.).

Resultados e discussão

Na Figura 1 está apresentada uma fotografia do arranjo experimental utilizado para o monitoramento do desenvolvimento do biofilme por espectroscopia de impedância eletroquímica, em solução estagnada. Uma célula sem o inóculo foi utilizada como forma de controle para comparação dos dados com e sem a presença de bactéria. O monitoramento ótico da adesão das bactérias e desenvolvimento do biofilme foi realizado em reator montado

em separado, com as amostras sendo retiradas para análise nos mesmos tempos das medidas de EIE.

As medidas de EIE foram desenvolvidas varrendo uma faixa de frequência de 100 kHz a 100 mHz para identificar e caracterizar as propriedades elétricas da interface platina/meio de cultivo com inóculo durante a adesão e desenvolvimento do biofilme. As medidas foram realizadas aplicando um potencial DC de 0,0 V em relação ao potencial e circuito aberto para minimizar os efeitos da polarização sobre o processo de adesão.

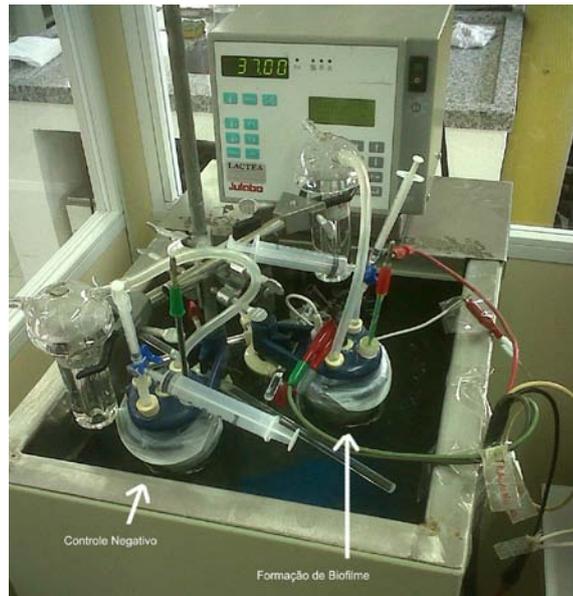


Figura 1 – Fotografia do arranjo experimental utilizado para o estudo da adesão e desenvolvimento de biofilme sobre superfície de platina. As duas células de medidas, sem inóculo e com inóculo, foram mantidas a 37 °C.

Na Figura 2 está apresentado um diagrama esquemático ilustrando as diferentes etapas de formação de biofilme. Uma das teorias descritas na literatura que explica a formação de biofilmes ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas etapas (9). Na primeira etapa, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do micro-organismo na superfície ocorrer por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática (10). Na segunda etapa, a teoria considera que ocorre a interação física da célula com a superfície através de material polimérico extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzido pela bactéria, denominado glicocálix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocálix seria o responsável por favorecer o processo de adesão superficial e fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e a parte externa, membrana externa, das Gram-negativas (11).

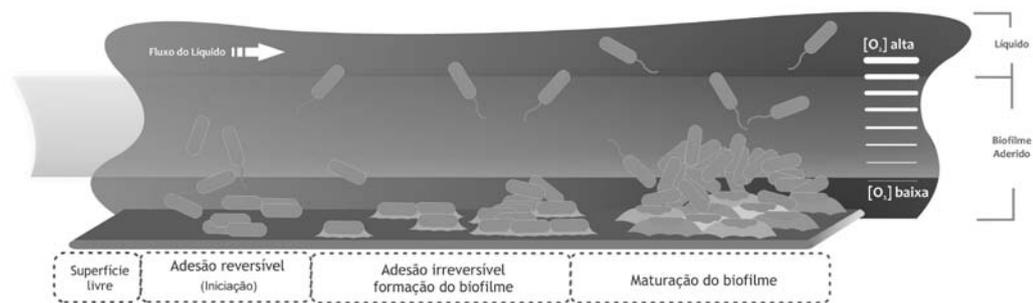


Figura 2 – Diagrama esquemático das etapas de adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies sólidas em meio aquoso.

Imagens da superfície de um eletrodo de platina revelando os estágios de adesão e desenvolvimento do biofilmes foram realizadas utilizando microscopia ótica e estão apresentadas na Figura 3. A Figura 3 apresenta a variação do grau de recobrimento da superfície metálica em função do tempo. No tempo 0 min, situação em que há bactéria no meio de cultivo, a superfície não apresenta nenhum sinal de adesão bacteriana.

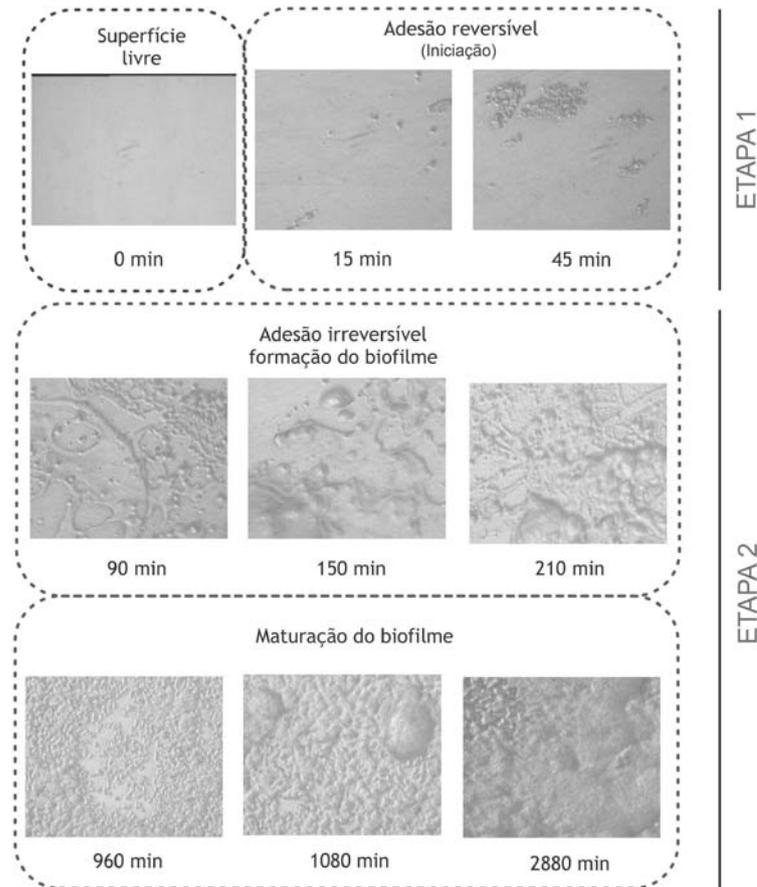


Figura 3 – Imagens de microscopia ótica indicando os estágios da formação do biofilme da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* sobre eletrodo de platina.

Levando-se em conta o diagrama esquemático da Figura 2 pode-se descrever o processo de adesão, formação e maturação do biofilme sobre a platina. Assim, na Figura 3 observa-se a

etapa 1 representada pelo processo de adesão (iniciação), baixo grau de recobrimento e, a etapa 2, representada pela formação e maturação do biofilme, maior grau de recobrimento.

Na Figura 4 estão apresentados os espectros de impedância eletroquímica para diferentes períodos de deposição da *Pseudomonas aeruginosa* sobre superfície de platina. Os resultados demonstram a variação dos valores medidos principalmente para a região de frequências menores do que 1 Hz. Essa variação é esperada devido ao efeito das mudanças de massa do biomaterial em termos de células bacterianas totais depositadas sobre o eletrodo.

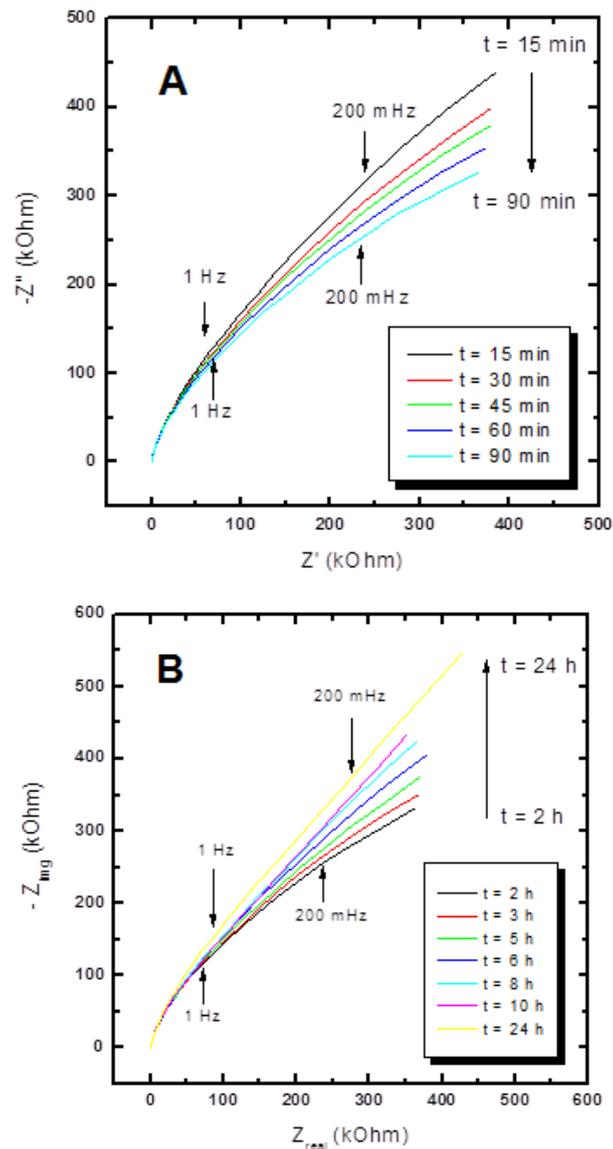


Figura 4 – Espectros de impedância eletroquímica em obtidos em diferentes tempos do contato do eletrodo de platina em meio de cultivo M9 inoculado com bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Na Figura 3A os espectros correspondem ao tempo desde 15 min até 90 min. Na Figura 3B os espectros correspondem a período de tempo entre 2 h e 24 h.

Pelo fato das medidas terem sido realizadas em solução estagnada, é provável que as medidas de impedância tenham sido afetadas pela difusão das espécies devido à interação eletrostática e química com as vizinhanças do biomaterial. Entretanto, o efeito da etapa de crescimento do biofilme sobre a resposta de impedância pode ser devido às mudanças na estrutura do biofilme, isto é, tanto a difusividade quanto a porosidade podem mudar com os estágios de crescimento do biofilme.

Foi utilizado um modelo de circuito equivalente para descrever as interações entre o biomaterial e a superfície da platina. O modelo de circuito equivalente proposto é apresentado na Figura 5 e foi utilizado para caracterizar o desenvolvimento de biofilme da *Pseudomonas aeruginosa* sobre uma superfície de platina. Vários modelos baseados em circuitos equivalentes têm sido utilizados para caracterizar as interfaces eletrodo/eletrólito e eletrodo/bactéria/eletrólito para interpretar os dados de espectroscopia de impedância eletroquímica (12-15). O desenvolvimento do biofilme foi considerado em três estágios (16): iniciação, crescimento e maturação (Figuras 2 e 3). O estágio inicial sendo caracterizado pela adesão reversível de células bacterianas no substrato. No segundo e terceiro estágios, de crescimento e maturação do biofilme, respectivamente, caracterizados pela proliferação das células bacterianas e produção de uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), responsável pela manutenção da estrutura do biofilme. O mesmo modelo de circuito equivalente foi utilizado para descrever o desenvolvimento do biofilme, o qual inclui os três estágios do desenvolvimento. No estágio inicial, o biomaterial é composto basicamente de células individuais distribuídas ao longo da superfície do eletrodo de trabalho, enquanto que no estágio de crescimento e maturação o biomaterial é composto de uma estrutura com poros interconectados entre eles. O modelo utilizado para descrever a interface eletrodo/biomaterial inclui um elemento R1 representando a resistência da solução, C1 a capacitância associada ao eletrodo de referência, CPE1 o elemento de fase constante relacionado à capacitância do biofilme, R2 a resistência do biofilme, CPE2 o elemento de fase constante da interface e R3 a resistência de transferência de carga na interface.

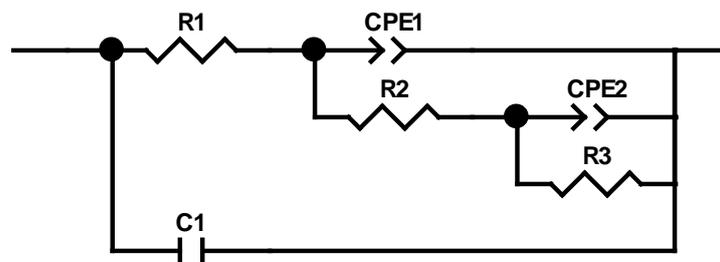


Figura 5 - Circuito equivalente descrevendo as interações eletroquímicas entre o biomaterial e a superfície condutora de platina. R1 representa a resistência da solução, C1 a capacitância associada ao eletrodo de referência, CPE1 o elemento de fase constante relacionado a capacitância do biofilme, R2 a resistência do biofilme, CPE2 o elemento de fase constante da interface e R3 a resistência de transferência de carga na interface.

O resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica da interação da *Pseudomonas aeruginosa* sobre a platina ajustados utilizando o software ZView[®] pelo modelo da Figura 5, estão apresentados na Figura 6.

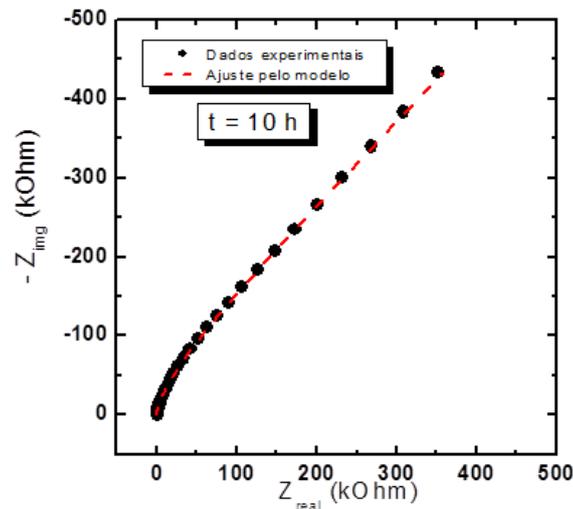


Figura 6 – Espectro de impedância eletroquímica obtido para o tempo de 10 h de contato do eletrodo de platina em meio de cultivo M9 inoculado com bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. A linha tracejada representa os dados após ajuste com o modelo da Figura 5.

Os valores da resistência do biomaterial em função do período de deposição da *Pseudomonas aeruginosa* sobre platina, extraídos do modelo de circuito equivalente, estão apresentados na Figura 6. Pode-se observar que ocorre uma diminuição da resistência R2 com o aumento do período de deposição até o período de 1,5 h. Isso pode ser atribuído ao aumento da quantidade de biomaterial depositado sobre a platina, resultado de uma maior concentração de células de bactérias aderidas. Para tempos de deposição de biomaterial maiores do que 1,5 h, os estágios de crescimento e maturação do biofilme ocorrem com a proliferação de células bacterianas e a produção de matriz de exopolissacarídeo. Tempos maiores do que 1,5 h representa um biofilme já formado sobre a superfície da platina que está na fase de maturação em função do tempo, em acordo com os dados da etapa 2 apresentados na Figura 3. Os valores dos dados de R2 extraídos para tempos maiores do que 1,5 h resultaram num aumento na resistência e numa diminuição da capacitância do biomaterial em função do tempo. Esse resultado pode ser atribuído ao aumento da espessura do biofilme. Observa-se também, que a partir de um determinado tempo, atinge-se uma situação característica de estado estacionário onde a espessura e as propriedades do biofilme não variam significativamente, tempos maiores do que 10 h.

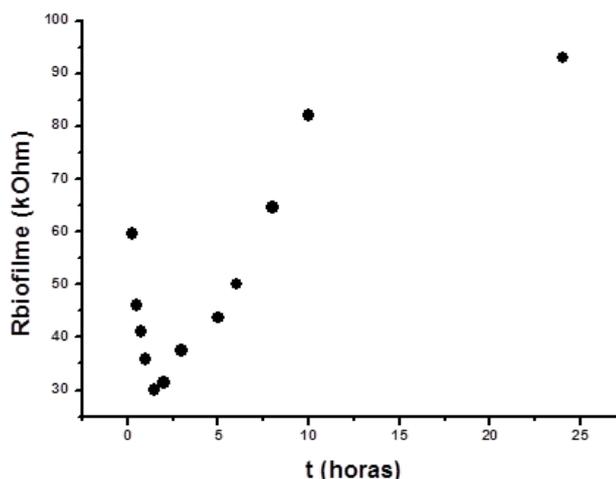


Figura 6. Capacitância (CPE1) e resistência (R2) do biomaterial para diferentes períodos de deposição da adesão da *Pseudomona Aeruginosa*.

Conclusões

Foi apresentado um método ótico e eletroquímico para caracterização em tempo real da adesão microbial de biofilmes em superfície de platina. Este método pode ser estendido para aplicação em metais de uso cotidiano em usinas hidrelétricas para avaliar principalmente tubulações do sistema de refrigeração das unidades geradoras. O grau de recobrimento da superfície da platina pela *Pseudomonas Aeruginosa* foi monitorado por microscopia ótica. Ficou evidenciado que a superfície é totalmente recoberta com um biofilme após 24 h de contato entre a platina e o meio de cultivo com inóculo. A caracterização da formação do biofilme sobre platina em tempo real foi feita usando um modelo de circuito equivalente incluindo componentes descrevendo os fenômenos eletroquímicos e associados às imagens óticas. Foi mostrado que a resistência do biofilme diminui inicialmente e depois aumenta até atingir um estado estacionário após 10 h. As variações nos valores de resistência do biofilme foram atribuídas às variações nas propriedades do biofilme associadas aos estágios de formação.

Referências bibliográficas

- (1) COETSER, S.E., CLOETE, T.E. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. **Critical Reviews in Microbiology**, Taylor & Francis, v.31, n.4, p.213-232, Oct. 2005.
- (2) WILLIAMS, P., CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, Elsevier, v.12, n.2, p.182-191, Apr. 2009.
- (3) KIEVIT, T.R., IGLEWSKI, T.H. Bacterial *Quorum sensing* in Pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, American Society for Microbiology, v.68, n.9, p.4839-4849, Sept. 2000.
- (4) VIDELA, H.A. **Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais**. Ed. Blucher (São Paulo), 2003, v.1.

-
- (5) MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.10, p.2760-2764, Oct. 1998.
- (6) VIEIRA, M.J., MELO, L., PINHEIRO, M.M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, Taylor & Francis, v.7, n.1, p.67-80, Jan. 1993.
- (7) MAPELLI, V., OLSSON, L., NIELSEN, J. Metabolic footprinting in Microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. **TRENDS in Biotechnology**, Elsevier, v.26, n.9, p.490-497, Sept. 2008.
- (8) STOODLEY, P., BEER, D. LAPPIN-SCOTT, H.M. Influence of Electric Fields and pH on Biofilm Structure as Related to the Bioelectric Effect. **Antimicrob. Agents Chemother**, American Society for Microbiology, v.41, n.9, p.1876-1879, Sept. 1997.
- (9) MARSHALL, K.C., STOUT, R., MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the adsorption of marine bacteria to surfaces. **Jornal General Microbiology**, Society for General Microbiology, v.68, n.3, p.337-348, Aug. 1971.
- (10) MULVEY, M.A., S.J. HULTGREN. Adhesion, Bacterial. In: **The Desk Encyclopedia of Microbiology**, por M. SCHAECHTER e J. LEDERBERG. Elsevier Academic Press (London, UK), 2004, v.1, p. 1-9.
- (11) PARIZZI, S.Q.F. Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa (MG), 1998, 57p.
- (12) GARCÍA-ALJARO, C., MUÑOZ-BERBEL, X., MUÑOZ, F.J. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. **Biosens. Bioelectron.** Elsevier, v. 24, n.6, p.1712-1716, Feb. 2009.
- (13) GONÇALVES, J.J., GOVIND, R. Rapid evaluation of biofilm attachment promoters and biofilm growth orientation using a mini-impedimetric device. **Sensors and Actuators B: Chemical.** Elsevier, v.143, n.4, p.341-348, Dec. 2009.
- (14) YANG, L., LI, Y., GRIFFIS, C.L., JOHNSON, M.G. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. **Biosensors and Bioelectronics.** Elsevier, v.19, n.10, p.1139–1147, May. 2004.
- (15) BAYOUDH, S., OTHMANE, A., PONSONEET, L., OUADA, H.B. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** Elsevier, v.318, n.1-3, p.291–300, Apr. 2008.
- (16) COSTERTON J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v.284, p.1318-1322, May 1999.