



**UNIVERSIDADE DO MINHO**

ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS BIOCIDAS  
(CARBAMATO E GLUTARALDEÍDO) EM SISTEMAS DE  
BIOFILME**

MARIA OLIVIA BAPTISTA DE OLIVEIRA PEREIRA

BRAGA  
2001

MARIA OLIVIA BAPTISTA DE OLIVEIRA PEREIRA

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS  
BIOCIDAS (CARBAMATO E GLUTARALDEÍDO)  
EM SISTEMAS DE BIOFILME**



**UNIVERSIDADE DO MINHO**

ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA  
2001

**UNIVERSIDADE DO MINHO**

ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS BIOCIDAS  
(CARBAMATO E GLUTARALDEÍDO) EM SISTEMAS DE  
BIOFILME**

Dissertação para a obtenção do grau de Doutor  
em Engenharia Química e Biológica pela Universidade do Minho

Tese realizada sob a orientação de:

**Professor Luis Manuel Ferreira de Melo**

Professor Catedrático

**Doutora Maria João Vieira**

Professora Auxiliar

**UNIVERSIDADE DO MINHO**

ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

*Agora sei que nada é fixo: há sempre um por fazer  
Há sempre outro partir depois de cada chegar*

*Agora sei que para saber  
É preciso rasgar as mãos .... e procurar.*

*Manuel Alegre*

*Eu ouço e esqueço  
Eu vejo e reconheço  
Eu faço e compreendo*

*(provérbio chinês)*

à Mi, ao Lino  
ao Zé, ao Jó e ao Nel

## PREÂMBULO

Um doutoramento, tal qual outras caminhadas da nossa vida, é frequentemente recheado de indecisões e incertezas. O desafio de percorrer caminhos desconhecidos é constante. E sabe bem, principalmente nas horas de maior dificuldade, haver alguém que nos desbrave o percurso, nos ensine o "caminho das pedras" e sobretudo que nos estimule e nos faça acreditar que somos capazes ... basta querermos!

E é imbuída da certeza de que, apesar de individual, um doutoramento é um cruzamento de ensinamentos, por conseguinte, uma tarefa partilhada, que quero expressar aqui o meu agradecimento a todos aqueles que com as suas palavras, ensinamentos, carinhos, estímulos, reprimendas, cobranças ..... contribuíram para a gestação e nascimento desta "obra".

Ao Professor Luis de Melo, agradeço a aposta na minha pessoa para encetar esta tarefa, bem como o seu incondicional apoio, disponibilidade, estímulo e paciência. Os seus ensinamentos, sempre tão sábios e ponderados, foram decisivos para o desenrolar do trabalho experimental, bem como para a elaboração e génese de todos os trabalhos escritos dos quais esta dissertação é corolário.

À Doutora Maria João Vieira, ajudante preciosa na ultrapassagem de barreiras bem como no desbravamento de caminhos, agradeço todo o seu apoio e empenho quer a nível pessoal quer científico. Agradeço-lhe também todas as sugestões de trabalho e a permanente colaboração na discussão dos resultados experimentais.

Ao Eng. Vitorino Beleza (ISEP) agradeço-lhe as preciosas sugestões, a disponibilidade, a confiança e as palavras de estímulo e cobrança. Confesso que os seus "abanões" foram estímulos decisivos, preciosos.

Aos Directores do Departamento de Engenharia Biológica, Professor José Teixeira, Professor Luis de Melo e Professor Manuel Mota agradeço as facilidades concedidas durante a execução do trabalho.

À Dra. Rosário Oliveira agradeço a amizade, as dicas preciosas, bem como a disponibilidade e o interesse sempre demonstrado.

A todos os colegas do Grupo de Biofilmes, quer os de agora, quer os de outrora, e perdoem-me não particularizar ..... mas assim não esqueço ninguém, agradeço o companheirismo, a cumplicidade, as palavras de confiança e a colaboração em laboratório.

A todos quantos trabalham no DEB e no CEB, agradeço a amizade e o constante apoio e interesse. Um reconhecimento especial ao Sr. Manuel Santos, sempre presente e disposto a ajudar, pelo seu valioso apoio técnico, à D. Maria dos Anjos pelo apoio laboratorial e à D. Fátima Cordeiro pela sua colaboração e simpatia.

A todos os colegas do CEB que me acompanharam nesta tarefa e que partilharam comigo as alegrias e os desalentos, em especial à Ana Cristina Rodrigues, Ana Nicolau, Ana Ferraz, Carla Freitas, Cláudia Alves, Filipa Lopes, João Peixoto e Regina Nogueira. A eles o meu reconhecimento e o desejo de sucesso nas respectivas tarefas que irão empreender a curto e longo prazo.

Quero também expressar o meu agradecimento à empresa Portucel Viana, na pessoa do Eng. Rocha Faria, pela possibilidade de realização de trabalho experimental na indústria, bem como pela disponibilidade de todos os meios técnicos e humanos necessários ao desenvolvimento do trabalho. À Eng. Teresa Helena e ao Sr. Lima Rodrigues agradeço o acolhimento e a disponibilidade sempre demonstrada.

À Dra. Fernanda Proença (Dep. Química da UM) agradeço todos os esclarecimentos prestados no entendimento de alguns fenómenos na área da Química

À Maria João Vieira, ao João Peixoto e à Joana Azeredo, agradeço a revisão cuidada desta dissertação.

Ao Luis Amaral e ao António Vicente agradeço os esclarecimentos na área da Informática e a prontidão e empenho na resolução dos meus nós informáticos.

À Junta Nacional de Investigação Científica agradeço o financiamento concedido através do programa PRAXIS XXI, bolsa BD/3242/94.

Ao Jonhy, à Gena, à Ni, à Tita e ao João A. agradeço o facto de terem estado quando foi e não foi preciso e deixo um sério aviso ..... ai de vocês se deixam de estar. À minha família, fonte inesgotável de motivação e estímulo, o meu eterno agradecimento. Aos homens da minha família, aquele beijinho de reconhecimento e um pedido de que nunca deixem de ser o que são. Aos elementos mais recentes agradeço a paciência ..... eu sei que aturar-me não é fácil. À minha mãe o meu mais sentido reconhecimento pela sua infindável paciência, carinho, dedicação e estímulo. Esta obra também lhe pertence .....

A Ti, poeta de sons e de ritmos, obrigada ..... talvez agora se componha a nossa melodia!

## RESUMO

Os circuitos de água industrial constituem locais altamente favoráveis para o desenvolvimento e proliferação de microrganismos. Consequentemente, a formação de biofilmes nos equipamentos e tubagens é um processo quase impossível de impedir. Durante muitos anos, a existência de biofilmes foi quase que ignorada. Quando, finalmente, se reconheceu que a maioria dos problemas associados ao sujamento eram de origem microbiana, rapidamente se começaram desenvolver estratégias de controlo que englobam, essencialmente, a aplicação de produtos químicos com propriedades antimicrobianas.

Com o presente trabalho pretendeu-se investigar a eficácia de dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, em sistemas de biofilme, como forma de delinear a estratégia mais efectiva da sua aplicação. O trabalho experimental desenvolvido em laboratório foi complementado, na fase final, com ensaios realizados numa indústria de pasta e papel.

A adesão inicial de *Pseudomonas fluorescens* ao aço inox foi favorecida com a aplicação de carbamato, pois este modificou a carga superficial das bactérias para valores positivos ou nulos, facilitando então o processo de adesão. Esta alteração não foi observada com o glutaraldeído. A adição de carbamato também induziu a formação de agregados bacterianos fazendo surgir a possibilidade deste biocida poder também ser usado como um agente de agregação microbiana, nomeadamente na indústria da pasta e do papel. Esta possibilidade foi investigada, tendo-se provado que o carbamato possui potencialidades que o assemelham aos convencionais agentes de retenção, pois a sua adição a suspensões de pasta e papel originou índices de retenção celular bastante elevados.

O glutaraldeído mostrou ser, em termos de efeito letal e nas condições testadas, o biocida mais eficiente pois causou reduções de actividade respiratória de *P. fluorescens* significativamente superiores às obtidas com o carbamato. Este facto foi observado quer quando as bactérias cresceram em suspensão quer quando formaram biofilme. A supremacia antimicrobiana do glutaraldeído também foi observada quando se incluíram partículas abióticas (caulino) nas culturas bacterianas e quando se promoveu a formação de biofilmes na presença das mesmas partículas.

A presença de caulino nas suspensões celulares estimulou claramente a actividade respiratória de *P. fluorescens*, para todos os valores de pH testados. Esta acção estimuladora também se fez sentir quando as bactérias se constituíram em biofilme. Refira-se até que, neste caso, o efeito estimulador foi mais significativo do que quando as bactérias se desenvolveram em suspensão. O caulino, quando incluído nas suspensões bacterianas, interferiu negativamente com o desempenho dos biocidas, interferência essa pouco pronunciada no caso do glutaraldeído e mais significativa no caso do carbamato. Os resultados também demonstraram que o caulino removeu o carbamato do meio líquido, diminuindo consequentemente a sua disponibilidade para as bactérias. Este efeito parece estar associado à adsorção química do biocida nas partículas de argila.

Quando aplicados a biofilmes, os biocidas mostraram ser mais eficientes na redução da actividade bacteriana dos biofilmes do que na redução da biomassa acumulada, podendo-se concluir que, nas condições testadas, a acção dos biocidas é mais marcada na desinfecção dos biofilmes do que na sua remoção das superfícies metálicas. Estes resultados realçaram a importância de, conjuntamente com os biocidas, se implementarem métodos físicos de limpeza. Ambos os biocidas demonstraram também ser mais eficazes na redução da actividade respiratória das *P. fluorescens* em suspensão do que quando estas bactérias estavam constituídas em biofilme. Esta diferença de eficiência está geralmente associada ao desenvolvimento de formas de resistência por parte do biofilme

Os ensaios realizados na indústria corroboraram os resultados obtidos em laboratório, isto é, ambos os biocidas voltaram a ser mais eficientes na redução da população microbiana em suspensão nas “águas brancas” do que na remoção de massa dos depósitos. O glutaraldeído mostrou, novamente, ser mais eficaz do que o carbamato. No entanto, o carbamato confirmou possuir capacidade de aglomeração celular uma vez que, a carga microbiana em suspensão diminuiu consideravelmente quando a água branca, tratada com carbamato, foi filtrada. Esta acrescida redução dos microrganismos, que não pode ser menosprezada, caracteriza, decididamente, o carbamato como um ajudante de agregação e sugere que o uso dos convencionais ajudantes de retenção pode ser eficiente no controlo dos efeitos microbianos indesejáveis. Este tipo de abordagem, do ponto de vista ambiental, seria preferível, porque o potencial de formação de biofilme seria reduzido sem a introdução de compostos tóxicos nos sistemas de água.

## ABSTRACT

The industrial water circuits represent favourable environments for the growth and proliferation of a large range of microorganisms. Therefore, it is quite impossible to prevent biofilm formation in the equipment and pipes. For many years, the biofilms were often ignored. When it was realised that the great majority of the fouling problems were related to the microbial activity inside the biofilms, several biofilm control strategies were developed. These strategies usually comprise antimicrobial chemical substances.

The main goal of this work was to investigate the effect of two biocides, carbamate and glutaraldehyde, in biofilm systems, in order to elaborate the most effective strategy for the application of these two chemicals. The experimental work carried out in well defined laboratory conditions was reinforced with industrial tests performed in a pulp and paper industry.

The initial adhesion tests showed that carbamate improved the bacterial adhesion to the metal surface, since it shifted the *Pseudomonas fluorescens* electrical charge to neutral or positive values. The same effect was not observed with the application of glutaraldehyde. The addition of carbamate also promoted the formation of microbial aggregates and its adhesion to the metal substratum. These results suggested that carbamate could be used as an aggregation agent, namely in the pulp and paper industry. This possibility was investigated and the potential for using carbamate as a retention agent was proved, since carbamate significantly enhanced the cell retention on the cellulose fibres.

In this work, glutaraldehyde proved to be, in terms of lethal effect, more efficient than carbamate, since it caused a greater reduction in the bacterial activity. This fact was observed in the suspended bacterial cultures as well as in *P. fluorescens* biofilms. This more aggressive action of the glutaraldehyde was also noted when kaolin was introduced in the suspended cultures and when biofilms were formed in the presence of the clay.

The presence of the kaolin particles in the bacterial suspended cultures stimulated the respiratory activity of the bacteria, for all the pH values tested. This stimulatory effect was also observed when the bacteria were embedded in a biofilm and it seemed to be more significant in this last situation. The kaolin, when introduced in the bacterial suspensions, negatively affects the biocide performance, this effect being more pronounced in the case of carbamate and at a less extent in the case of glutaraldehyde. The results also showed that kaolin was very effective in removing carbamate from the solution, thus decreasing its availability to bacteria. This removal effect seemed to be due to the chemical adsorption of carbamate on the kaolin particles.

When applied against biofilms, both biocides showed to be more efficient in the reduction of the bacterial activity than in the reduction of the biomass attached to the substrata. Therefore, it can be concluded that the antimicrobial action of these biocides was more marked in disinfecting biofilms than in removing the biological fouling layers. These findings called the attention to the need to implement, together with biocides, physical methods of biofilm cleaning.

The tests performed in the pulp and paper industry corroborated the results obtained with the laboratory assays. In fact, both biocides proved to be more effective in reducing the microbial loading of the "white water" circuit than the deposit accumulated on the steel surfaces. Glutaraldehyde proved to be more effective than carbamate. Carbamate, in contrast to glutaraldehyde, confirmed to have the ability of promoting cell agglomeration since the microbial loading decreased much more when the white water, treated carbamate, was filtered. This fact represents an increase in the overall microbial reduction obtained with the carbamate. These results suggest that the use of conventional retention agents in pulp and paper processes can be efficient in controlling unwanted microbial effects. Such methodology is environmental preferable because it reduces the potential for biofilm accumulation without having to put strong toxic compounds in the water system.

# ÍNDICE

<b>PREÂMBULO .....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO .....	2
1.2 OBJECTIVOS .....	4
1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....	4
1.4 BIBLIOGRAFIA.....	7
<b>2. BIOFILMES MICROBIANOS: SUA FORMAÇÃO .....</b>	<b>9</b>
2.1 CONCEITO DE “BIOFILME” .....	10
2.1.1 <i>Composição dos biofilmes</i> .....	10
2.1.2 <i>Vantagens do modo de desenvolvimento em biofilme</i> .....	12
2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES .....	13
2.2.1 <i>Etapas de formação</i> .....	13
2.2.1.1 Filme condicionador.....	15
2.2.1.2 Etapas de adesão microbiana.....	16
2.2.1.3 Desprendimento de biofilme .....	17
2.3 FACTORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES .....	18
2.3.1 <i>pH</i> .....	18
2.3.2 <i>Efeitos de velocidade e de turbulência do fluido</i> .....	19
2.3.3 <i>Influência de partículas inorgânicas na formação de biofilmes</i> .....	19
2.3.3.1 <i>Influência de partículas de caulino – referência particular</i> .....	20
2.4 RELEVÂNCIA DOS BIOFILMES.....	20
2.4.1 <i>Biofilmes benéficos</i> .....	21
2.4.2 <i>Biofilmes prejudiciais: o “Sujamento biológico”</i> .....	22
2.4.2.1 <i>Definição de “Sujamento biológico”</i> .....	22
2.4.2.2 <i>Exemplos de biofouling</i> .....	22

---

2.4.2.3	Implicações associadas ao fouling.....	23
2.5	REACTORES DE BIOFILME .....	24
2.5.1	<i>Reactores industriais de biofilme - breve referência</i> .....	25
2.5.2	<i>Reactores para Monitorização de Biofilmes</i> .....	27
2.5.2.1	Reactores à escala laboratorial com geometria industrial.....	28
2.5.2.2	Secções de teste específicas .....	28
	Células de fluxo.....	30
	Reactores anulares rotativos.....	31
2.6	BIBLIOGRAFIA .....	33
<b>3.</b>	<b>BIOFILMES MICROBIANOS: SEU CONTROLO.....</b>	<b>39</b>
3.1	ESTRATÉGIAS DE CONTROLO .....	40
3.1.1	<i>Medidas de carácter processual</i> .....	41
3.1.2	<i>Métodos físicos</i> .....	42
3.1.3	<i>Métodos químicos e físico-químicos</i> .....	43
3.2	UTILIZAÇÃO DE BIOCIDAS .....	45
3.2.1	<i>Principais parâmetros de escolha de um biocida</i> .....	46
3.2.2	<i>Factores que interferem com a eficiência de um biocida</i> .....	47
3.2.3	<i>Métodos de aplicação de biocidas</i> .....	48
3.2.4	<i>Classificação de biocidas</i> .....	50
3.3	RESISTÊNCIA DOS BIOFILMES .....	52
3.4	CONSIDERAÇÕES AMBIENTAIS.....	53
3.5	NOVAS ESTRATÉGIAS .....	54
3.5.1	<i>Enzimas específicas</i> .....	55
3.5.2	<i>Bacteriófagos</i> .....	55
3.5.3	<i>Biodispersantes</i> .....	56
3.5.4	<i>Organismos competidores</i> .....	57
3.6	BIBLIOGRAFIA .....	57
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
4.1	MICROORGANISMO .....	62
4.1.1	<i>Modo de preservação</i> .....	62
4.1.2	<i>Meio de cultura</i> .....	62
4.1.3	<i>Composição das soluções de tampão</i> .....	63
4.1.4	<i>Preparação do inóculo</i> .....	64
4.2	SUPERFÍCIES DE ADESÃO.....	64
4.3	BIOCIDAS.....	65
4.3.1	<i>Carbamato</i> .....	66
4.3.2	<i>Glutaraldeído</i> .....	67
4.3.3	<i>Concentrações de trabalho</i> .....	67

4.4	CAULINO.....	68
4.5	INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	69
4.5.1	<i>Reactor contínuo</i> .....	69
4.5.1.1	Esterilização e operação do reactor.....	70
4.5.2	<i>Associação do Reactor Contínuo e Tanque de mistura</i> .....	70
4.5.2.1	Características do equipamento.....	71
4.5.2.2	Esterilização e lavagem.....	71
4.5.2.3	Modo de operação.....	72
4.5.2.4	Monitorização do sistema.....	73
4.5.3	<i>Formação de biofilmes em placas suspensas</i> .....	73
4.5.4	<i>Formação de biofilmes em sistemas de adesão em fluxo</i> .....	74
4.6	CÉLULA DE FLUXO.....	74
4.6.1	<i>Características</i> .....	74
4.6.2	<i>Esterilização e lavagem</i> .....	76
4.6.3	<i>Modo de operação</i> .....	76
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	77
4.7.1	<i>Determinação da biomassa</i> .....	77
4.7.1.1	Contagem celular.....	77
4.7.1.2	Determinação dos Sólidos totais e Sólidos voláteis totais.....	78
4.7.1.3	Quantificação de proteínas.....	78
4.7.2	<i>Quantificação da glicose</i> .....	78
4.7.2.1	Doseamento de açúcares redutores pelo método de Miller (DNS).....	78
4.7.3	<i>Determinação da carga superficial</i> .....	79
4.7.3.1	Potencial zeta.....	79
4.7.4	<i>Determinação da actividade microbiana</i> .....	79
4.7.4.1	Método respirométrico.....	79
4.7.5	<i>Caracterização física de biofilmes</i> .....	81
4.7.5.1	Determinação do peso húmido.....	81
4.7.5.2	Determinação do peso seco.....	81
4.7.5.3	Determinação da quantidade de água num biofilme.....	82
4.7.5.4	Quantificação da biomassa.....	82
4.7.6	<i>Caracterização bioquímica de biofilmes</i> .....	82
4.7.6.1	Proteína total.....	82
4.7.6.2	Conteúdo em polissacarídeos.....	83
4.7.7	<i>Microscopia de epifluorescência</i> .....	83
4.7.8	<i>Microscopia electrónica de varrimento (SEM)</i> .....	84
4.8	BIBLIOGRAFIA.....	85
<b>5.</b>	<b>EFEITO DOS BIOCIDAS NA CARGA SUPERFICIAL E NA ADESÃO INICIAL DE <i>P. FLUORESCENS</i></b> .....	<b>87</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	88

---

5.1.1	<i>Propriedades eléctricas superficiais</i> .....	88
5.1.2	<i>Teoria DLVO</i> .....	89
5.2	OBJECTIVOS.....	90
5.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	90
5.3.1	<i>Ensaio de adesão inicial</i> .....	90
5.3.1.1	Preparação das suspensões celulares .....	90
5.3.1.2	Aplicação dos biocidas.....	91
5.3.2	<i>Ensaio de determinação do potencial zeta</i> .....	91
5.3.2.1	Preparação das suspensões bacterianas .....	91
5.3.2.2	Obtenção da limalha de aço inox.....	92
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
5.5	CONCLUSÕES .....	102
5.6	BIBLIOGRAFIA.....	103
<b>6.</b>	<b>ENSAIOS DE RETENÇÃO DE <i>P. FLUORESCENS</i> EM FIBRAS DE CELULOSE.....</b>	<b>105</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	106
6.2	OBJECTIVOS.....	107
6.3	DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL.....	107
6.3.1	<i>Preparação das suspensões bacterianas</i> .....	108
6.3.2	<i>Obtenção das suspensões de pasta de celulose</i> .....	108
6.3.3	<i>Ensaio de retenção</i> .....	108
6.3.4	<i>Medição da retenção microbiana</i> .....	109
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	110
6.5	CONCLUSÕES .....	115
6.6	BIBLIOGRAFIA .....	116
<b>7.</b>	<b>ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA DE <i>P. FLUORESCENS</i> EM SUSPENSÃO: EFEITO DOS BIOCIDAS E DAS PARTÍCULAS DE CAULINO .....</b>	<b>117</b>
7.1	EFEITO DOS BIOCIDAS NA ACTIVIDADE DA BACTÉRIA <i>P. FLUORESCENS</i> .....	118
7.1.1	<i>Introdução</i> .....	118
7.1.2	<i>Objectivos do trabalho</i> .....	119
7.1.3	<i>Metodologia experimental</i> .....	119
7.1.3.1	Preparação das suspensões bacterianas .....	119
7.1.3.2	Aplicação dos biocidas.....	120
7.1.3.3	Determinação das taxas de consumo de oxigénio .....	120
7.1.3.4	Determinação da biomassa celular .....	121
7.1.3.5	Avaliação da redução da actividade .....	121
7.1.4	<i>Resultados e Discussão</i> .....	121
7.2	EFEITO DO CAULINO NA EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS .....	127
7.2.1	<i>Introdução</i> .....	127

7.2.2	<i>Objectivo do trabalho</i> .....	129
7.2.3	<i>Metodologia experimental</i> .....	129
7.2.3.1	Determinação da biomassa celular em cada amostra .....	129
7.2.3.2	Avaliação do aumento da actividade respiratória.....	130
7.2.3.3	Monitorização do pH.....	130
7.2.3.4	Investigação da adsorção do carbamato no caulino.....	131
7.2.3.5	Ensaio de varrimento .....	131
7.2.4	<i>Efeito do caulino na actividade respiratória da bactéria P. fluorescens</i> .....	132
7.2.4.1	Resultados e Discussão .....	132
7.2.5	<i>Efeito do caulino no desempenho antimicrobiano dos biocidas</i> .....	138
7.2.5.1	Resultados e Discussão .....	138
7.3	CONCLUSÕES .....	147
7.4	BIBLIOGRAFIA.....	149
<b>8.</b>	<b>ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA DE P. FLUORESCENS EM BIOFILMES: EFEITO DOS BIOCIDAS E DAS PARTÍCULAS DE CAULINO</b> .....	<b>151</b>
8.1	INTRODUÇÃO .....	152
8.2	OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	152
8.3	EFEITO DO CAULINO NA FORMAÇÃO E ACTIVIDADE DE BIOFILMES DE P. FLUORESCENS.....	153
8.3.1	<i>Metodologia experimental</i> .....	153
8.3.1.1	Formação de biofilmes .....	153
8.3.1.2	Amostragem do sistema experimental.....	154
8.3.1.3	Determinação da actividade respiratória específica dos biofilmes.....	155
8.3.1.4	Caracterização física dos biofilmes.....	155
8.3.1.5	Construção das curvas de acumulação de biofilme .....	156
8.3.1.6	Avaliação do aumento da actividade respiratória.....	156
8.3.2	<i>Resultados e Discussão</i> .....	157
8.4	EFEITO DOS BIOCIDAS EM BIOFILMES DE P. FLUORESCENS FORMADOS COM E SEM CAULINO .....	164
8.4.1	<i>Metodologia experimental</i> .....	164
8.4.1.1	Aplicação dos biocidas.....	164
8.4.1.2	Amostragem do sistema experimental.....	165
8.4.1.3	Avaliação da redução da actividade.....	165
8.4.2	<i>Resultados e Discussão</i> .....	166
8.5	CONCLUSÕES .....	178
8.6	BIBLIOGRAFIA.....	179
<b>9.</b>	<b>AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS BIOCIDAS NUM CIRCUITO DE ÁGUAS BRANCAS DE UMA INDÚSTRIA DE PASTA E PAPEL</b> .....	<b>181</b>
9.1	INTRODUÇÃO .....	182
9.2	OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	183
9.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	184

---

9.3.1	<i>Operação das células de fluxo</i> .....	184
9.3.2	<i>Condições de operação da máquina de papel</i> .....	186
9.3.3	<i>Aplicação dos biocidas</i> .....	187
9.3.4	<i>Monitorização do sistema experimental</i> .....	187
9.3.5	<i>Avaliação da massa de depósito acumulado</i> .....	187
9.3.6	<i>Caracterização dos depósitos</i> .....	188
9.3.6.1	Análise química.....	188
9.3.6.2	Determinação da fracção inorgânica .....	188
9.3.7	<i>Quantificação da população microbiana em suspensão</i> .....	188
9.3.8	<i>Construção das curvas de sujamento biológico</i> .....	189
9.3.9	<i>Avaliação do desempenho dos biocidas</i> .....	189
9.3.9.1	Redução da massa de depósito acumulado nas placas de adesão .....	189
9.3.9.2	Redução do teor em proteínas e polissacarídeos de cada depósito .....	190
9.3.9.3	Redução da população microbiana em suspensão nas águas brancas.....	190
9.3.9.4	Retenção celular .....	191
9.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	191
9.5	CONCLUSÕES .....	204
9.6	BIBLIOGRAFIA .....	205
<b>10.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO</b> .....	<b>207</b>

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 2.1</i> Reactores biológicos usados no tratamento de águas e efluentes.....	26
<i>Tabela 3.1</i> Métodos de limpeza físicos .....	42
<i>Tabela 3.2</i> Alguns dos agentes químicos mais comuns (adaptado de Bott, 1995) .....	44
<i>Tabela 3.3</i> Alguns exemplos de biocidas oxidantes (adaptado de Bott (1992) e de Lutey (1995)) .....	50
<i>Tabela 3.4</i> Alguns exemplos ilustrativos de biocidas não oxidantes (adaptado de Bott (1992) e de Lutey (1995)).....	51
<i>Tabela 4.1</i> Composição do meio de cultura para a bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	63
<i>Tabela 4.2</i> Composição da solução de tampão fosfato pH 7 ( $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ ) utilizada para a manutenção do pH do meio de cultura da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	63
<i>Tabela 4.3</i> Composição das soluções de tampão utilizadas para implementar diferentes pH, nos vários ensaios .....	64
<i>Tabela 4.4</i> Características físicas e químicas dos biocidas utilizados.....	65
<i>Tabela 4.5</i> Características químicas das partículas de caulino (Oliveira, 1990).....	68
<i>Tabela 4.6</i> Condições de operação do tanque de mistura.....	72
<i>Tabela 4.7</i> Composição do meio de cultura alimentado à suspensão celular desenvolvida no tanque de mistura .....	73
<i>Tabela 4.8</i> Características dos principais equipamentos usados na execução dos trabalhos práticos .....	77
<i>Tabela 4.9</i> Características dos principais equipamentos necessários para a realização dos métodos analíticos.....	84
<i>Tabela 5.1</i> Efeito da concentração de carbamato e do valor de pH no potencial zeta da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> (valores médios $\pm$ desvio padrão).....	96
<i>Tabela 5.2</i> Efeito do tempo de contacto com o carbamato no potencial zeta da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> (valores médios $\pm$ desvio padrão).....	97
<i>Tabela 5.3</i> Efeito da concentração de glutaraldeído e do valor de pH no potencial zeta da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> (valores médios $\pm$ desvio padrão).....	98
<i>Tabela 5.4</i> Efeito dos biocidas e do pH no potencial zeta do aço inox; valores médios $\pm$ desvio padrão....	100
<i>Tabela 6.1</i> Valores de retenção obtidos nos ensaios com suspensões de pasta de papel na presença de $100 \text{ mg L}^{-1}$ de carbamato; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	110
<i>Tabela 6.2</i> Valores de retenção obtidos nos ensaios com suspensões de pasta de papel na presença de $200 \text{ mg L}^{-1}$ de carbamato; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	110
<i>Tabela 6.3</i> Valores de retenção obtidos nos ensaios com suspensões de pasta de papel na presença de $300 \text{ mg L}^{-1}$ de carbamato; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	111

---

<b>Tabela 7.1</b> Redução da actividade respiratória específica da suspensão bacteriana de <i>P. fluorescens</i> obtida pela aplicação de carbamato, de acordo com a Equação 7.1 .....	123
<b>Tabela 7.2</b> Redução da actividade respiratória específica da suspensão bacteriana de <i>P. fluorescens</i> obtida pela aplicação de glutaraldeído, de acordo com a Equação 7.1 .....	126
<b>Tabela 7.3</b> Aumento da actividade respiratória específica da bactéria <i>P. fluorescens</i> obtida com a presença de caulino, de acordo com a Equação 7.2, para vários valores de pH; valores médios $\pm$ desvio padrão .....	133
<b>Tabela 7.4</b> Valores de pH registados nas várias suspensões bacterianas, na presença de $300 \text{ mg L}^{-1}$ de caulino, ao longo do tempo (para diferentes valores iniciais de pH do meio).....	134
<b>Tabela 7.5</b> Redução da actividade respiratória específica da bactéria <i>P. fluorescens</i> obtida com a aplicação de carbamato e na presença de $300 \text{ mg L}^{-1}$ de caulino, de acordo com a Equação 7.1 .....	140
<b>Tabela 7.6</b> Redução de actividade respiratória específica da bactéria <i>P. fluorescens</i> obtida na presença de $300 \text{ mg L}^{-1}$ de caulino e com a aplicação de glutaraldeído, de acordo com a Equação 7.1.....	143
<b>Tabela 7.7</b> Redução na concentração de carbamato na presença de $300 \text{ mg L}^{-1}$ de caulino ao longo do tempo. Valores médios $\pm$ desvio padrão ( $n=2$ ); (*) concentração de carbamato antes da adição de caulino; (0 h) imediatamente após a adição.....	144
<b>Tabela 8.1</b> Aumento da actividade respiratória dos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> devido à presença de caulino, obtida de acordo com a Equação 8.2; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	159
<b>Tabela 8.2</b> Efeito da presença de caulino no valor máximo de massa de biofilme acumulado ( $m_f^*$ ) e no valor do factor de resistência do depósito ao desprendimento ( $1/\beta$ ), determinados de acordo com a Equação 8.1; valores médios $\pm$ desvio padrão .....	161
<b>Tabela 8.3</b> Percentagem de água retida nos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos na presença e na ausência de caulino; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	163
<b>Tabela 8.4</b> Redução da actividade respiratória específica dos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos nas células de fluxo durante 5 d e 10 d, na ausência ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e na presença ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) de caulino, em consequência da aplicação de $300 \text{ mg L}^{-1}$ de carbamato em choques sucessivos; valores médios $\pm$ desvio padrão .....	168
<b>Tabela 8.5</b> Redução da actividade respiratória dos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> , desenvolvidos nas células de fluxo durante 5 d e 10 d, na ausência ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e na presença ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) de caulino, em consequência da aplicação de $100 \text{ mg L}^{-1}$ de glutaraldeído em choques sucessivos; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	172
<b>Tabela 8.6</b> Número de bactérias de <i>P. fluorescens</i> presente nas suspensões bacterianas e nos biofilmes desenvolvidos durante 5 e 10 dias; valores médios $\pm$ desvio padrão.....	177
<b>Tabela 9.1</b> Caracterização físico-química das águas brancas (exemplo ilustrativo).....	186
<b>Tabela 9.2</b> Efeito dos biocidas no valor máximo de massa de depósito acumulado ( $m_f^*$ ) e no valor do factor de resistência do depósito ao desprendimento ( $1/\beta$ ), determinados de acordo com a Equação 9.1; os valores de redução foram determinados de acordo com a Equação 9.2; $0 \text{ mg L}^{-1}$ representa o ensaio de controlo; valores médios $\pm$ desvio padrão .....	196

---

<b>Tabela 9.3</b> Efeito dos biocidas no conteúdo máximo (valor final) de proteínas e polissacarídeos de cada depósito, determinado de acordo com a Equação 9.1; os valores de redução foram determinados de acordo com a Equação 9.2; 0 mg L <sup>-1</sup> representa o ensaio de controlo; valores médios ± desvio padrão .....	197
<b>Tabela 9.4</b> Redução da população celular em suspensão causada pela aplicação de carbamato e glutaraldeído ao circuito de águas brancas, determinada de acordo com a Equação 9.3; valores médios ± desvio padrão; (*) não determinado .....	201
<b>Tabela 9.5</b> Redução da população microbiana em suspensão, obtida por filtração da água branca tratada com 200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato, através de uma tela filtrante de 200 mesh, determinada segundo a Equação 9.4; valores médios ± desvio padrão; (*) não determinado .....	202
<b>Tabela 9.6</b> Redução da concentração celular em suspensão obtida por filtração da água branca tratadas com 50 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído, através de uma tela filtrante de 200 mesh, determinada segundo a Equação 9.4; valores médios ± desvio padrão; (*) não determinado .....	202

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Acumulação de biofilme ao longo do tempo.....	13
<b>Figura 2.2</b> Etapas de formação de um biofilme (adaptado de Melo, 1994).....	14
<b>Figura 2.3</b> Configurações mais comuns dos reactores de biofilme (Melo e Oliveira, 2001): (a) Reactor de leito circulante; (b) Reactor air-lift; (c) Filtro anaeróbio de leito fixo; (d) Digestor aneróbio de leito fluidizado.....	27
<b>Figura 4.1</b> Fórmulas estruturais dos componentes activos da solução de carbamato.....	66
<b>Figura 4.2</b> Fórmula estrutural do glutaraldeído.....	67
<b>Figura 4.3</b> Esquema da instalação experimental.....	71
<b>Figura 4.4</b> Pormenor esquemático do suporte das placas de aço.....	74
<b>Figura 4.5</b> Representação esquemática da Célula de fluxo.....	75
<b>Figura 4.6</b> Pormenor de uma placa de adesão.....	76
<b>Figura 4.6</b> Diagrama esquemático do respirómetro descontínuo: (1) Eléctrodo de oxigénio; (2) Câmara de termostatização; (3) Célula do respirómetro; (4) Barra magnética; (5) Monitor de oxigénio; (6) Aquisição de dados.....	80
<b>Figura 4.7</b> Respirograma típico: 1 e 3 - respiração endógena; 2 - respiração total; A - injeccção de substrato; t - tangente no ponto de injeccção de substrato.....	81
<b>Figura 5.1</b> Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia de epifluorescência de <i>P. fluorescens</i> aderidas ao aço inox: (a) 1 h de exposição à suspensão bacteriana sem aplicação de carbamato; (b) e (c) respectivamente, 1 h e 3 h de exposição à suspensão bacteriana tratada com 100 mg L <sup>-1</sup> de carbamato; (d) 1 h de exposição à suspensão celular tratada com 200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato; (e) 1 h de exposição à suspensão bacteriana tratada com 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato. Ampliação de 400x.....	93
<b>Figura 5.2</b> Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia de epifluorescência de bactérias <i>P. fluorescens</i> aderidas ao aço inox, ao fim de 1 h de exposição à suspensão bacteriana: (a) sem aplicação de glutaraldeído; (b) e (c) com aplicação de, respectivamente, 50 mg L <sup>-1</sup> e 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído. Ampliação de 400x.....	94
<b>Figura 5.3</b> Efeito da concentração de carbamato (a) e do pH (b) no potencial zeta da <i>P. fluorescens</i> .....	97
<b>Figura 5.4</b> Efeito da concentração de glutaraldeído (a) e do pH (b) no potencial zeta da bactéria <i>P. fluorescens</i> .....	99
<b>Figura 6.1</b> Efeito da concentração de carbamato na retenção celular ao longo do tempo. (▲) 100 mg L <sup>-1</sup> carbamato, (■) 200 mg L <sup>-1</sup> carbamato, (●) 300 mg L <sup>-1</sup> carbamato.....	112
<b>Figura 6.2</b> Efeito da concentração de carbamato no pH das suspensões de pasta celulósica ao longo da tempo. (◇) controlo, (▲) 100 mg L <sup>-1</sup> carbamato, (■) 200 mg L <sup>-1</sup> carbamato, (●) 300 mg L <sup>-1</sup> carbamato.....	113

<b>Figura 7.1</b> Efeito do carbamato na actividade respiratória da bactéria <i>P. fluorescens</i> para vários valores de pH, respectivamente, pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (▲) 100 mg L <sup>-1</sup> , (■) 200 mg L <sup>-1</sup> e (●) 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato. ....	122
<b>Figura 7.2</b> Efeito do glutaraldeído na actividade respiratória de <i>P. fluorescens</i> para vários valores de pH, respectivamente, pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (◆) 50 mg L <sup>-1</sup> e (*) 100 mg L <sup>-1</sup> glutaraldeído. ....	125
<b>Figura 7.3</b> Efeito do caulino na actividade respiratória específica de culturas suspensas de <i>P. fluorescens</i> . ....	132
<b>Figura 7.4</b> Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia electrónica de varrimento de suspensões de bactérias <i>P. fluorescens</i> + partículas de caulino, respectivamente, a pH 9, ampliação de 7400x (a) e pH 5, ampliação de 8000x (b). ....	136
<b>Figura 7.5</b> Efeito do carbamato na actividade respiratória da bactéria <i>P. fluorescens</i> na presença de 300 mg L <sup>-1</sup> de caulino, para pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (▲) 100 mg L <sup>-1</sup> , (■) 200 mg L <sup>-1</sup> e (●) 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato. ....	139
<b>Figura 7.6</b> Efeito do glutaraldeído na actividade respiratória da bactéria <i>P. fluorescens</i> na presença de 300 mg L <sup>-1</sup> de caulino e para, respectivamente, pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (◆) 50 mg L <sup>-1</sup> e (*) 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído. ....	142
<b>Figura 7.7</b> Curvas de absorvência, na gama ultravioleta, de uma solução de carbamato (10 mg L <sup>-1</sup> ) (◇), de uma suspensão mista de caulino (300 mg L <sup>-1</sup> ) + carbamato (10 mg L <sup>-1</sup> ) (□) e de uma suspensão de caulino (300 mg L <sup>-1</sup> ) (Δ). (a) amostras filtradas (b) amostras não filtradas. ....	146
<b>Figura 8.1</b> Imagem digitalizada de uma fotografia de microscopia electrónica de varrimento de um biofilme misto desenvolvido durante cinco dias; (cortesia Filipa Lopes). ....	157
<b>Figura 8.2</b> Actividade respiratória específica de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino. ....	158
<b>Figura 8.3</b> Biomassa ( $X_{SYT}$ ) presente nos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> , desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino. ....	160
<b>Figura 8.4</b> Evolução da massa húmida ( $m_f$ ) dos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> , desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino. ....	160
<b>Figura 8.5</b> Evolução da massa seca dos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino. ....	162
<b>Figura 8.6</b> Actividade respiratória específica de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (■) e na presença (■) de partículas de caulino, antes e após a aplicação em choque de 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato. ....	167
<b>Figura 8.7</b> Biomassa ( $X_{SYT}$ ) presente nos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (■) e na presença (■) de partículas de caulino, antes e após a aplicação de 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato em choques sucessivos. ....	169
<b>Figura 8.8</b> Actividade respiratória específica de biofilmes de <i>P. fluorescens</i> , desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (■) e na presença (■) de partículas de caulino, antes e após a aplicação em choques sucessivos de 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído. ....	171

---

<b>Figura 8.9</b> Biomassa presente ( $X_{SVT}$ ) nos biofilmes de <i>P. fluorescens</i> , desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (■) e na presença (▣) de partículas de caulino, antes e após a aplicação de 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído em choques sucessivos. ....	174
<b>Figura 9.1</b> Representação esquemática do sistema experimental. ....	185
<b>Figura 9.2</b> Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia electrónica de varrimento de depósitos acumulados nas placas de adesão, em resultado da circulação de água branca: (a) durante 5 d, ampliação 7000x; (b) durante 10 d, ampliação 3000x. ....	192
<b>Figura 9.3</b> Efeito da aplicação de carbamato na massa de depósito ( $m_p$ ) acumulado nas placas de adesão, respectivamente, 100 mg L <sup>-1</sup> (a) e 200 mg L <sup>-1</sup> (b). (◇) controlo, (▲) 100 mg L <sup>-1</sup> e (■) 200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato. ....	194
<b>Figura 9.4</b> Efeito da aplicação de glutaraldeído na massa de depósito ( $m_p$ ) acumulado nas células de adesão, respectivamente, 50 mg L <sup>-1</sup> (a) e 100 mg L <sup>-1</sup> (b). (◇) controlo, (◆) 50 mg L <sup>-1</sup> e (✱) 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído. ....	195
<b>Figura 9.5</b> Efeito do carbamato na concentração celular em suspensão, respectivamente, 100 mg L <sup>-1</sup> (a) e 200 mg L <sup>-1</sup> (b). (◇) controlo, (▲) 100 mg L <sup>-1</sup> e (■) 200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato. ....	199
<b>Figura 9.6</b> Efeito do glutaraldeído na concentração celular em suspensão, respectivamente, 50 mg L <sup>-1</sup> (a) e 100 mg L <sup>-1</sup> (b). (◇) controlo, (◆) 50 mg L <sup>-1</sup> e (✱) 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído. ....	200

## LISTA DE SÍMBOLOS

### LETRAS LATINAS

$T$	<i>temperatura</i>	$\Theta$
$t$	<i>tempo</i>	$T$
$u$	<i>velocidade</i>	$LT^{-1}$
$X$	<i>biomassa</i>	$ML^{-3}$
$m_D$	<i>massa de depósito</i>	$ML^{-2}$
$m_f^\infty$	<i>massa máxima de depósito</i>	$ML^{-2}$

### LETRAS GREGAS

$\beta$	<i>parâmetro inversamente proporcional à resistência mecânica do biofilme ao desprendimento</i>	$T^{-1}$
$\Delta \log$	<i>variação logarítmica do número de células viáveis</i>	

### SIGLAS

<i>ADN</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ARN</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>ASI</i>	<i>American steel institute</i>
<i>ATCC</i>	<i>American type culture collection</i>
<i>CLSM</i>	<i>Confocal laser scanning microscopy (microscopia confocal laser de varrimento)</i>
<i>CV</i>	<i>Células viáveis</i>
<i>DLVO</i>	<i>Teoria desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek</i>
<i>DNS</i>	<i>Método do ácido 3,5-dinitrossalicílico para determinação de açúcares redutores</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etileno-diamino-tetracético</i>
<i>EPS</i>	<i>Substâncias poliméricas extracelulares</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolissacarídeos</i>
<i>MRD</i>	<i>Robbins device modified (dispositivo de Robbins modificado)</i>
<i>MD</i>	<i>Massa de depósito</i>
<i>OUR</i>	<i>Oxygen uptake rate (taxa específica de consumo de oxigênio)</i>

<i>PROT</i>	<i>Concentração em proteína</i>
<i>PVC</i>	<i>Polímero de cloreto de polivinil (Polyvinyl chloride)</i>
<i>rpm</i>	<i>Rotações por minuto</i>
<i>Re</i>	<i>Número de Reynolds</i>
<i>SEM</i>	<i>Microscopia electrónica de varrimento (scanning electronic microscopy)</i>
<i>ST</i>	<i>Sólidos totais</i>
<i>SVT</i>	<i>Sólidos voláteis totais</i>
<i>TAPPI</i>	<i>Technical Association of the Pulp and Paper Industries</i>
<i>UFC</i>	<i>Unidades formadoras de colónias</i>

#### NOTAS

As unidades utilizadas são as recomendadas pelo Sistema Internacional (SI). Recorreu-se frequentemente aos múltiplos e submúltiplos das unidades fundamentais, tendo-se também usado algumas unidades que, embora não sejam do SI, são de utilização corrente e permitidas pelo SI (por exemplo: dia, d; hora, h; minuto, min).

Foram ainda expressas algumas variáveis em unidades que, embora não sejam permitidas pelo SI, são de uso comum, pelo que foram adoptadas nesta dissertação. É o caso da percentagem volúmica (% v v<sup>-1</sup>) para designar a composição de misturas líquidas.

Ainda que o marcador decimal adoptado em Portugal seja a vírgula, optou-se, por hábito de escrita da autora, usar o ponto sobre a linha como marcador decimal (mais usual nos Estados Unidos da América).

# 1. INTRODUÇÃO

---

## Sumário

Neste capítulo pretende-se encaminhar o leitor para o tema deste trabalho. Introduce-se o conceito de biofilme e faz-se uma leve referência à sua importância e ocorrência. Aborda-se também, de forma breve, os motivos que ditam a necessidade de desenvolvimento de métodos de controlo dos biofilmes, para, em seguida, definir o contexto e as motivações que estiveram na base desta dissertação.

Por fim, referem-se os principais objectivos do trabalho e faz-se uma descrição da organização da dissertação.

1.1 Enquadramento do trabalho	2
1.2 Objectivos da dissertação	4
1.3 Organização da dissertação	4
1.4 Bibliografia	7

---

## 1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

Nos mais recônditos habitats deste planeta “Terra”, mesmo nos mais inospitais, é possível encontrar microrganismos, principalmente bactérias. Estas possuem a invejável capacidade de colonizar qualquer superfície, desde rochas nuas nas montanhas mais distantes e inóspitas até implantes médicos nos seres humanos. Esta ubiquidade revela que os microrganismos possuem uma grande capacidade de resistência e adaptação a condições ambientais extremas.

Indubitavelmente, ao longo dos tempos, os microrganismos tiveram que desenvolver formas de vida que lhes conferissem a “segurança” e a “proteção” essenciais para a sua sobrevivência. Não é, portanto, de estranhar que, em ambientes naturais, a maioria das bactérias sejam encontradas em microcolónias aderidas a superfícies húmidas – modo de desenvolvimento *séssil* – e não suspensas e dispersas num ambiente aquático – modo de desenvolvimento *planctónico*. O termo “biofilme” surgiu para descrever a forma de vida séssil que se caracteriza, essencialmente, pela adesão de bactérias a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo-se, então, uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células microbianas.

A existência de biofilmes é uma das mais exemplares formas organizadas de vida microbiana, capazes de adaptação a condições ambientais extremas, como temperaturas entre  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ , valores de pH entre 0.5 e 13, pressões entre 0 e 1400 bar (Flemming, 1991). Até em fontes fortemente radioactivas foram encontrados biofilmes (Lessel *et al.*, 1975). Estima-se que mais de 90% dos microrganismos do planeta vivem sob a forma de biofilmes (Costerton *et al.*, 1987) e que quase não existe nenhuma superfície que não esteja ou não possa vir a estar colonizada por bactérias (Characklis e Marshall, 1990).

Os biofilmes são muito importantes em muitos processos ecológicos, nomeadamente nos ciclos de nutrientes e na depuração de cursos de água, pois os consórcios de microrganismos degradam as substâncias poluentes da água contribuindo decisivamente para a sua pureza. Este potencial natural dos biofilmes é frequentemente explorado em processos biotecnológicos, nomeadamente na área da biotecnologia ambiental.

Os biofilmes, como ciência e tecnologia, constituem uma área de investigação relativamente nova. Atribui-se a Zobell (1943) o primeiro estudo relacionado com biofilmes, em que foi reconhecido que a colonização bacteriana de superfícies sólidas constituía uma influência positiva na actividade das bactérias. Até aos anos 70, a investigação em biofilmes avançou lentamente (Marshall, 1976). Com o advento de técnicas microscópicas mais sofisticadas e efectivas foi possível constatar que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava aderida a suportes sólidos e não dispersa e suspensa nos sistemas aquáticos (Costerton *et al.* 1978), concluindo-se, então, que o modo de vida sésil predominava sobre o planctónico. Consequentemente, a partir da década de 80, assistiu-se a um desenvolvimento rápido da investigação e entendimento dos processos de biofilme, não só nos tratamentos de água e água residual, mas também em muitas outras áreas relacionadas com a ecologia microbiana (Lazarova e Manem, 1995), tais como na indústria, na medicina e na agricultura.

O estudo sistemático de biofilmes justifica-se uma vez que é um assunto de interesse multidisciplinar pois o seu entendimento requer conceitos de várias áreas do Saber, microbiologia, bioquímica, química, engenharia, medicina, etc., e engloba matérias que podem ir desde o crescimento microbiano e cinética de crescimento até ao transporte de massa e dinâmica de reactores.

Porém, nem tudo é um “mar de rosas“, pois a existência de biofilmes também pode contribuir, e de forma bastante incisiva, para a deterioração do ambiente circundante, da superfície que os suportam, bem como dos processos produtivos onde ocorrem. Estes biofilmes indesejáveis, que estão na base do processo por vezes designado de sujamento biológico (“biofouling”, em inglês), afectam uma grande variedade de habitats, sendo as principais causas do aparecimento de uma enorme diversidade de problemas (Characklis, 1991; Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992) que, geralmente, se traduzem em acentuados prejuízos económicos.

A existência de sujamento biológico fez despontar a necessidade de desenvolvimento de estratégias de controlo. Estas estratégias devem retardar a formação de biofilmes e reduzir, ou mesmo eliminar, a sua acumulação nos equipamentos. Para a concretização destes propósitos, a estratégia mais comum engloba a utilização de *biocidas* – *substâncias químicas com propriedades antimicrobianas*. A selecção do biocida mais efectivo deve ser

sempre suportada por estudos laboratoriais prévios, no sentido de determinar, essencialmente, a concentração mais adequada, bem como o tempo e a frequência de aplicação mais correctos (Cloete *et al.* 1998). Os inconvenientes ambientais associados ao uso de biocidas não podem ser descurados e devem sempre ser considerados na escolha do biocida.

## 1.2 OBJECTIVOS

Foi, então, no domínio da aplicação de biocidas no controlo de biofilmes, que o presente trabalho se desenvolveu. A opção por esta área de investigação surge na continuidade de trabalhos anteriores (Vieira, 1995) que se debruçaram, essencialmente, na formação e caracterização de biofilmes e que alertaram para a necessidade de estudar métodos efectivos para o seu controlo.

Para este estudo, escolheu-se a *Pseudomonas fluorescens* como “bactéria-modelo”, dada a já significativa colecção de dados sobre esta estirpe disponível no grupo de investigação em que o presente trabalho se insere.

Numa primeira fase, pretendeu-se testar dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, no controlo da população bacteriana em suspensão bem como na formação de biofilmes de *P. fluorescens*, na perspectiva de definir o melhor procedimento de aplicação destes agentes antimicrobianos. Pretendeu-se, também, conhecer a influência de partículas abióticas no desempenho dos biocidas, bem como na estrutura e actividade de biofilmes formados na sua presença.

Numa fase posterior, pretendeu-se caracterizar o desempenho dos mesmos biocidas na prevenção da formação de biofilmes e no controlo da população microbiana num ambiente industrial real.

## 1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em dez capítulos principais.

Neste 1º Capítulo, pretende-se orientar o leitor para o tema deste trabalho, apresentando-se o contexto e as motivações que estiveram na base desta dissertação.

Também se expõe, neste capítulo, os objectivos gerais da dissertação, bem como o modo como esta foi organizada.

O Capítulo 2 constitui uma revisão bibliográfica sobre o tema dos biofilmes. Apresenta-se o conceito de biofilme, fazendo-se uma breve alusão aos seus principais constituintes, e faz-se uma descrição sumária dos mecanismos de formação de biofilmes, apontando as suas principais vantagens e inconvenientes. Referem-se os factores que afectam a formação de biofilmes, dando-se especial relevo aos efeitos das partículas sólidas suspensas, pH e velocidade do líquido no processo de acumulação de biofilmes, bem como as suas implicações na actividade dos microrganismos, quer em suspensão quer constituídos em biofilme. São também abordados temas como os reactores de biofilme, as suas principais utilizações, salientando-se a necessidade de desenvolvimento de dispositivos para a monitorização fácil e efectiva da acumulação de biofilmes.

No Capítulo 3 apontam-se os principais métodos de controlo da formação dos biofilmes, referindo-se de modo especial os mais usados no combate ao sujamento biológico industrial. Os biocidas, sendo uma das medidas mais utilizadas no controlo de biofilmes, são objecto de uma descrição mais detalhada. Os aspectos ambientais inerentes ao uso de biocidas são também referidos, assim como as mais recentes investigações no sentido de se encontrarem medidas alternativas simultaneamente eficazes e aceitáveis do ponto de vista da saúde humana e do ambiente.

Os métodos analíticos e instrumentais aplicados durante a execução do trabalho experimental são descritos no Capítulo 4. São também expostos, neste capítulo, as metodologias e equipamentos utilizados no cultivo da bactéria *Pseudomonas fluorescens* na forma planctónica e na formação de biofilme. Faz-se também uma caracterização sumária dos biocidas testados bem como das partículas inorgânicas (caulino). As metodologias experimentais mais específicas serão descritas em capítulos subsequentes.

Para compreensão dos fenómenos envolvidos na adesão de bactérias a suportes é decisivo conhecer as propriedades superficiais quer das células quer dos suportes e relacionar essas propriedades com a quantidade de bactérias aderidas. O Capítulo 5 apresenta resultados referentes à acção dos biocidas na adesão inicial de bactérias *P. fluorescens* a superfícies de aço inox e na carga superficial das bactérias quando tratadas

com diferentes concentrações de carbamato e glutaraldeído. A relação destes valores com a adesão inicial das bactérias também é discutida.

No Capítulo 6 averigua-se a possibilidade do carbamato poder ser utilizado como um ajudante de retenção, para além do seu uso convencional como biocida, nas indústrias de pasta e papel. A capacidade, apresentada pelo biocida, de modificação da carga eléctrica superficial foi o principal factor que induziu esta possibilidade.

O uso de biocidas no controlo microbiano dos circuitos de água é uma prática corrente, mas que deve ser sempre considerada com ponderação, principalmente no que respeita à concentração mais adequada de biocida a aplicar e ao tempo de exposição dos microrganismos ao agente antimicrobiano.

O Capítulo 7 avalia o efeito de dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, na actividade respiratória de suspensões bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*, em função da concentração de biocida aplicado, do tempo de contacto das bactérias com o biocida e do valor de pH do meio. Também se inclui neste capítulo o estudo que visou investigar se a presença de partículas inorgânicas, caulino, nas suspensões bacterianas interferia com o desempenho antimicrobiano dos biocidas. Simultaneamente, é ainda avaliada a possibilidade das partículas de caulino interferirem com a actividade respiratória das bactérias e, por consequência, dissimular a eficiência dos biocidas.

Os microrganismos organizados em biofilme são mais resistentes à acção agressiva dos agentes antimicrobianos do que quando se desenvolvem de forma dispersa nos sistemas aquosos. Uma vez conhecido o efeito dos biocidas nas culturas bacterianas em suspensão, no Capítulo 8 é investigado o efeito dos mesmos biocidas em biofilmes formados pela *P. fluorescens*. Simultaneamente, também se estuda se a presença de partículas de caulino durante o período de formação dos biofilmes afecta a sua formação e actividade respiratória específica. A possível interferência das mesmas partículas de argila, quando incorporadas nos biofilmes, no desempenho antibacteriano dos biocidas também é averiguado. Também se inclui neste capítulo a comparação do efeito de ambos os biocidas na actividade respiratória das bactérias constituídas em biofilme com o observado quando as mesmas bactérias se desenvolveram em suspensão.

No Capítulo 9 estuda-se o efeito da adição contínua de biocidas, carbamato e glutaraldeído, na formação de biofilmes no circuito de águas brancas de uma empresa

produtora de pasta e papel. Para tal, foram desenvolvidos biofilmes sobre placas de aço inox, colocadas no interior de células de fluxo, por onde circulava um caudal de água real proveniente do circuito de águas brancas da máquina de papel. A acção dos mesmos biocidas no controlo das populações microbianas em suspensão no referido circuito de águas brancas também se apresenta neste capítulo. Paralelamente, também se testa a possibilidade do carbamato poder ser utilizado como um agente de agregação neste sector industrial, assumindo então um papel idêntico aos convencionais agentes de retenção.

Por último, apresenta-se no Capítulo 10 uma síntese das principais conclusões resultantes do trabalho experimental realizado no domínio desta dissertação e apresentam-se, no seguimento, algumas ideias e sugestões para trabalho futuro.

#### 1.4 BIBLIOGRAFIA

- Characklis, W. G., Marshall, K. C. 1990. Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach. *In*: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 3-15.
- Characklis, W. G., 1991. Biofouling: effects and control. *In*: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 7-27.
- Cloete, T. E., Jacobs, L. e Brözel, V. S. 1998. The Chemical Control of Biofouling in Industrial Water Systems. *Biodegradation*, 9, 23-37.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. J., Nickel, J. C., Dasgupta, M. e Marrie, T. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews of Microbiology*, 41, 435-464.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. e Cheng, K.-J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95.
- Flemming, H-C., 1991. Introduction: biofilms as a particular form of microbial life. *In*: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 1-7.
- Lazarova, V. e Manem, J. 1995. Biofilm characterisation and activity analyses in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29, 2227-2245.
- Lessel, T., Mötsch, H. e Henning, E. 1975. Experience with a pilot plant for the irradiation of sewage sludge. *In*: *Radiation for a clean environment*. Int. Atom. En. Ag., Viena, 447-463.
- Marshall, K. C. 1976. *Interfaces in Microbial Ecology*. Harvard University Press, Cambridge MA, UK.
- Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*, 8(4), 573-603.
- Vieira, M. J. 1995. Dissertação de Doutoramento: Estudo da Formação de Filmes Biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos Efeitos Associados à Transferência de Massa Interna e à Incorporação de Partículas de Caulino. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Zobell, C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46, 39-56.



## 2. BIOFILMES MICROBIANOS: SUA FORMAÇÃO

---

### Sumário

Este capítulo constitui uma revisão bibliográfica sobre o tema dos biofilmes. Apresenta-se o conceito de biofilme, fazendo-se uma breve alusão aos seus principais constituintes, e faz-se uma descrição sumária dos mecanismos de formação de biofilmes, apontando as suas principais vantagens e inconvenientes. Referem-se os factores que afectam a formação de biofilmes, dando-se relevo aos efeitos das partículas sólidas suspensas, pH e velocidade do líquido no processo de acumulação de biofilmes, bem como as suas implicações na actividade dos microrganismos, quer em suspensão, quer constituídos em biofilme. São também abordados temas como os reactores de biofilme e as suas principais utilizações, salientando-se a necessidade de desenvolvimento de dispositivos para a monitorização fácil e efectiva da acumulação de biofilmes.

2.1	Conceito de biofilme	10
2.2	Formação de biofilmes	13
2.3	Factores que influenciam o desenvolvimento de biofilmes	18
2.4	Relevância dos biofilmes	21
2.5	Reactores de biofilme	24
2.6	Bibliografia	33

---

## 2.1 CONCEITO DE “BIOFILME”

A definição mais usual de **Biofilme** é o de uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido, constituída essencialmente por microrganismos, pelas substâncias poliméricas extracelulares que estes excretam e por água. Um biofilme não é necessariamente uniforme quer no tempo quer no espaço, podendo até englobar partículas sólidas (argilas, areias, produtos de corrosão e partículas orgânicas) provenientes do meio aquoso onde está imerso (Characklis e Marshall, 1990; Wimpenny *et al.*, 1993).

Os biofilmes, contudo, não aparecem somente em ambientes aquosos, nas interfaces sólido-líquido (superfícies imersas), nas interfaces líquido-líquido (petróleo-água) e nas interfaces líquido-ar (superfície da água) mas também nas interfaces sólido-ar (superfícies expostas ao ar) (Morton e Surman, 1994; Neu, 1994; Flemming e Wingender, 1999; Wimpenny, 2000).

### 2.1.1 Composição dos biofilmes

Os biofilmes, também conhecidos como “filmes microbianos“, “depósitos biológicos”, “películas microbianas”, “limo”, entre outros nomes descritivos, são tipicamente constituídos por:

- água;
- microrganismos;
- substâncias poliméricas extracelulares (EPS);
- partículas retidas;
- substâncias dissolvidas e adsorvidas;

Sendo um biofilme uma estrutura muito adsorvente (Characklis, 1981) e porosa, não surpreende que a água seja a fração mais significativa da massa total do biofilme, podendo variar entre 70 a 95%, ou mais, da massa total do biofilme (Flemming, 1993). Outros

autores, por exemplo, referem que a razão massa de água/massa de biofilme pode ir até próximo de 99% ou mesmo atingir valores superiores (Christensen e Characklis, 1990; Neu, 1994; Azeredo e Oliveira, 2000).

Os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (frequentemente, menos de 10%), embora excretem as substâncias poliméricas que representam a fracção dominante da matéria orgânica seca do biofilme. Segundo Flemming (1993), as substâncias poliméricas extracelulares, vulgarmente designadas EPS (“Extracellular Polymeric Substances”), representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme. Já Bakke *et al.* (1984) afirmam que a fracção de EPS pode variar entre 50 e 90 % do total da matéria orgânica dos biofilmes.

É enorme a diversidade de espécies microbianas que podem estar presentes nos biofilmes, quer nos habitats naturais, quer nos criados pelo Homem. Microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus são microrganismos frequentemente encontrados em biofilmes (Characklis *et al.*, 1990), ainda que sejam as células bacterianas a predominar, mercê da sua maior versatilidade e resistência.

De entre todos os microrganismos, são as bactérias que, em condições favoráveis, mais frequentemente produzem biofilme, ainda que umas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras. Os seus reduzidos tamanhos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são as principais características que fazem das bactérias excelentes organismos produtores de biofilme (Characklis *et al.*, 1990). *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* são dos géneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilme (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Wirtanen, 1995).

Os polímeros extracelulares sintetizados pelos microrganismos constituem uma matriz de aspecto gelatinoso, fortemente hidratada, à qual Costerton (1978) apelidou de *glicocalice*. Estes polímeros extracelulares podem envolver firmemente cada uma das células como uma discreta camada de cobertura – *cápsula* – ou formarem filamentos que se estendem das células à medida que vão sendo produzidos, constituindo um emaranhado agregador das células constituintes do biofilme (designado, por vezes, por “slime”).

A composição química das EPS é muito heterogênea e complexa. Ainda que, de uma maneira geral, sejam os polissacarídeos a predominar (Horan e Eccles, 1986; Wimpenny *et al.*, 1993) a matriz polimérica pode também ser constituída por proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos (ADN, ARN), (Jahn e Nielsen, 1995), glicoproteínas, fosfolípidos (Gehrke *et al.*, 1998), etc.. Horan e Eccles (1986) referem que os polissacarídeos podem constituir até 65% das EPS totais. Em estudos mais recentes, com biofilmes de *Pseudomonas putida*, Jahn *et al.* (1999) afirmam que são as proteínas a maior fracção das EPS (até 75%) extraídas dos referidos biofilmes. Esta discrepância de valores constitui um indício inequívoco de que ainda há muito trabalho a realizar nesta área, não cabendo, porém, no âmbito do presente trabalho.

A matriz polimérica é responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes, e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (Flemming e Wingender, 1999).

### **2.1.2 Vantagens do modo de desenvolvimento em biofilme**

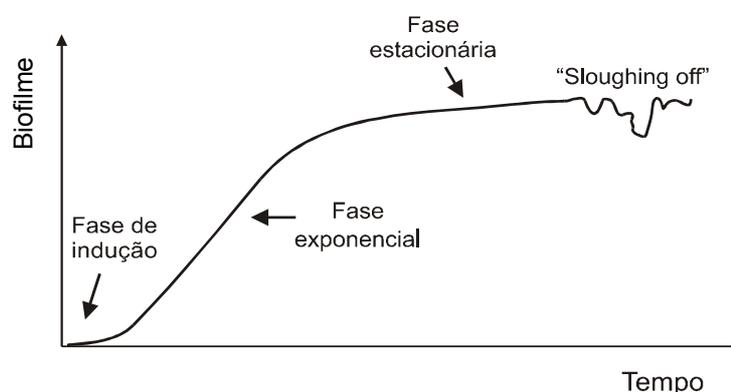
O modo de desenvolvimento em biofilme proporciona, aos microrganismos que o constituem, importantes benefícios, dos quais se destacam os seguintes (Flemming, 1991; Mittelman, 1998):

- aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes;
- protecção contra factores ambientais agressivos, como por exemplo: flutuações de pH, concentração de sais, desidratação, forças de tensão de corte, substâncias químicas agressivas, agentes bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados;
- possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos;
- facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose (líquenes) bem como a utilização de substratos de difícil degradação (celulose);
- capacidade para estabelecer e colonizar nichos ecológicos.

## 2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

### 2.2.1 Etapas de formação

A acumulação de biofilme é um processo natural que, de acordo com Bott (1993), ocorre segundo um padrão sigmoidal (Figura 2.1), sendo o resultado de um balanço entre vários processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem em simultâneo.

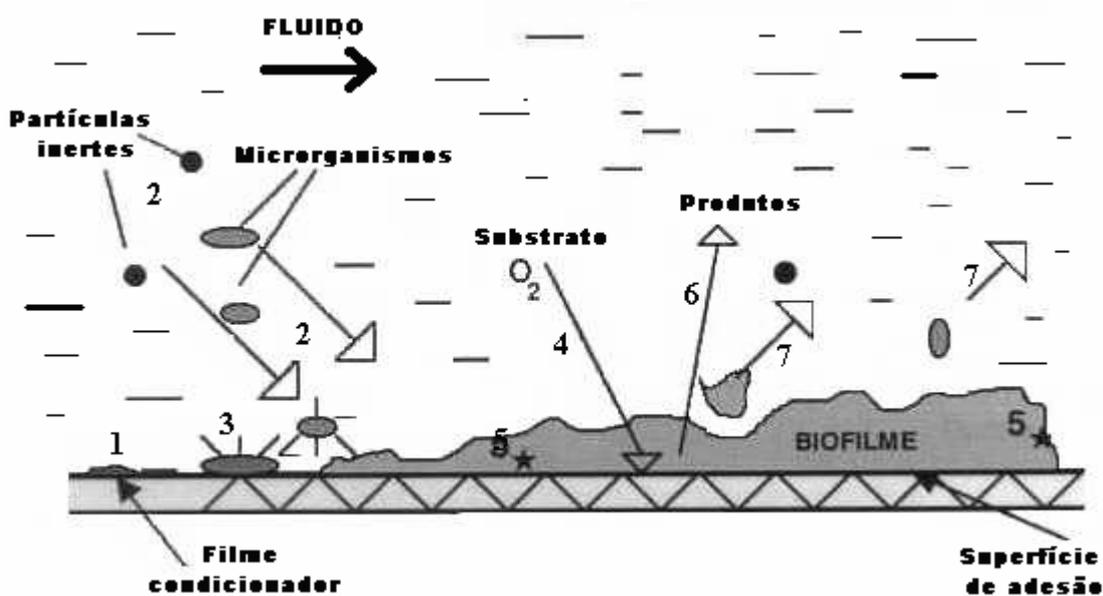


**Figura 2.1** Acumulação de biofilme ao longo do tempo.

O desenvolvimento de um biofilme pode-se processar então nas seguintes etapas (Figura 2.2):

- Adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas a uma superfície sólida em contacto com um meio aquoso, constituindo-se um “filme condicionador” (1);
- Transporte de microrganismos e outras partículas do meio aquoso para a superfície sólida condicionada (2);
- Adesão firme dos microrganismos à superfície (3);
- Transporte de nutrientes da fase líquida para a interface líquido-biofilme, bem como no interior do filme microbiano (4);
- Produção de biofilme devido ao consumo dos nutrientes, conseqüente crescimento e reprodução dos microrganismos aderidos e síntese de polímeros extracelulares (5);
- Transporte de subprodutos do biofilme para o exterior (6);

- Desprendimento de porções de biofilme devido a fenômenos de erosão superficial ou descolamento súbito (“sloughing off”) (7).



**Figura 2.2** Etapas de formação de um biofilme (adaptado de Melo, 1994).

Cada uma das etapas referidas contribui para o aumento (processos de deposição ou ganho) ou para a diminuição (fenômenos de remoção, desprendimento ou perda) da quantidade de biomassa acumulada numa determinada superfície sólida, estando então o desenvolvimento de biofilme intimamente dependente, em cada instante, do balanço entre os ganhos e as perdas de biomassa (Gjaltema, 1996).

A adesão de células microbianas à superfície sólida, o crescimento e reprodução das células aderidas e a adesão de células suspensas ao biofilme, são os processos que mais contribuem para o aumento da quantidade de um biofilme (Bryers, 1983). O desprendimento de biofilme, a respiração endógena, a morte celular, a lise celular e o ataque por predadores são os principais fenômenos responsáveis pela diminuição da quantidade de biofilme.

Todos os processos implicados no desenvolvimento do biofilme são influenciados pelas condições hidrodinâmicas do meio líquido circundante, pelo que, naturalmente, em fases específicas do desenvolvimento do biofilme, um dos processos (de deposição ou de

remoção) pode predominar sobre os restantes, tornando-se o processo controlador do fenómeno global. Os processos intervenientes no crescimento biológico do biofilme estão intimamente associados aos mecanismos de transferência de massa do seio do líquido para a superfície do biofilme (difusão molecular quando o fluido está estagnado ou escoamento em regime laminar, difusão turbulenta e convecção forçada quando o escoamento do fluido é turbulento), seguidos de transporte no interior do biofilme e reacção biológica (Melo, 1994). Como a maioria dos processos ocorre de forma consecutiva, o processo mais lento da sequência também influencia e limita a velocidade do processo global de desenvolvimento do biofilme, tornando-se o processo limitante (Characklis, 1990).

#### *2.2.1.1 Filme condicionador*

A formação do “filme condicionador” ocorre rapidamente, após o transporte e adsorção à superfície sólida de íões e moléculas orgânicas dissolvidas no meio aquoso. A velocidade de formação da camada condicionadora depende da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso que contacta com a superfície sólida, da afinidade das moléculas para com o suporte e das condições hidrodinâmicas do meio líquido (Chamberlain, 1992). As características do suporte (carga superficial, energia livre de superfície, rugosidade da superfície sólida) desempenham também um papel importante na adesão de moléculas orgânicas (Marshall e Blainey, 1990).

Suportes sólidos com características superficiais diversas poderão ser “condicionados”, isto é, revestidos por uma monocamada orgânica, em poucos minutos de exposição a um ambiente aquático natural. Mittelman (1998) afirma até que o filme condicionador é estabelecido nos primeiros 5 a 10 s após uma superfície sólida limpa ser colocada num ambiente aquoso. O filme condicionador pode alterar consideravelmente as características físico-químicas superficiais dos suportes sólidos, favorecendo ou, em alguns casos reduzindo, a adsorção de bactérias ao suporte (Fletcher, 1992). Normalmente, o filme condicionador modera os valores extremos de energia livre de superfície e/ou da carga eléctrica superficial dos suportes sólidos (Chamberlain, 1992; Neu, 1996), favorecendo a adesão celular.

### 2.2.1.2 Etapas de adesão microbiana

Após a formação do filme condicionador, precursor de todo o processo de desenvolvimento de um biofilme, ocorre uma segunda fase de adesão, com o transporte de células microbianas desde o meio aquoso até à superfície sólida. Este transporte é, geralmente, consequência do gradiente de concentrações de microrganismos entre o seio do meio aquático e a superfície ou devido à motilidade dos próprios microrganismos. O desenvolvimento e reprodução destes primeiros colonizadores pode também contribuir para a modificação das propriedades superficiais do suporte sólido, tornando-o, deste modo, mais adequado para a subsequente colonização por microrganismos secundários favorecendo a acumulação de biofilme (Characklis *et al.*, 1990).

A adesão dos colonizadores primários é fundamentalmente controlada por interações negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas constituintes do filme condicionador.

As moléculas orgânicas do filme podem formar cadeias poliméricas capazes de estabelecer com as células ligações suficientemente fortes para uma adesão firme, estável e irreversível dos microrganismos à superfície. Esta adesão de cariz mais permanente é, de uma maneira geral, precedida por uma adesão de carácter reversível que acontece quando, numa fase inicial, as células estabelecem com o suporte sólido condicionando interações fracas (forças de van der Waals, forças da dupla camada eléctrica, etc.), não suficientes para evitar a sua desorção. A adesão irreversível é geralmente considerada uma ligação permanente, quase sempre mediada pelos polímeros extracelulares (EPS).

As EPS, quer as adsorvidas ao suporte sólido e constituintes da camada condicionadora, quer os polímeros produzidos pela célula e responsáveis pela sucessiva adesão e crescimento de camadas de bactérias, desempenham um papel primordial pois parecem mediar a adesão dos microrganismos ao filme condicionador, bem como garantir o carácter irreversível da adesão subsequente dos microrganismos.

Para além das EPS, as células microbianas podem produzir apêndices externos filamentosos, tais como *flagela*, *pili* e *fimbriae* que parecem desempenhar também um papel importante na adesão inicial das células às superfícies sólidas (Characklis, 1990). Estas estruturas celulares podem ultrapassar as barreiras electrostáticas e formar pontes entre as células e a superfície.

### 2.2.1.3 *Desprendimento de biofilme*

O desprendimento de porções de biofilme pode ser definido como a transferência de biomassa do biofilme para o meio aquoso (Characklis *et al.*, 1990), podendo ocorrer segundo quatro processos distintos: erosão superficial, descolamento (“sloughing off”), abrasão e ataque por predadores (Bryers, 1987).

A erosão corresponde à remoção contínua de pequenos fragmentos da superfície do biofilme para a interface biofilme-líquido, devida essencialmente a alterações ambientais na fase aquosa, nomeadamente alterações de fluxo. Fala-se em descolamento de biofilme quando esporadicamente ocorre o destacamento de grandes porções de biofilme em resultado da alteração de certas condições dentro do próprio biofilme. O descolamento é particularmente comum quando o escoamento do líquido é laminar, quando os valores de tensão de corte junto ao biofilme são relativamente baixos, e quando ocorre produção interna de gás e alterações ao nível dos nutrientes (esgotamento de nutrientes, aumento brusco da concentração de substrato).

Também pode haver remoção de biofilme por abrasão devido ao contacto físico do biofilme com outras entidades, como por exemplo, colisão com partículas suspensas (Gjaltema, 1996). O ataque por predadores (“grazing”) pode também reduzir consideravelmente a acumulação de biomassa (Ratsak *et al.*, 1996) em resultado dos protozoários se alimentarem na superfície dos biofilmes bacterianos.

As próprias células englobadas no biofilme podem provocar o seu desprendimento pela segregação e excreção de enzimas que podem quebrar as ligações da matriz polimérica (Boyd e Chakrabarty, 1994).

O desprendimento é um factor controlador das características físicas e ecológicas dos biofilmes, bem como do desempenho de reactores de biofilme. É também muito importante na determinação da qualidade da água e na ecologia dos sistemas naturais que contêm biofilmes (Rittman, 1989).

## 2.3 FACTORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES

O desenvolvimento de um biofilme pode ser afectado por diversos factores entre os quais se destacam:

- pH, temperatura;
- força iónica do meio;
- a velocidade de escoamento do líquido;
- a qualidade e concentração de nutrientes do meio líquido circundante;
- características dos microrganismos;
- material de construção e rugosidade da superfície sólida;
- presença de material particulado;
- presença de micronutrientes (magnésio, potássio, cálcio, sódio, etc.);
- presença de agentes antimicrobianos.

Revisões bastante detalhadas e profícuas acerca da influência destes e de outros factores na formação de biofilmes são feitas por Characklis (1990), Vieira (1995) e Bott (1996). Por serem factores de análise neste trabalho, o pH, a velocidade de fluxo e a presença de partículas sólidas suspensas no meio líquido, nomeadamente a presença de caulino, vão ser objecto de uma abordagem mais pormenorizada.

### 2.3.1 pH

A maioria dos biofilmes naturais forma-se a valores de pH próximos da neutralidade. Desvios de pH para valores superiores ou inferiores a 7 irão com certeza afectar o desenvolvimento e actividade do biofilme (Bott, 1995), pois o pH tem um efeito preponderante no metabolismo microbiano.

O pH também afecta as propriedades eléctricas superficiais dos microrganismos e das superfícies sólidas, podendo aumentar ou diminuir a repulsão electrostática entre as duas

entidades e, deste modo, interferir com o processo de adesão dos microrganismos às superfícies.

### **2.3.2 Efeitos de velocidade e de turbulência do fluido**

Os efeitos de velocidade, ou melhor dizendo, os efeitos de turbulência no seio do fluido (avaliados pelo número de Reynolds), têm um papel significativo no desenvolvimento e estabilidade dos biofilmes (Bott, 1993). A velocidade e turbulência da corrente líquida em contacto com as superfícies sólidas interfere com os processos de adesão, transporte de nutrientes e de desprendimento dos microrganismos e, conseqüentemente, com o fenómeno de desenvolvimento do biofilme.

A velocidade do fluido influencia as taxas de transferência de massa do seio do líquido para o biofilme bem como a taxa de desprendimento de porções de biofilme (Characklis, 1990). Para baixas velocidades do fluido, a resistência à transferência de massa (nutrientes, oxigénio, micronutrientes, etc.) do meio líquido para os microrganismos embebidos no biofilme é mais elevada, logo o crescimento do filme biológico é prejudicado. À medida que a velocidade aumenta, o número de Reynolds também aumenta e conseqüentemente a turbulência no seio do líquido. Este aumento traduz-se essencialmente em dois aspectos de carácter oposto: por um lado, provoca um aumento da transferência de massa do seio do líquido para o biofilme que se poderá traduzir por um aumento da taxa de desenvolvimento do biofilme; por outro lado, ao aumentar a velocidade aumentam também as forças de tensão de corte que poderão causar maior erosão e desprendimento de porções de biofilme e, por consequência, diminuição da quantidade de biomassa fixada ao suporte sólido. A redução em biomassa origina biofilmes menos espessos, facto este que poderá beneficiar o transporte dos nutrientes no interior do biofilme.

Maiores velocidade e turbulência do líquido também podem afectar a estrutura física dos biofilmes, tornando-os, em particular em regime turbulento, mais finos mas também mais densos e coesos (Vieira *et al.*, 1993).

### **2.3.3 Influência de partículas inorgânicas na formação de biofilmes**

A concentração de partículas sólidas suspensas numa corrente líquida é mais um dos factores que influencia, de maneira substancial, a formação de biofilmes. A intensidade dos

efeitos nos biofilmes está dependente da morfologia, quantidade, tamanho e natureza do material sólido em suspensão, bem como do tipo de microrganismo ou consórcio de microrganismos responsável pela formação do biofilme (Bott e Melo, 1992). Por um lado, determinadas partículas sólidas parecem contribuir para a limpeza dos sistemas industriais devido ao seu carácter erosivo. Bour *et al.* (1981) referem que praticamente não foi detectado biofilme nos circuitos de condensadores em centrais de produção de energia, quando se incorporou partículas sólidas na água de arrefecimento. Por outro lado, algumas partículas provenientes da corrente líquida podem ser incorporadas no próprio biofilme, alterarem a estrutura deste e serem, conseqüentemente, responsáveis por algumas implicações na sua estabilidade (Bott, 1995). O biofilme poderá ficar mais ou menos resistente às condições agressivas do meio circundante. O resultado poderá ser ou o aumento do crescimento e estabilidade do biofilme, ou exactamente o seu inverso. Por exemplo, Bott (1995) refere que as partículas de caulino parecem favorecer o desenvolvimento do biofilme, enquanto que grãos de areia parecem actuar como agentes de limpeza.

#### 2.3.3.1 *Influência de partículas de caulino – referência particular*

Vieira e Melo (1997) referem que a incorporação de pequenas partículas de caulino em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* aumenta a resistência dos biofilmes ao seu desprendimento. Em trabalhos anteriores, Vieira e Melo (1995) acrescentam que o caulino aumenta o desenvolvimento do biofilme, sendo este efeito mais visível para velocidades de líquido elevadas, acrescentando que a explicação para este facto se pode dever aos seguintes factores: o caulino pode actuar como reservatório de nutrientes dentro do biofilme ou modificar a estrutura do depósito biológico de modo a facilitar a difusão interna dos nutrientes.

## 2.4 RELEVÂNCIA DOS BIOFILMES

O facto de um biofilme ser uma acumulação natural de microrganismos numa superfície sólida, pressupõe a sua existência desde sempre, ainda que o seu reconhecimento e registo seja mais contemporâneo. São numerosos os exemplos de biofilmes naturais, isto é, que se

formam espontaneamente em quase qualquer superfície imersa em meio aquoso, apresentando pois uma grande capacidade de adaptação às mais diversas situações.

Do ponto de vista do interesse do Homem, os biofilmes podem ser neutros, benéficos ou prejudiciais. Neste último caso, os biofilmes passam a ser referidos industrialmente como sujamento biológico, sendo o termo anglo-saxónico “biofouling” um dos mais usados para descrever estas situações. Os efeitos dos biofilmes, quer vantajosos quer adversos, realçam a sua importância nos processos naturais e industriais, alertando para a necessidade do seu estudo e para o desenvolvimento de estratégias de exploração (no caso dos biofilmes benéficos) e combate (no caso dos biofilmes prejudiciais).

#### **2.4.1 Biofilmes benéficos**

Na natureza, os biofilmes desempenham papéis fulcrais nos ecossistemas e nos ciclos de nutrientes (ciclos de azoto, enxofre, fósforo, etc.). Este potencial natural dos biofilmes foi e continua a ser explorado pelo Homem em inúmeros processos biotecnológicos, dos quais a produção de vinagre será provavelmente o processo mais antigo. A produção de “sherry” e de ácido cítrico são mais dois exemplos tradicionais de aplicação de biofilmes na indústria alimentar (Gjaltema, 1996).

Outra área na qual os biofilmes são fortemente explorados é na biotecnologia ambiental, nomeadamente no tratamento de águas residuais, já que os biofilmes podem remover os poluentes orgânicos e inorgânicos presentes nos efluentes. Novamente, esta aplicação biotecnológica de biofilmes surgiu após o Homem ter reconhecido que os biofilmes acumulados nos leitos dos rios e/ou nas partículas suspensas dos rios e lagos, bem como em ambientes marinhos, contribuíam para a remoção de contaminantes da água. Os filtros de areia, aplicados à purificação de água, constituem, por isso, uma das mais antigas aplicações de biofilmes na biotecnologia ambiental (Harrison, 1921, citado por Gjaltema, 1996).

## 2.4.2 Biofilmes prejudiciais: o “Sujamento biológico”

### 2.4.2.1 Definição de “Sujamento biológico”

Infelizmente, nem sempre as potencialidades naturais dos biofilmes constituem vantagens para o Homem. Na maioria das situações a adesão de microrganismos a superfícies sólidas é indesejável pois, de uma maneira geral, está associada à deterioração das superfícies e/ou do ambiente circundante. Estes biofilmes indesejáveis, vulgarmente referidos como sujamento biológico ou “biofouling”, afectam uma grande diversidade de habitats microbianos, como por exemplo os dentes, as lentes de contacto, as próteses e implantes no corpo humano, os sistemas de distribuição de água potável, os materiais de construção de edifícios e monumentos, os processos industriais dependentes de água, como permutadores de calor, membranas de osmose inversa e ultrafiltração.

O sujamento biológico é um problema operacional decorrente da existência de biofilmes, isto é, primeiro surge o desenvolvimento de um biofilme que poderá evoluir para sujamento se a sua acumulação exceder um determinado “limiar de interferência” (Flemming *et al.*, 1994) a partir do qual surgem consequências indesejáveis e danosas, geralmente de origem microbiológica. Consequentemente, para que se possam entender os problemas associados com este fenómeno é necessário o prévio conhecimento das propriedades e dinâmica dos biofilmes.

Na maioria dos sistemas industriais, o sujamento biológico surge frequentemente associado com outros tipos de sujamento (“fouling”) decorrentes da deposição de partículas inorgânicas, precipitados cristalinos e/ou produtos de corrosão. Quando se torna complicado determinar a composição do material aderido a uma determinada superfície, este geralmente passa a ser apelidado de *depósito*.

### 2.4.2.2 Exemplos de biofouling

São referidos de seguida alguns dos mais vulgares exemplos de biofouling. Note-se, contudo, que esta lista não pretende ser, de todo, exaustiva.

A acumulação de biofilme nas tubagens de distribuição de água, nos dentes (cárie dentária), nas paredes de edifícios e monumentos (Gaylarde e Morton, 1999), nos cascos de

navios, etc., aceleram a biodeterioração dos materiais, indício do carácter problemático dos biofilmes (Bott, 1995).

Nos sistemas de distribuição de água potável, a formação de biofilme, e principalmente o seu desprendimento, constitui um factor de diminuição da qualidade da água (LeChevallier e McFeters, 1985).

Na indústria da pasta e do papel, a presença de biofilmes é responsável pela diminuição da qualidade do papel (em resultado do desprendimento e incorporação no papel de porções de biofilme), pela biocorrosão dos equipamentos, pela formação de odores indesejáveis, etc., que, de uma forma geral, se traduzem em quebras de produção com os consequentes prejuízos económicos (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Gudlauskis, 1996; Klahre *et al.*, 1997).

Nos permutadores de calor, o biofouling aumenta a resistência à transferência de calor e a queda de pressão, traduzindo-se num maior consumo energético (Bott, 1995).

No campo médico, a adesão de microrganismos aos tecidos humanos representa um problema sério que requer precauções especiais, uma vez que é referenciada como sendo responsável por uma grande variedade de problemas na saúde, como por exemplo doenças dos pulmões, infecções gastrointestinais e do tracto urinário. Os biofilmes, principalmente os desenvolvidos pelo género *Staphylococcus*, são um dos principais problemas de contaminação dos implantes, tais como os “pacemakers” cardíacos, catéteres, próteses e válvulas artificiais (Costerton *et al.*, 1987; Morton e Surman, 1994).

Os biofilmes também podem acumular quantidades apreciáveis de substâncias perigosas (metais pesados, por exemplo) tornando-se, conseqüentemente, material perigoso também.

#### 2.4.2.3 *Implicações associadas ao fouling*

O biofouling na indústria é geralmente sinónimo de prejuízo económico, pois provoca danos nas superfícies sólidas onde se acumula, limita a superfície para a função a que está destinada, reduz o desempenho dos processos e eficiência de operação do equipamento. Este agravamento económico decorre geralmente de (Characklis, 1990):

- Perdas de energia devido ao aumento da resistência friccional do fluido e ao aumento da resistência à transferência de calor;
- Aumento dos custos de capital para o sobredimensionamento dos equipamentos quando se prevê, de antemão, a possibilidade de formação de sujamento;
- Aumento dos custos de capital para a substituição precoce de equipamento devido ao encurtamento do tempo de vida útil;
- Aumento dos custos correntes devido às acrescidas despesas de limpeza e manutenção;
- Problemas no controlo da qualidade dos produtos; diminuição da qualidade dos mesmos;

O biofouling pode também ter forte implicação a nível de problemas de segurança e de saúde pública e ambiental. Neste último caso, salienta-se a acção nefasta que a disseminação de microrganismos e a maior parte dos biocidas, usados industrialmente no controlo dos biofilmes, pode ter sobre o Ambiente.

Os custos económicos inerentes à presença de sujamento biológico nos equipamentos são enormes apesar de quase sempre serem estimados por defeito, uma vez que o reconhecimento dos prejuízos associados à presença de microrganismos nem sempre ser aceite. A título ilustrativo apresentam-se alguns exemplos, tais como: Flemming *et al.* (1994) referem que o sujamento biológico nas membranas de osmose inversa acarreta um custo de US \$728 000 por ano, cerca de 30% dos custos de operação; o sujamento biológico nos condensadores arrefecidos a água causa um prejuízo de cerca de US \$800 000 000 por ano; os custos associados com o combustível adicional necessário para mover os navios da “US Navy” devido ao sujamento biológico nos seus cascos andam à volta de US \$500 000 000 por ano (White (comunicação pessoal), citado por Flemming *et al.*, 1990);

## 2.5 REACTORES DE BIOFILME

Todos os reactores biológicos que têm como principal denominador comum o facto da biomassa estar fixada a suportes sólidos e não suspensa no meio líquido, são designados por reactores de biofilme. Refira-se que, no presente contexto, a palavra “biomassa” é usada

para definir o conjunto formado pelas células microbianas constituídas em biofilme juntamente com as substâncias poliméricas por elas excretadas. À luz desta ressalva, os bio-reactores que utilizam sistemas de células imobilizadas não são considerados reactores de biofilme e portanto estão fora do âmbito deste sub-capítulo.

Os reactores de biofilme são, de um modo geral, bastante vantajosos uma vez que altas concentrações de biomassa podem ser obtidas mesmo para taxas de diluição elevadas (Gjaltema, 1996). Este factor é especialmente significativo em situações onde a capacidade dos reactores para manter uma alta concentração de microrganismos em suspensão é limitada. Com esta propriedade supera-se a restrição segundo a qual a taxa de diluição não pode ultrapassar a taxa específica de crescimento dos microrganismos (Bailey e Ollis, 1986) sob o risco de ocorrer lavagem da biomassa do sistema. Pelo facto da biomassa estar fixa, o uso deste tipo de bio-reactores pressupõe também uma menor exigência de operações de separação de sólidos a jusante do reactor, bem como uma maior estabilidade do reactor face a variações das condições ambientais envolventes (choque orgânico, choque hidráulico, choque térmico, presença de substâncias tóxicas, etc.) (Bryers e Characklis, 1990).

Pelas razões apontadas, os bio-reactores de biofilme, *i. e.*, de biomassa fixada, têm vindo a constituir uma alternativa bastante promissora aos tradicionais processos que operam com microrganismos em suspensão.

### **2.5.1 Reactores industriais de biofilme - breve referência**

Os reactores de biofilme são especialmente usados e com bastante frequência nos sistemas de tratamento de águas residuais, ainda que não possa ser descurado o seu uso noutros processos fermentativos (Gikas e Livingston, 1993). Estes sistemas de tratamento têm vindo a ser aplicados na degradação de carbono orgânico, na nitrificação e na desnitrificação, na geração anaeróbia de metano, na remoção de metais pesados, etc. (Bryers, 1994). Os sistemas de discos biológicos rotativos e os leitos percoladores são exemplos clássicos de reactores de biofilme utilizados no tratamento de efluentes.

Para além dos tradicionais reactores de biofilme, em que a biomassa está aderida a suportes sólidos, outros reactores há em que a biomassa se auto-suporta agregando-se em grânulos esféricos compactos que são mantidos no reactor devido à diferença de densidade.

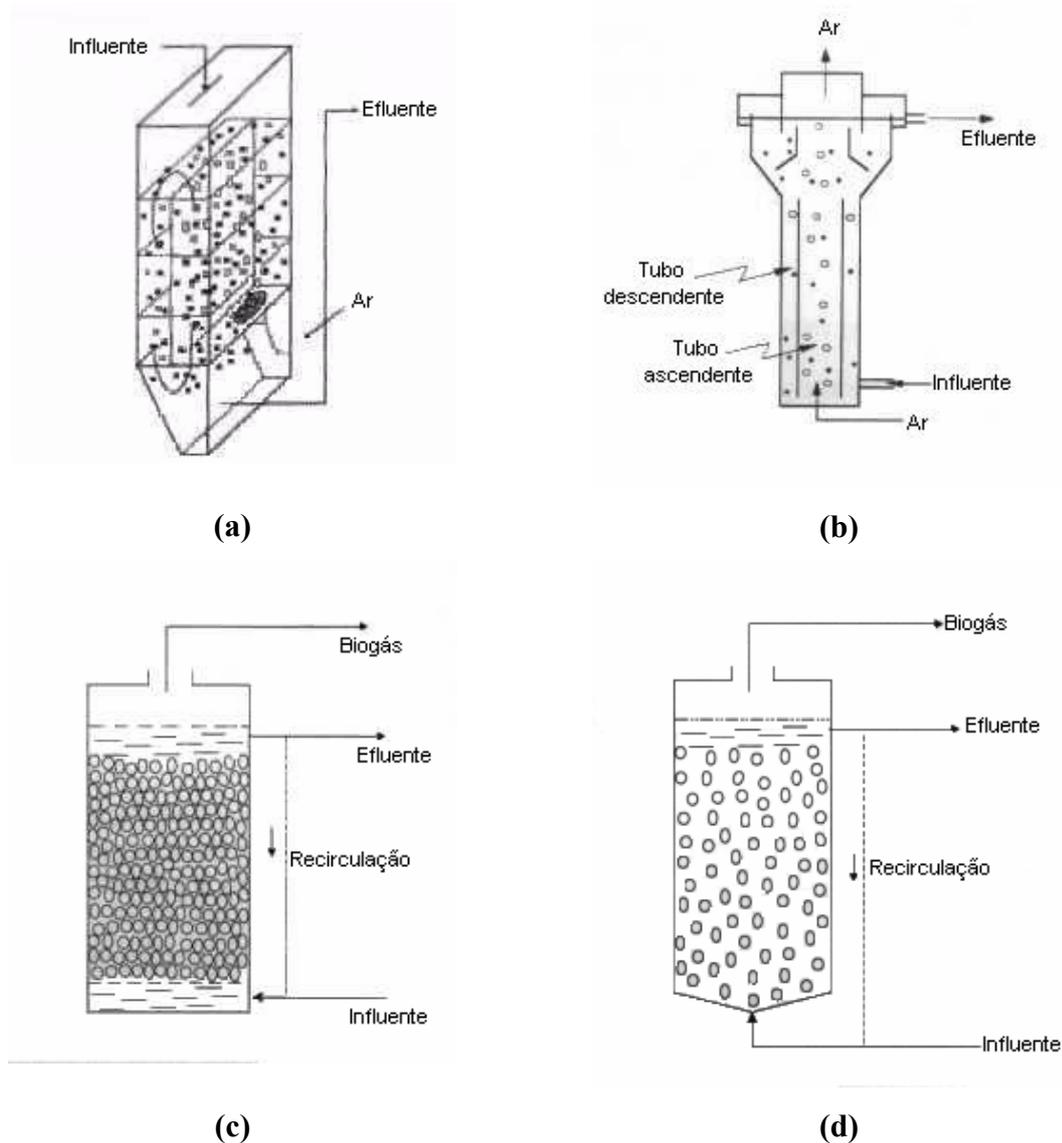
Estes bio-reactores apresentam vantagens semelhantes às apresentadas pelos reactores de biomassa fixa em superfícies sólidas.

A geração mais recente de reactores de biofilme engloba os reactores que utilizam partículas sólidas inorgânicas em suspensão para a fixação da biomassa e não superfícies sólidas fixas. Com este tipo de reactores obtém-se, para além das vantagens já enunciadas para reactores de biofilme, um significativo aumento da área superficial de biofilme bem como um controlo intrínseco da espessura do biofilme já que o excesso de biomassa é removido por abrasão em consequência do contacto entre as partículas (Bryers e Characklis, 1990) e pela intensidade de turbulência, principalmente nos sistemas trifásicos (Gjaltema *et al.*, 1997; van Hamersveld *et al.*, 1998).

A Tabela 2.1 apresenta alguns dos reactores de biofilme de aplicação mais frequente em processos biotecnológicos, nomeadamente no tratamento de efluentes, encontrando-se esquematizadas na Figura 2.3 algumas das configurações mais comuns desses bio-reactores.

**Tabela 2.1** Reactores biológicos usados no tratamento de águas e efluentes

Reactores com biomassa não fixada a suportes sólidos	Reactores com biomassa fixada a suportes sólidos	
	Suporte fixo	Suporte móvel
SISTEMA DE LAMAS ACTIVADAS	LEITO PERCOLADOR	LEITO FLUIDIZADO
DIGESTOR ANAERÓBIO	FILTRO SUBMERSO	LEITO EXPANDIDO
UASB (Reactor de Manto de Lamas de Fluxo Ascendente)	DISCOS BIOLÓGICOS ROTATIVOS	LEITO CIRCULANTE AIR-LIFT (Reactor de Recirculação por Arejamento)



**Figura 2.3** Configurações mais comuns dos reatores de biofilme (Melo e Oliveira, 2001):  
**(a)** Reactor de leito circulante; **(b)** Reactor air-lift; **(c)** Filtro anaeróbico de leito fixo;  
**(d)** Digestor aneróbico de leito fluidizado.

### 2.5.2 Reactores para monitorização de biofilmes

Estes têm vindo a constituir, principalmente em anos mais recentes, parte integrante das estratégias de investigação na área dos biofilmes. Pretende-se, assim, tentar entender, prever e influenciar a formação de biofilmes. Neste sentido, foram desenvolvidos acentuados esforços no intuito de desenhar e desenvolver reatores que minimizem as heterogeneidades e tornem a monitorização dos biofilmes mais fácil e eficiente.

Os bio-reactores laboratoriais para a monitorização de biofilme podem ser divididos em dois grupos distintos tendo por base os objectivos da pesquisa a efectuar e as consequências desta para o desenho do reactor e melhoria do desempenho dos processos de biofilme implementados.

#### 2.5.2.1 *Reactores à escala laboratorial com geometria industrial*

Estes reactores nada mais são que pequenas réplicas dos reactores industriais onde são simulados os processos biotecnológicos de larga escala. Utilizam-se para investigar, desenvolver e otimizar os processos biológicos tal como ocorrem em reactores de biofilme industriais de larga escala. As informações obtidas podem ser extrapoladas para bio-reactores de larga escala, embora sejam conhecidas as dificuldades do aumento de escala (Sousa *et al.*, 1994).

São inúmeros os trabalhos já publicados que descrevem o uso laboratorial destes bio-reactores de pequena escala no estudo de processos de tratamento de efluentes e de água potável. Podem citar-se, a título de exemplo, os trabalhos com reactores “airlift” (Tijhuis *et al.*, 1994, Lopes *et al.*, 2000; van Loosdrecht *et al.*, 2000), reactores de discos biológicos rotativos (Watanabe *et al.*, 1994; Mohseni-Bandpi *et al.*, 1998; Teixeira e Oliveira, 2000), filtros percoladores (Gouzinis *et al.*, 1998; Chiou *et al.*, 2001), filtros anaeróbios (Hawkes *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1997), reactor de leito circulante (Lazarova *et al.*, 1997), bio-reactores de membrana (Brindle *et al.*, 1998; Lee e Rittman, 2000; Barreiros *et al.*, 2001).

#### 2.5.2.2 *Secções de teste específicas*

Este segundo grupo engloba todos os dispositivos desenvolvidos experimentalmente para o estudo da formação de biofilmes em ambiente bem controlado e reprodutível. Com estes dispositivos de teste tenta-se obter de forma mais expedita informações acerca do crescimento, estrutura e actividade de biofilmes, bem como da cinética de consumo de substratos. Estas informações seriam mais morosas e difíceis de obter em reactores de geometria semelhante à industrial ou com biofilmes formados em habitats naturais.

Estas secções de teste são geralmente projectadas segundo geometrias muito específicas, ainda que todas elas se rejam pelo mesmo tipo de propósitos, a seguir descritos de maneira sucinta:

- Possibilidade de utilização de qualquer tipo de material como superfície sólida de adesão; este propósito surge do conhecimento de que as bactérias podem colonizar quase qualquer tipo de material e de que as propriedades de um biofilme são determinadas, em parte, pelo tipo de material onde este se forma;
- Facilidade de remoção, em condições de assepsia, de amostras de biofilme representativas e reprodutíveis. A amostragem do biofilme não deve ser dissociada da superfície de adesão onde este está aderido por forma a minimizar as possíveis perturbações da estrutura e morfologia do biofilme;
- Possibilidade de manipulação de todos os parâmetros de operação: químicos (tipo e concentração de nutrientes, pH, oxigénio dissolvido, por exemplo), físicos (temperatura, tempo de retenção hidráulico, regime de fluxo) e biológicos (tipo e concentração de microrganismos) (Bryers e Characklis, 1992). Caso necessário, as secções de teste devem ser de fácil esterilização e de manipulação em condições assépticas, permitindo estudos envolvendo consórcios de microrganismos ou culturas puras de espécies simples;
- Possibilidade de desenvolvimento de um biofilme até ao estabelecimento da fase estacionária de crescimento. Avaliação fácil, directa, se possível não destrutiva e em tempo real da acumulação do biofilme ao longo do tempo (Mittelman *et al.*, 1992);
- Possibilidade de aceder ao interior do reactor para a introdução de sensores de diagnóstico da adesão celular, e da formação e reactividade do biofilme, etc.

Na maior parte das secções de teste, a amostragem de biofilme envolve a remoção de pequenas secções da superfície sólida de adesão. Reactores anulares rotativos, dos quais o Roto Torque (Bakke *et al.*, 1984) é o modelo mais conhecido, e as Células de Fluxo, entre as quais o Dispositivo de Robbins (McCoy *et al.*, 1981) se inclui, são os principais exemplos de secções de teste laboratoriais com superfícies removíveis. Outras geometrias de secções de teste podem também ser referidas, ainda que a amostragem de biofilme não envolva a remoção de parte da superfície sólida, tais como: quimiostatos, reactores tubulares, reactores de membrana.

### *Células de fluxo*

O desenvolvimento das células de fluxo, particularmente as de secção circular, é atribuído, em grande parte, à sua óbvia similaridade geométrica com uma variada gama de sistemas quer industriais (condutas de abastecimento de água, tubos de permutadores de calor, etc.) quer médicos (catéteres, enxertos cardiovasculares, etc.) onde é frequente a ocorrência de biofilmes. Estes sistemas podem ser sumariamente descritos como segmentos de condutas com incorporação de superfícies sólidas removíveis na parede interna para amostragem de biofilme ao longo do tempo (Bryers e Characklis, 1992).

As células de fluxo, como sistemas de teste “on-line”, apresentam muitas vantagens práticas que incluem facilidade de construção, baixo custo e facilidade de integração nos sistemas industriais (Nivens *et al.*, 1995).

Um dos primeiros protótipos de células de fluxo foi desenvolvido por Jim Robbins há vinte anos atrás (McCoy *et al.*, 1981) e por isso baptizado de dispositivo de Robbins. Esta secção de teste, construída a partir de um tubo de PVC, continha flanges entre as quais as superfícies circulares de teste eram inseridas, passando a fazer parte da parede interna do tubo. As superfícies circulares de adesão podiam ser removidas periodicamente e o biofilme aí desenvolvido reservado para posterior análise. Este tipo de dispositivo foi idealizado como um sistema de amostragem *in-situ* para a monitorização de biofilmes e para testar métodos de controlo de desenvolvimento do biofilme com agentes antimicrobianos em condutas industriais. Esta especificidade constituiu um condicionalismo à sua aplicação directa em outras áreas como, por exemplo, a área médica. Para obviar a esta limitação, algumas modificações foram desenvolvidas (Lappin-Scott *et al.*, 1993) e surgiu o Dispositivo de Robbins Modificado (MRD) que foi aplicado, e com bastante proveito, no estudo de biofilmes em áreas mais diversas como a área médica (Nickel *et al.*, 1985; Evan e Holmes, 1987), ambiental e em sistemas industriais (Gilbert e Allison, 1993).

Um outro modelo de células de fluxo utiliza canais de fluxo de secção rectangular que podem encaixar no seu interior pequenas placas removíveis para monitorizar a formação de biofilme. Estas células de fluxo rectangulares são vulgarmente designadas de Células de Fluxo com Placas. Huang *et al.* (1992) apresentaram e testaram, referindo inúmeras vantagens, uma célula de fluxo com placas de amostragem paralelas para avaliação da

adesão celular e da quantificação da cinética de formação de biofilmes para quatro estirpes diferentes da bactéria *Escherichia coli*.

Vieira *et al.* (1993) desenvolveram uma célula de fluxo baseada numa conduta de secção semicircular para a monitorização da transferência de calor e de massa através de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* desenvolvidos, em regime turbulento, a diferentes velocidades de fluido. Para tal, a célula de fluxo alojava, na face plana da secção semicircular, placas de alumínio (no caso dos estudos de transferência de calor) ou então membranas (no caso da transferência de massa) para a deposição do depósito biológico.

#### *Reactores anulares rotativos*

O Roto Torque consiste em dois cilindros concêntricos, um exterior estacionário e um interior rotativo. As secções de amostragem removíveis constituem parte da parede interna do cilindro externo (Characklis, 1990). Este é continuamente agitado pelo movimento do cilindro interior rotativo, assegurando-se assim uma boa mistura de todos os componentes da fase líquida. Este tipo de reactor é de fácil operação e compacto pois, num espaço limitado, oferece uma elevada área superficial para a formação de biofilme. A principal desvantagem deste reactor é que, contrariamente ao que seria suposto, o Roto Torque não garante tensões de corte uniformes em toda a superfície disponível para a formação do biofilme (Gjaltema, 1996). Com efeito, a não uniformidade da velocidade e padrões de fluxo faz com que as tensões de corte quer no fundo quer no topo do reactor difiram das registadas no espaço anular entre os dois cilindros. Este facto torna o Roto Torque inadequado para estudos quantitativos, quer fisiológicos quer cinéticos, uma vez que não é possível obter-se amostras representativas de biofilmes, continuando, no entanto, a ser válido para determinações qualitativas acerca do desenvolvimento e morfologia dos biofilmes.

Uma das vantagens dos Reactores Anulares Rotativos em relação às Células de Fluxo é que a tensão de corte e a velocidade linear são determinadas pela velocidade rotacional do cilindro interno e por isso independentes do caudal de fluido alimentado ao reactor (Bryers e Characklis, 1992).

São inúmeros os trabalhos desenvolvidos em Roto Torque. A título de exemplo referem-se os trabalhos realizados por: Turakhia e Characklis (1989) em que foi investigado

a influência do cálcio na actividade de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*; Chen *et al.*, (1993) investigaram o efeito da monocloramina no tratamento de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* formados em diferentes superfícies de adesão; Gjaltema (1996) utilizou um bio-reactor Roto Torque para desenvolver e caracterizar, quantitativa e qualitativamente, biofilmes formados a partir de diferentes culturas bacterianas e determinar o tipo e grau de heterogeneidade que cada um dos biofilmes apresentava; Neu e Lawrence (1997) investigaram através de microscopia confocal laser de varrimento a estrutura de biofilmes mistos desenvolvidos pela circulação de água real de um rio.

A estratégia mais básica seguida no projecto de secções de teste tem como objectivo fundamental uniformizar as tensões de corte e eliminar os gradientes de concentração (Gjaltema, 1996), velocidade e temperatura no interior do reactor evitando-se assim diferenças locais nas taxas de adesão e desprendimento de biofilme, *i. e.*, diferentes desenvolvimentos de biofilme consoante o local do interior do reactor onde estão a ser formados. A ausência de gradientes no seio do líquido no interior do reactor é geralmente obtida por uma adequada mistura e/ou altas taxas de recirculação. Células de fluxo e dispositivos tubulares estão, por isso, quase sempre associados a tanques perfeitamente agitados (Huang *et al.*, 1992) onde se promove o crescimento contínuo de culturas microbianas a taxas de crescimento específicas e bem controladas. Jass *et al.* (1995) demonstraram as vantagens da associação quimiostato-MRD no estudo da adesão de bactérias e formação de biofilme por populações de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* em dispositivos tubulares.

Ainda que a ausência de gradientes seja um dos factores mais decisivo na tecnologia de reactores de biofilme, estão também descritos (Wimpenny *et al.*, 1989) sistemas laboratoriais de ensaio projectados para o estabelecimento de gradientes físico-químicos, nomeadamente gradientes de concentração de nutrientes, a fim de se investigar o comportamento dos microrganismos em resposta a esses gradientes. Os autores classificam-nos como modelos de sistemas naturais uma vez que, na natureza, a maioria dos ecossistemas são espacialmente heterogéneos (lagos e mares, filmes microbianos, solo, agregações de microrganismos).

## 2.6 BIBLIOGRAFIA

- Alves, M. M., Pereira, M. A., Bellouti, M., Álvares Pereira, R. M., Mota Vieira, R. M., Novais, J. e Mota, M. 1998. A new method to study interactions between biomass and packing material in anaerobic filters. *Biotechnology techniques*, 12(4), 227-283.
- Azeredo, J. e Oliveira, R. 2000. The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. *Biofouling*, 16(1), 17-27.
- Bailey, J. E. e Ollis, D. F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Bakke, R., Trulear, M. G., Robinson, J. A. e Characklis, W. G. 1984. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in steady state. *Biotech. and Bioeng.*, 26, 1418-1424.
- Barreiros, A. M., Velizarov, S., Fortunato, R., Martinho, C., Crespo, J. G. e Reis M. A. M. 2001. Membrane bioreactors for water denitrification. In: Morais, C., Teixeira, F., Pereira, I., Vasconcelos, L. Ribeiro, M., Lima, M., Esteves, T. S. e Beleza, V. eds. *International Water Conference-IWC2001*, Porto Portugal, 43-50.
- Bott, T. R. 1993. Aspects of biofilm formation and destruction. *Corrosion Reviews*, 11, 1-24.
- Bott, T. R. 1995. *Fouling of Heat Exchangers*. Amsterdam: Elsevier.
- Bott, T. R. e Melo, L. F. 1992. Particle-bacteria interactions in biofilms. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 199-206.
- Bour, D. P., Battaglia, P. J. e Burd, K. M. 1981. *Biofouling Control Practice and Assessment*. EPRI Report CS, Palo Alto.
- Boyd, A. e Chakrabarty, A. M. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2355-2359.
- Brindle, K., Stephenson, T. e Semmens, M. J. 1998. Nitrification and oxygen utilization in a membrane aeration bioreactor. *J. Membr. Sci.*, 144, 617-624.
- Bryers, J. D., 1983. Modelling biofilm accumulation. In: Bazin, M. Y. e Prosser, J. I. eds. *Physiological Models in Microbiology*, Boca Raton: CRC, vol 2, 110-144.
- Bryers, J. D., 1983. Biological active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnology Progress*, 3(2), 5768.
- Bryers, J. D., 1994. Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2, 9-23.
- Bryers, J. D. e Characklis, W. G. 1982. Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2451-2476.
- Bryers, J. D. e Characklis, W. G., 1990. Biofilms in water and wastewater treatment. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 671-696.
- Bryers, J. D. e Characklis, W. G., 1992. Biofilm laboratory methods: the use of flow reactors. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M., Capdeville, B. eds. *Biofilms-Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 615-629.
- Chamberlain, A. H. L., 1992. The Role of Adsorbed layers in bacterial adhesion. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 59-67.
- Characklis, W. G. 1981. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1923-1960.
- Characklis, W. G. 1990. Laboratory biofilm reactors. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 55-89.

- Characklis, W. G. 1990. Biofouling: effects and control. *In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 7-27.
- Characklis, W. G. 1990. Biofilms processes. *In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 195-231.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. 1990. Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach. *In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 3-15.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. e McFeters, G. A. 1990. The microbial cell. *In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 131-159.
- Characklis, W. G., McFeters, G. A. e Marshall, K. C. 1990. Physiological ecology in biofilms systems. *In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 341-394.
- Chen, C.-I., Griebe, T. Srinivasan, R. e Stewart, P. S. 1993. Effects of various metal substrata on accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and the efficacy of monochloramine as a biocide. *Biofouling*, 7, 241-251.
- Chiou, R.-J e Ouyang, C.-F. 2001. The effect of recycle ratio on nitrogen removal in the combined pre-denitrification/nitrification biofilter system. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 76, 559-564.
- Christensen, B. E., Characklis, W. G. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. *In: Characklis, W. G, Marshall, K. C. eds. Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 93-130.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. J., Nickel, J. C., Dasgupta, M. e Marrie, T. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews of Microbiolog*, 41, 435-464.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. e Cheng, K.-J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95.
- Evans, R. C. e Holmes, C. J. 1987. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, 889-894.
- Flemming, H-C., 1993. Biofilms and environmental protection. *Wat. Sci. Tech*, 27(7-8), 1-10.
- Flemming, H-C., 1991. Biofouling in water treatment. *In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 47-80.
- Flemming, H-C., 1991. Introduction: biofilms as a particular form of microbial Life. *In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 1-7.
- Flemming, H-C., Schaule, G., McDonogh, R. e Ridgway, H. F. 1994. Mechanism and extent of membrane biofouling. *In: Geesey, G. G., Lewandowski, Z. e Flemming, H-C. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Michigan, Lewis Publishers, 63-89.
- Flemming, H-C., Wingender, J. 1999. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilm construction material. *In: Weber, J., sand, W. eds. Biofouling and Materials: COST 520 Workshop*. Bern: EDMZ, 2-18.
- Fletcher, M. 1992. Bacterial metabolism in biofilms. *In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 113-124.
- Gaylarde, C. C. e Morton, L. H. G. 1999. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. *Biofouling*, 41(1), 59-74.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. e Sand, W. 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2743-2747.
- Gikas, P. e Livingston, A. G. 1993. Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 1337-1351.

- Gilbert, P. e Allison, D. G. 1993. Laboratory methods for biofilm production. In: Denyer, S. P., Gorman, S. P. and Sussman, M. eds. *Microbial Biofilms: Formation and Control*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 29-49.
- Gjaltema, A., 1996. Dissertação de Doutorado: *Biofilm Development: Growth versus Detachment*. Delft: Technische Universiteit Delft, Netherlands.
- Gjaltema, A., Vinke, J. L., van Loosdrecht, M. C. M. e Heijnen, J. J. 1997. Abrasion of suspended biofilm pellets in airlift reactors: importance of shape, structure, and particle concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 88-99.
- Gouzinis, A., Kosmidis, N., Vayenas, D. V. e Lyberatos, G. 1998. Removal of Mn and simultaneous removal of NH<sub>3</sub>, Fe e Mn from potable water using a trickling filter. *Water. Reserach*, 32, 2442-2453.
- Gudlauskis, D. 1996. Whitewater system closure means managing microbiological buildup. *Pulp and Paper Magazine*, March 1996.
- Harrison, F. C. 1921. Microorganisms in water. In: Marshall, C. E. ed. *Microbiology: A Textbook on Microorganisms General and Applied*. Churchill, London, 310-329.
- Hawkes, F.-R., Donnelly, T. e Anderson, G. K. 1995. Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Wat. Res.*, 29(2), 525-533.
- Horan, N. J. e Eccles, C. R. 1986. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Research*, 20, 1427-1432.
- Huang, C-T., Peretti, S. W. e Bryers, J. D. 1992. Use of flow cell reactors to quantify biofilm formation kinetics. *Biotechnology Techniques*, 6, 193-198.
- Jahn, A. e Nielsen, P. H. 1995. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Tech*, 32(8), 157-164.
- Jahn, A., Griebe, T. e Nielsen, P. H. 1999. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*, 14(1), 49-57.
- Jass, J., Costerton, J. W. e Lappin-Scott, H. M. 1995. Assessment of a chemostat-coupled modified Robbins device to study biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 283-289.
- Klahre, J., Lustenberger, M. e Flemming, H-C. 1997. The achilles heel of paper production: microbial problems. In: *Wet and Chemistry Conference & COST Workshop*, Gatwick, 28-29 May, Pira International.
- Lappin-Scott, H. M., Jass, J. e Costerton, J. W. 1993. Microbial biofilm formation and characterization. In: Denyer, S. P., Gorman, S. P. and Sussman, M. eds. *Microbial Biofilms: Formation and Control*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1-12.
- Lazarova, V., Nogueira, R., Manem, J. e Melo, L. 1997. Control of nitrification efficiency in a new biofilm reactor. *Wat. Sci. Tech*, 36(1), 31-41.
- LeChevallier, M. W. e McFeters, G. A. 1985. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 12338-1341.
- Lee, K. C. e Rittman, B. E. 2000. A novel hollow-fiber membrane biofilm reactor for autohydrogenotrophic denitrification of drinking water. *Wat. Sci. Tech*, 41(4-5), 219-226.
- Lessel, T., Motsch, H. e Hennig, E., 1975. Experience with a pilot plant for the irradiation of sewage sludge. In: *Radiation for a Clean Environment*. Int. Atom. En. Ag. Vienna, 1975, 447-463.
- Lopes, F. A., Vieira, M. J. e Melo, L. 2000. Chemical composition and activity of a biofilm during the start-up of an airlift reactor. *Wat. Sci. Tech*, 41(4-5), 105-111.
- Marshall, K. C. e Blainey, B. L. 1990. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: Flemming H-C, Geesey G G (eds) *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg, pp 29-45.

- Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*, 8(4), 573-603.
- McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J. e Costerton, J. W. 1981. Observations in fouling biofilm formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 27, 910-917.
- Melo, L. F. 1994. Biofilmes e o controlo da poluição. *Boletim de Biotecnologia*, 48, 16-25.
- Melo, L. F e Oliveira, R. 2001. Biofilm reactors. In: Cabral, J. M. S., Mota, M. e Tramper, J. eds. *Multiphase Bioreactor Design*. Harwood Academic Publishers, UK.
- Mittelman, M. W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81, 2760-2764.
- Mittelman, M. W, Kohring, L. L. e White, D. C. 1992. Multipurpose laminar-flow adhesion cells for the study of bacterial colonization and biofilm formation. *Biofouling*, 6, 39-51.
- Mohseni-Bandpi, A. e Elliot, D. J. 1998. Groundwater denitrification with alternative carbon sources. *Wat. Sci. Tech.*, 38, 237-243.
- Morton, L. H. G., Surman, S. B. 1994. Biofilms in biodeterioration – a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 203-221.
- Neu, T. R. 1994. Ecophysiology and structure – biofilms and microbial mats. In: Krumbein, W. E., Paterson, D. M. e Stal, L. J. eds. *Biostabilization of Sediments*. Oldenburg, Germany: Verlag, 9-15.
- Neu, T. R. 1996. Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev*, 60, 151-166.
- Neu, T. R. e Lawrence, J. R. 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 11-25.
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. e Costerton, J. W. 1985. Tobramycin resistance of cells of *Pseudomonas aeruginosa* growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 619-624.
- Nielsen, P. H., Jahn, A., Palmgren R. 1997. Conceptual model for production and composition of copolymers in biofilms. *Wat. Sci. and Tech.* 36, 11-19.
- Nivens, D. E., Palmer, R. J. Jr e White, D. C. 1995. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 263-276.
- Ratsak, C. H., Maarsen, K. A. e Kooijman, S. A. L. M. 1996. Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Review. Wat. Res.*, 30, 1-12.
- Rittmann, B. E. 1989. Detachment from biofilms. In: Characklis, W. G. e Wilderer, P. A. eds. *Structure and Function of Biofilms*. Dahlem Workshop, John Wiley and Sons, Inc, 49-58.
- Ruiz, I., Veiga, M. C., de Santiago, P., e Blázquez, R. 1997. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and na anaerobic filter. *Biores. Technol.*, 60, 251-258.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M. 1994. Comparative analysis of ethanolic fermentation in two continuous flocculation bioreactors and effect of flocculation additive. *Bioprocess Engineering*, 11, 83-90.
- Teixeira, P. e Oliveira, R. 2000. Denitrification by *Alcaligenes denitrificans* in a closed rotating biological contactpr. *Biotechnology Letters*, 22, 1789-1792.
- Tijhuis, L., van Loosdrecht, M. C. M. e Heijnen, J. J. 1994. Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 595-608.
- Turakhia, M. H. e Characklis, W. G. 1989. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: effect of calcium. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 406-414.
- van Hamersveld, E. H., van der lans, R. G. J. M., Caulet, P. J. C. e Luyben, K. Ch. A. M. 1998. Modeling brewers' yeast flocculation. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 330-341.

- Van Loosdrecht, M. C. M. e Heijnen, J. J. 2000. Integration of nitrification and denitrification in biofilm airlift suspension reactors. *Wat. Sci. Technol*, 41(4-5), 97-103.
- Vieira, M. J. 1995. Dissertação de Doutoramento: Estudo da Formação de Filmes Biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos Efeitos Associados à Transferência de Massa Interna e à Incorporação de Partículas de Caulino. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Vieira, M. J., Melo, L. F. 1995. Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Wat. Sci. Tech.*, 32, 45-52.
- Vieira, M. J., Melo, L. F. 1997. Preventing Biofouling in Heat Exchangers: An Experimental Assessment of the Effects of Water Velocity and Inorganic Particles on Deposit Detachment. In: Giot, M., Mayinger, F. e Celata, G. P. eds. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Conference on Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics and Thermodynamics*, Pisa Edizioni ETS, 2087-2091.
- Vieira, M. J., Melo, L. F. e Pinheiro, M. M. 1993. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling*, 7, 67-80.
- Watanabe, Y., Bang, D. Y., Itoh, K. e Matsui, K. 1994. Nitrogen removal from wastewaters by a bio-reactor with partially and fully submerged rotating biofilms. *Wat. Sci. Technol*, 20(10-11), 431-438.
- Wimpenney, J. 2000. Na overview of biofilms as functional communities. In: Allison, D. G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H. M. e Wilson, M. eds. *Community, Structure and Co-operation in Biofilms*. Cambridge University Press, UK, 1-24.
- Wimpenney, J. W. T., Kinniment, S. L. e Scourfield, M. 1989. Modelling spatial gradients. In: Denyer, S. P., Gorman, S. P. and Sussman, M. eds. *Microbial Biofilms: Formation and Control*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 51-94.
- Wimpenney, J. W. T., Peters, A. e Scourfield, M. A. 1993. The Physiology and biochemistry of biofilm. In: Characklis, W. G. e Wilderer, P. A. eds. *Structure and Function of Biofilms*. Dahlem Workshop, John Wiley and Sons, Inc, 111-127.
- Wirtanen, G. 1995. *Biofilm Formation and its Elimination from Food Processing Equipment*. VTT Publications, Espoo, Finland.
- Zhang, T. e Bishop, P. 1994. Structure, activity and composition of biofilms. *Wat. Sci. Technol.*, 29, 335-344.



### 3. BIOFILMES MICROBIANOS: SEU CONTROLO

---

#### Sumário

Neste capítulo apontam-se os principais métodos de controlo da formação de biofilmes, referindo-se de modo especial os mais usados no combate ao sujamento biológico industrial. Os biocidas, sendo uma das medidas mais utilizadas no controlo de biofilmes, são objecto de uma descrição mais detalhada. Os aspectos ambientais inerentes ao uso de biocidas são também referidos assim como as mais recentes investigações no sentido de se encontrarem medidas alternativas simultaneamente eficazes e aceitáveis do ponto de vista da saúde humana e do ambiente.

3.1 Estratégias de controlo	40
3.2 Utilização de biocidas	45
3.3 Resistência dos biofilmes	52
3.4 Considerações ambientais	53
3.5 Novas estratégias	54
3.6 Bibliografia	57

---

### 3.1 ESTRATÉGIAS DE CONTROLO

A ocorrência de biofilmes indesejáveis numa superfície sólida pode causar, como anteriormente referido, um vasto rol de problemas, que duma maneira directa ou indirecta se traduzem em acentuados prejuízos económicos. Durante muito anos a prática mais comum de lidar com os biofilmes foi ignorar a sua existência, e ignorar durante o maior tempo possível, relegando para plano secundário os potenciais problemas causados pela sua ocorrência. Posteriormente, passou-se para a fase de, mesmo na presença de sujamento biológico, dar primazia a outros fenómenos associados, como por exemplo a corrosão, tendo-se consequentemente experimentado medidas que visavam essencialmente mitigar as causas desses fenómenos e não tanto os factores biológicos (microrganismos), medidas estas que, de uma maneira geral, se revelaram ineficazes. Quando finalmente se reconheceu que os maiores problemas associados ao sujamento biológico eram de origem microbiana, começaram a desenvolver-se estratégias de controlo que a experiência prática, por um lado, e a investigação, por outro, quer do ponto de vista da eficiência da estratégia, quer do ponto de vista da saúde humana e do ambiente, têm vindo a melhorar.

Para combater os biofilmes, isto é, para prevenir a adesão bacteriana, retardar a formação dos biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação, várias estratégias ou combinação de estratégias podem ser implementadas. Será, no entanto, importante ressaltar que a melhor forma de prevenir ou reduzir as consequências passa sem dúvida por controlar as causas. Ou seja, num sistema industrial, qualquer processo de controlo deve incluir, em primeira instância, o controlo efectivo dos microrganismos presentes nos circuitos de água, retardando ao máximo a sua deposição nas superfícies. Perante isto, as estratégias devem ser delineadas no sentido de:

- 1º Prevenção: Evitar ou retardar a formação de biofilmes e consequente sujamento biológico;
- 2º Remediação: Remover total ou parcialmente os biofilmes estabelecidos bem como as suas consequências.

Para a concretização destes dois propósitos, as estratégias podem englobar métodos de cariz físico, químico e processual. A opção por um método em detrimento de outro deve ter

sempre por base dados gerados a partir de testes com biofilmes (LeChevallier, 1990) e sempre que possível *in situ*, isto é, no local onde se vai implementar a estratégia e em condições reais.

### 3.1.1 Medidas de carácter processual

A prevenção da formação de biofilmes pressupõe a existência de adequados e efectivos sistemas de monitorização do desenvolvimento de biofilmes bem como a implementação de uma filosofia que visa exaustivamente manter os equipamentos limpos, principalmente as superfícies em contacto com a água. Para que tal seja possível existem descritas (LeChevallier, 1990; Salzburger, 1996; Klahre *et al.*, 1997) algumas regras técnicas a aplicar nos processos industriais, de carácter mais preventivo, que devem ser implementadas no sentido de retardar e/ou mesmo evitar a acumulação de biofilme nos circuitos industriais:

- redução da concentração de substâncias orgânicas (nutrientes) na corrente líquida;
- limpeza mecânica frequente;
- adequado projecto e desenho dos equipamentos (evitar zonas mortas e zonas de estagnação, utilização de materiais de construção com superfícies lisas, aumentar a facilidade de limpeza, etc.);
- aplicação de altas tensões de corte e em regime turbulento;
- implementação de técnicas efectivas de monitorização de biofilmes, inspecção visual constante da acumulação de biofilme e de sinais de corrosão;
- implementação de técnicas de tratamento colaterais (incorporação de sistemas de filtração em paralelo por exemplo).

Apesar de todas as precauções que se devem ter desde o início com o projecto e desenho dos equipamentos industriais e depois durante a operação dos mesmos, ocorrem situações onde o desenvolvimento dos biofilmes mesmo assim é inevitável. Esta constatação fez emergir a necessidade de implementação de outros métodos de controlo de biofilmes com o objectivo de perturbar e/ou mesmo impedir o estabelecimento de biofilmes actuando

em qualquer uma das fases do seu desenvolvimento. Estes métodos devem sempre ser encarados como medidas suplementares e não como medidas exclusivas.

### 3.1.2 Métodos físicos

Estes métodos envolvem principalmente técnicas de remoção física de biofilmes que podem ser aplicadas “on-line” ou “off-line”. A implementação da limpeza “on-line” não exige a interrupção dos processos industriais e pode processar-se de forma contínua ou intermitente requerendo, de uma forma geral, equipamento adicional. A limpeza “off-line” exige a paragem das operações do sistema, sendo até, por vezes, necessário o desmantelamento dos equipamentos para se aceder ao seu interior, de modo a ser possível uma efectiva remoção do sujamento (Bott, 1995). A título ilustrativo, algumas das técnicas disponíveis para limpeza física estão reunidas na Tabela 3.1. Ainda que algumas sejam específicas para determinado equipamento, a grande maioria dos métodos tem uma aplicação mais abrangente.

**Tabela 3.1** Métodos de limpeza físicos

<b>Técnicas “on-line”</b>	<b>Técnicas “off-line”</b>
Circulação de bolas de borracha	Limpeza manual
Oscilação de escovas	Humedecimento com vapor (“soaking”)
Injecção de ar ou gás	Choque térmico
Uso de campos eléctricos	Choque osmótico
Aplicação de ultra-sons	Limpeza apoiada em produtos químicos (EDTA, NaOH, etc.)
Radiação ultravioleta, radiação gama	Circulação de água a temperatura elevada e/ou vapor de água

Apesar de serem considerados dos métodos mais eficientes, a implementação de métodos físicos na remoção de biofilmes é geralmente dificultada, sendo mesmo por vezes impossível, devido a dificuldades de ordem técnica e económica, que se prendem, essencialmente, com a estrutura e desenho dos equipamentos (Mattila-Sandholm e

Wirtanen, 1992) e com a necessidade de equipamento suplementar (Bott, 1995). A aplicabilidade destes métodos também é limitada em sistemas em que os biofilmes são pouco espessos podendo mesmo dar origem a filmes biológicos remanescentes firmemente aderidos (Nickels *et al.*, 1981).

A disponibilidade de métodos físicos de actuação em fases mais precoces, isto é, ao nível da prevenção da formação de biofilmes é mais restrita. A título de exemplo refira-se a utilização de radiações (ultravioleta, gama, etc.) cujo modo de acção envolve a destruição das moléculas de ADN e ARN das células microbianas em suspensão (Cloete *et al.*, 1998). Deste modo, os microrganismos são eliminados com a vantagem de não se ter introduzido no sistema substâncias estranhas.

De uma maneira geral os métodos físicos têm um impacto ambiental reduzido, apesar da sua implementação causar acrescidos gastos energéticos, que irão agravar os custos. Alguns dos métodos referidos são até bastante dispendiosos (caso das correntes de água quente e vapor e das radiações), o que condiciona, logo à partida, a sua aplicabilidade (Bott, 1992).

### **3.1.3 Métodos químicos e físico-químicos**

Quando as medidas técnicas preventivas e os métodos físicos não são suficientes para evitar a acumulação de biofilme e/ou as consequências da sua existência, recorre-se geralmente à aplicação de substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, propriedades tensioactivas e/ou propriedades dispersantes.

São considerados agentes antimicrobianos todas as substâncias que possuem uma ou mais zonas activas capazes de estabelecer interacções adversas com componentes celulares em sítios-alvo específicos das células microbianas (Paulus, 1993). De uma forma mais pragmática, pode-se também definir substância antimicrobiana como sendo uma substância que exerce um efeito adverso na viabilidade (microbicida) ou no crescimento e reprodução (microbioestático) de microrganismos (Paulus, 1993; Bott, 1995; Denyer, 1996; Gaylarde e Morton, 1999). Geralmente, é a concentração da substância química antimicrobiana que determina a natureza da acção: se a concentração é baixa para as características do sistema onde é aplicado, então o efeito é de carácter bioestático; se a concentração é suficientemente

elevada o agente actuará numa estrutura vital das células e a sua acção classificar-se-á como biocida (Woodcock, 1988; Paulus, 1993; Gaylarde e Morton, 1999).

Os métodos químicos também incluem a aplicação de substâncias com capacidade de remoção de massa de biofilme. Estas são geralmente baseadas em produtos com propriedades dispersantes, quelantes, tensioactivas, etc. (Tabela 3.2), cujos mecanismos de acção passam essencialmente pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes, pelo enfraquecimento das interacções biofilme-superfície de adesão e pela dispersão de depósitos biológicos ou, idealmente, mesmo pela prevenção da formação de biofilmes (Claus e Müller, 1996; Flemming *et al.*, 1996). Ao dispersarem as populações microbianas e/ou as substâncias poliméricas incorporadas no biofilme para o seio da fase líquida, estas substâncias favorecem o processo de controlo dos biofilmes pois tornam os microrganismos mais susceptíveis à acção dos agentes antimicrobianos (Cloete *et al.*, 1998).

**Tabela 3.2** Alguns dos agentes químicos mais comuns (adaptado de Bott, 1995)

<b>Agente</b>	<b>Modo de acção</b>
Sequestrante/ Quelante	Formação de complexos químicos com os agentes de sujamento por forma a mantê-los em solução ou suspensão, inibindo ou mesmo reduzindo a precipitação de componentes formadores de sujamento
Dispersante	Dispersão das células e de outras partículas coloidais de maneira a que permaneçam em suspensão e não ocorra a sua deposição nas superfícies
Tensioactivo/ Detergente	Redução da tensão superficial da água e/ou redução da tensão interfacial
Biocida	Eliminação dos microrganismos; Inviabilização da capacidade de adesão dos microrganismos às superfícies
Bioestático	Inibição da reprodução dos microrganismos; Redução da actividade dos microrganismos (inibição metabólica)

O sucesso de um agente químico está dependente da sua capacidade de inactivar os microrganismos constituídos em biofilme e sobretudo da sua capacidade de o remover, em parte ou totalmente, da superfície onde se estabeleceu (Mittelman, 1990, Characklis, 1990).

De todos os agentes químicos referidos, os biocidas são das medidas mais usadas em sistemas industriais, ainda que métodos alternativos à sua utilização sejam continuamente alvo de investigação. Por terem sido parte integrante e fundamental deste estudo os biocidas serão, de seguida, objecto de uma descrição mais atenta.

### 3.2 UTILIZAÇÃO DE BIOCIDAS

Através da decomposição simples da palavra “biocida”, obtém-se dois vocábulos: “*bio*” que significa vida e “*cida*” que significa matar, pelo que, em termos muito elementares, Biocida representa toda e qualquer substância que “mata a vida”. **Biocida**, em termos menos pragmáticos, pode ser descrito como sendo uma substância antimicrobiana que contém um ou mais ingredientes activos capazes de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a acção de organismos vivos, patogénicos e não patogénicos (Block, 1991; Cloete *et al.*, 1994; Paulus, 1996). Para a Comunidade Europeia (Directiva 98/8/CE) entende-se por *Produtos Biocidas* “Substâncias activas e preparações que contenham uma ou mais substâncias activas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, e que se destinem a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a acção de um organismo prejudicial por mecanismos químicos ou biológicos”.

Frequentemente, os biocidas são também apelidados de desinfectantes, preservantes, anti-sépticos, “higienizantes”, entre outros termos menos comuns. Ainda que existam algumas diferenças ao nível da sua natureza química e do seu mecanismo de acção, os termos são usados quase de forma aleatória, sendo, de uma maneira geral, a área de aplicação (área médica, alimentar, doméstica, água potável, indústria, etc.) a que determina o termo a ser utilizado (Cloete *et al.*, 1994). Em termos mais restritos, os biocidas com aplicação industrial também podem ser apelidados de microbicidas porque quando aplicados têm como alvo particular os microrganismos e não todos os seres vivos em geral (Paulus, 1993). Do mesmo modo, quando se usam os biocidas para controlar biofilmes, e uma vez que são as bactérias os microrganismos produtores de biofilme com maior predominância, também podem ser denominados de bactericidas.

Em meios industriais, os termos biocida e desinfectante são os mais abrangentes e os mais usados. Contudo, neste tipo de ambientes o termo desinfectante assume alguma irrealdade, principalmente quando comparado com o mesmo termo universalmente usado

na área médica. Com efeito, na área médica, desinfectar os sistemas é uma rotina já há muito implementada pois, para salvaguardar a saúde das pessoas, os microrganismos causadores de doença têm que ser totalmente eliminados. Na maioria dos sistemas técnicos industriais, matar integralmente todos os microrganismos é uma tarefa quase utópica e que nem sempre é suficiente para a resolução do problema, pois a biomassa morta pode permanecer aderida às superfícies e constituir fonte de substrato para os microrganismos subjacentes bem como o suporte físico para adesão de outras bactérias (Flemming *et al.*, 1996). Deste modo, favorece-se o “re-crescimento” microbiano e, por consequência, o restabelecimento do biofilme. A presença de um biofilme numa superfície, ainda que morto, pode provocar também corrosão das superfícies onde está estabelecido (Videla e Characklis, 1992).

Para exercerem a sua acção os biocidas atacam os componentes celulares funcionais, colocando os microrganismos em stresse. Os alvos preferenciais dos biocidas são essencialmente: a parede celular, os componentes da membrana citoplasmática e o citoplasma (Cloete *et al.*, 1998; Denyer e Stewart, 1998; Shepherd *et al.*, 1998; Al-Adham *et al.*, 1998). Portanto, os biocidas têm que ser capazes de atravessar a membrana exterior das células microbianas por forma a atingir os sítios-alvo com uma concentração mínima activa (Paulus, 1993; Russel, 1995). O acesso a esses alvos preferenciais é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que cada biocida apresenta (Paulus, 1993), bem como pelas possíveis interacções com material extracelular, pela composição química celular e pela morfologia das células (Denyer e Stewart, 1998).

### 3.2.1 Principais parâmetros de escolha de um biocida

A selecção do biocida mais adequado para um determinado sistema industrial deve ser sempre suportada por estudos laboratoriais prévios que constituirão a primeira etapa do processo (Rossmore, 1995), e que devem sempre ter por base as seguintes considerações (Bott, 1992; Gaylarde e Videla, 1994; Flemming e Schaule, 1996; Gaylarde e Morton, 1999):

- O biocida deve ser activo contra uma vasta gama de microrganismos;
- Deve apresentar uma grande toxicidade para os microrganismos alvo, a baixas concentrações, e toxicidade baixa para as restantes formas de vida;

- Biodegradável, isto é, a concentração residual no líquido deverá tornar-se inofensiva ao fim de algum tempo em consequência da actividade biológica nativa;
- Não corrosivo para os materiais de construção dos equipamentos;
- A eficiência do biocida não deve ser prejudicada pela presença de materiais orgânicos e/ou inorgânicos no sistema;
- Compatibilidade com outros aditivos (inibidores de corrosão, por exemplo);
- O custo do tratamento, isto é, o custo do biocida bem como os custos associados à sua aplicação;
- Segurança do ponto de vista da saúde, do manuseamento e armazenamento;
- Estabilidade principalmente no que respeita a alterações de pH e temperatura;
- Limitações e restrições ambientais, impacto ambiental, efeitos toxicológicos;

Será difícil que o mesmo biocida cumpra todas as exigências acima descritas, pelo que a escolha final de um biocida em detrimento de outro será sempre uma solução de compromisso para uma determinada situação. Terá também que se ter em conta as características químicas e físicas do processo industrial bem como o tipo e a concentração dos microrganismos a serem tratados (Cloete *et al.*, 1994; Lutey, 1995).

Ainda que nos últimos anos a necessidade de biocidas não tenha diminuído, a sua aplicação e selecção tem vindo a tornar-se mais restritiva devido, essencialmente, a dois factores: toxicidade do produto e o eventual impacto na saúde e no ambiente.

### **3.2.2 Factores que interferem com a eficiência de um biocida**

A eficiência de um biocida depende de um variado número de factores intrínsecos e ambientais, entre os quais se destacam (Lutey, 1995):

- velocidade de escoamento do líquido uma vez que interfere com a transferência de massa de biocida para o biofilme e com a tensão de corte junto à superfície do biofilme;
- tipo de biocida, a sua concentração efectiva e o tempo de contacto;

- temperatura, pois alguns biocidas são sensíveis à temperatura, podendo mesmo estar relacionada com a sua decomposição;
- pH, pois alguns biocidas tornam-se instáveis em resposta a alterações do pH, enquanto outros têm valores óptimos de pH de funcionamento;
- tipo de microrganismos presentes, o seu estado fisiológico, idade e qualidade do biofilme (denso e compacto ou aberto e pouco coeso);
- presença de matéria orgânica (que não os microrganismos) e/ou inorgânica em suspensão pois estas partículas podem reagir com o biocida, tornando-o assim menos disponível para eliminar os microrganismos;
- interferência com outras substâncias dissolvidas (cálcio, ferro, amónio, etc.).

Como regra geral, quanto mais elevada for a temperatura do meio líquido, maior for o tempo de contacto e mais altas forem as concentrações de biocida, melhor e maior será o grau de desinfectação (Flemming e Schaule, 1996).

Em geral, procura-se investigar no sentido de se melhorar a actividade biocida, isto é, diligenciar no sentido de alargar o espectro de destruição de um agente químico, aumentar a sua velocidade de acção e reduzir a sua concentração efectiva, e simultaneamente respeitar as normas de protecção do ambiente e da saúde humana.

### 3.2.3 Métodos de aplicação de biocidas

De uma maneira geral, o modo como se aplica o biocida é tão importante como a sua selecção, pois a simples aplicação do biocida pode não reduzir o sujamento biológico se não for utilizado na dose certa e na frequência correcta (Heinzel, 1998; Gaylarde e Morton, 1999). Estes dois factores são essenciais sob pena de se agravarem os problemas ao invés de se resolverem (Lutey, 1995).

Os factores a considerar aquando da aplicação de um biocida incluem a quantidade (dose) a aplicar, a concentração residual que é necessária (concentração mínima necessária), o modo de aplicação (em choque, contínuo ou intermitente), a frequência da adição e o ponto de adição.

O tempo de contacto e a concentração do biocida a serem usados, bem como a frequência de aplicação, devem ser previamente determinados em condições de teste controladas e posteriormente confirmadas em condições operacionais reais. Apesar de serem geralmente recomendados pelo produtor/fornecedor dos biocidas, estes parâmetros devem ser sempre ajustados às características do sistema onde o biocida vai ser aplicado. A selecção do tempo de contacto mais adequado para determinado sistema é fundamental, pois muitos microrganismos não são eliminados por contacto imediato com a maioria dos microbicidas usados industrialmente (Lutey, 1995). Tempos de contacto e concentrações insuficientes podem favorecer os organismos mais resistentes (Lutey, 1995; Heinzl, 1998). Tal como são geralmente aplicados, os biocidas, mesmo aqueles que afectam uma gama alargada de microrganismos, não esterilizam o sistema, mas somente reduzem as populações a níveis abaixo do nível crítico.

Na aplicação de um biocida três estratégias podem, geralmente, ser seguidas: aplicação em choque, aplicação contínua e aplicação intermitente. As diferenças entre as estratégias residem essencialmente na concentração de biocida aplicado e na frequência de aplicação. A opção pela primeira estratégia envolve a aplicação do biocida em altas concentrações e em intervalos de tempo regulares e é especialmente indicada em situações onde os biofilmes apresentam espessuras consideráveis (Bott, 1995; Wills e Bott, 1997), quando os circuitos de água apresentam concentrações microbianas muito elevadas e quando as condições do sistema industrial favorecem o “re-crescimento” rápido dos microrganismos (Lutey, 1995). A segunda estratégia traduz-se pela alimentação contínua de biocida a baixas, porém efectivas, concentrações durante o período de operação de um determinado sistema industrial com o intuito de se prevenir ou mesmo inibir a formação inicial de biofilme (Wills e Bott, 1997). A aplicação contínua de biocida é geralmente implementada quando se pretende estabelecer condições bioestáticas nos circuitos de água industriais. A opção pela alimentação intermitente a valores médios de concentração de biocida e em intervalos de tempo regulares justifica-se quando é necessário implementar grandes tempos de contacto entre o biocida e as populações microbianas (Lutey, 1995). Os intervalos de tempo entre as aplicações de biocida são determinados pelo biocida em questão e pela gravidade do problema. A duração do período de alimentação deve providenciar tempos de contacto adequados entre os microrganismos e o biocida à concentração mínima necessária.

Por exemplo, Pujo e Bott (1992) relatam que um biocida se mostrou pouco eficaz no tratamento de biofilmes bem estabelecidos, quando aplicado de forma contínua e a baixas concentrações (20 mg L<sup>-1</sup> a 40 mg L<sup>-1</sup>). Contudo, as mesmas concentrações de biocida foram suficientes para prevenir o desenvolvimento de biofilmes quando foram aplicadas numa fase mais precoce do seu desenvolvimento.

### 3.2.4 Classificação de biocidas

De acordo com o seu carácter químico, os biocidas podem ser organizados em dois grandes grupos: os biocidas oxidantes e os não oxidantes. Com base neste critério, foram construídas as Tabelas 3.3 e 3.4 que visam apresentar alguns exemplos de biocidas pertencentes a ambos os grupos. Estas tabelas não são, contudo, exaustivas mas sim ilustrativas dos biocidas mais comuns organizados segundo este critério.

**Tabela 3.3** Alguns exemplos de biocidas oxidantes (adaptado de Bott (1992) e de Lutey (1995))

<b>Grupo</b>	<b>Biocidas oxidantes (nome químico)</b>
	Cloro
	Dióxido de cloro
Compostos de cloro	Ácido hipocloroso
	Hipoclorito de sódio
	Hipoclorito de cálcio
	Bromo
Compostos de bromo	Brometo de sódio
	Cloreto de bromo
Compostos não halogenados	Ozono
	Peróxido de hidrogénio

**Tabela 3.4** Alguns exemplos ilustrativos de biocidas não oxidantes (adaptado de Bott (1992) e de Lutey (1995))

<b>Grupo</b>	<b>Biocida não oxidante (nome químico)</b>
	Tiocarbamato
Compostos organo- sulfurados	Carbamato
	Tiocianato
Compostos orgânicos de estanho	Óxido de tributilestanho
Compostos de isotiazolona	Isotiazolona
Sais de cobre	Sulfato de cobre
	Formaldeído
Aldeídos	Glutaraldeído
	Ortoftalaldeído
Compostos organo-bromicos	Propionato
	Propionamida
Sais quaternários de amónio ("quats")	Cloreto de amónio
	Brometo de cetil trimetil amónio

Embora apresentem diferenças químicas importantes, o modo primário de acção dos biocidas oxidantes passa por oxidar compostos constituintes dos microrganismos, sendo consequentemente efectivos contra todos os tipos de microrganismos (isto é, bactérias, fungos, algas e leveduras) presentes nos circuitos de água industriais. Até ao momento, não há relato de desenvolvimento de resistência, por parte dos microrganismos, a biocidas oxidantes.

Os biocidas não oxidantes, que englobam uma enorme variedade de compostos orgânicos, exercem a sua actividade antimicrobiana actuando sobre os microrganismos por interferência com o seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular. Contrariamente aos biocidas oxidantes, os microrganismos podem adaptar-se aos biocidas não oxidantes, principalmente se estes forem aplicados em concentrações abaixo da concentração mínima requerida e por longos períodos de tempo.

### 3.3 RESISTÊNCIA DOS BIOFILMES

A prevenção do desenvolvimento de biofilmes é especialmente importante pois é quase universalmente aceite que os microrganismos constituídos em biofilmes são mais resistentes à acção dos agentes microbianos do que quando se desenvolvem em suspensão (Costerton *et al.*, 1987; LeChevallier *et al.*, 1988; Brown e Gilbert, 1993; Heinzl, 1998).

Os mecanismos que levam os microrganismos organizados em biofilme a adquirir formas de resistência à acção dos biocidas ainda não estão completamente explorados e entendidos, pelo que é necessária mais investigação nesta área. Apesar de não fazer parte do trabalho desenvolvido, referem-se, de seguida, algumas das razões mais vezes utilizadas para explicar a maior resistência dos biofilmes aos biocidas. Sugere-se ainda a consulta dos trabalhos de revisão de Russel (1995), Heinzl (1998) e Morton *et al.* (1998).

A resistência aos biocidas que os microrganismos apresentam quando constituídos em biofilme é, em parte, e em primeira instância, atribuída à matriz polimérica pois esta parece funcionar como uma barreira protectora contra factores agressivos externos dos quais os biocidas são exemplo (Christensen e Characklis, 1990). Consequentemente, para que um programa de combate aos biofilmes se revele eficaz, é necessário quebrar as ligações entre os polímeros constituintes do biofilme ou de alguma forma desestabilizar a matriz polimérica por forma a tornar os microrganismos mais acessíveis à acção do biocida.

No entanto, a matriz por si só parece não ser a única explicação para o aumento da resistência dos microrganismos residentes em biofilme (Morton *et al.*, 1998). A composição da membrana externa da parede celular das bactérias, especialmente das bactérias Gram-negativas, tem também um papel importante na resistência à penetração das substâncias activas dos biocidas (Russel, 1995; Heinzl, 1998).

Há também autores que referem (Stewart *et al.*, 1998) que a menor sensibilidade dos biofilmes aos biocidas se deve ao facto de estes poderem reagir com constituintes inorgânicos dos biofilmes a uma velocidade superior à velocidade de difusão do biocida no interior dos biofilmes. Este facto acarretaria, por consequência, uma redução apreciável da quantidade de biocida efectivamente disponível para os microrganismos.

Heinzl (1998) refere também que os microrganismos residentes em biofilmes se podem proteger dos efeitos tóxicos dos biocidas procedendo à sua inactivação. Para tal, os

microrganismos podem produzir enzimas e/ou outros metabolitos que irão degradar ou neutralizar os biocidas.

Para finalizar a referência a este tópico, realça-se que frequentemente se incorre na imprecisão de se atribuir a menor eficiência dos processos de controlo da formação de biofilmes exclusivamente ao desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos. Com efeito, a perda de eficácia de um determinado programa de combate aos biofilmes pode ser causada por outros factores, que não somente o desenvolvimento de resistência, entre os quais se destacam: selecção de um biocida menos adequado ao sistema, insuficiente tempo de contacto, não cumprimento das condições mais correctas de aplicação, como por exemplo concentração, temperatura, pH, duração da aplicação, etc.. Esta perda de eficiência causada por erros na aplicação dos biocidas, e por vezes designada de “pseudo-resistência” (Heinzel, 1998), não deve ser confundida com a verdadeira resistência desenvolvida pelos microrganismos face a agentes externos agressivos.

### **3.4 CONSIDERAÇÕES AMBIENTAIS**

Os agentes antimicrobianos são de uma maneira geral produtos químicos de elevada toxicidade química. O uso de biocidas de carácter químico persistente é então, do ponto de vista ambiental, inaceitável em face dos potenciais riscos ambientais que poderão surgir quer nos sistemas de tratamento da águas residuais quer nos sistemas naturais de água (rios, lagos, mares, etc.), uma vez que, potencialmente, os biocidas acabam por ser lançados no ambiente.

Os sistemas industriais que têm implementados programas de tratamento do sujamento biológico com agentes antimicrobianos, mais tarde ou mais cedo irão descarregar para o ambiente efluentes que apresentarão concentrações residuais dos agentes antimicrobianos. Idealmente, um agente microbiano só deve afectar os microrganismos ou comunidades de microrganismos para os quais foi seleccionado e em concentrações suficientes e necessárias para a sua eliminação. No entanto, em termos práticos, quase todos os produtos químicos deste tipo são aplicados em concentrações excessivas, pelo que quando descarregados para o ambiente irão perturbar outras formas de vida quer animal quer vegetal. Torna-se, então, claro que se a opção for por continuar a implementar estratégias de combate aos biofilmes através do uso de agentes antimicrobianos, para além da eficiência dos agentes químicos, a

resistência dos biofilmes à sua acção, a sua biodegradabilidade e impacto ambiental terão também que ser considerados aquando das tomadas de decisão (Cloete *et al.* 1998). Idealmente, um biocida deve apresentar propriedades não persistentes e não bio-acumulativas e deve ser rápida e facilmente decomposto em espécies químicas com níveis baixos de toxicidade para todas as formas de vida (Weiler *et al.*, 1993).

Um exemplo flagrante do impacto dos biocidas na saúde humana e no ambiente é dado pelo cloro. Durante muitos anos o cloro foi dos biocidas mais usado devido à sua elevada eficiência, facilidade de aplicação e relativamente baixo custo. No entanto, os subprodutos resultantes da reacção do cloro com matéria orgânica presente nos sistemas de água (clorofórmio e outros trihalometanos) (Chen *et al.*, 1993; Cloete *et al.*, 1998) representam poluentes tóxicos e carcinogénicos que são persistentes no ambiente, podendo até entrar nas cadeias alimentares. Como resultado, o uso do cloro tem vindo a ser restringido, nomeadamente através de legislação. Quando usado, e em consonância com o atrás referido, é necessário proceder à remoção do cloro residual da água antes desta ser descarregada para o exterior, o que vai representar custos económicos adicionais. Este facto tem tornado o cloro menos atractivo em relação a outras estratégias menos agressivas para o ambiente que constantemente têm vindo a ser desenvolvidas.

### 3.5 NOVAS ESTRATÉGIAS

Para dar resposta às limitações impostas pela legislação ambiental, várias novas abordagens têm vindo a ser desenvolvidas numa tentativa de se diminuir o impacto ambiental da aplicação de agentes antimicrobianos e de se respeitar as imposições legais. Estas novas abordagens vão no sentido de se desenvolverem novos produtos e/ou estratégias menos prejudiciais para o ambiente e para a saúde e mais seguros do ponto de vista do manuseamento e armazenamento, mas simultaneamente económicos e efectivos no ataque aos biofilmes (Gaylarde e Morton, 1999). Estas terão que, indubitavelmente, refrear o uso de agentes químicos, ou pelo menos diminuir as concentrações a aplicar uma vez que os problemas ambientais inerentes ao desenvolvimento de biofilmes são essencialmente devidos à utilização de quantidades elevadas de biocidas, cujos subprodutos residuais, quando descarregados para o ambiente, constituem um problema acrescido de poluição ambiental.

Várias alternativas aos métodos convencionais de uso de biocidas têm vindo a ser desenvolvidas com mais ou menos sucesso. Entre estas, o uso de enzimas específicas, de bacteriófagos, de biodispersantes e de organismos competidores são aquelas que têm vindo a ser objecto de um maior número de estudos. Infelizmente, até ao momento, nenhum destes métodos está suficientemente bem desenvolvido de maneira a constituir uma real alternativa ao uso de biocidas químicos (Johnsrud, 1997). A utilização de compostos com propriedades antimicrobianas produzidos naturalmente, vulgarmente designados de biocidas naturais, e por consequência mais facilmente biodegradáveis (Saravia e Gaylarde, 1998), é também uma perspectiva a considerar.

### **3.5.1 Enzimas específicas**

Com o uso de enzimas pretende-se degradar os biopolímeros extracelulares envolvidos na adesão celular e na integridade estrutural do biofilme. Deste modo, o biofilme pode ser mais facilmente removido das superfícies de adesão e os microrganismos podem novamente entrar na corrente líquida e simultaneamente ficarem mais expostos à acção suplementar dos agentes antimicrobianos (Johnsrud, 1997).

A heterogeneidade e complexidade dos polissacarídeos que fazem parte da matriz polimérica (Claus e Muller, 1996) e a falta de enzimas específicas que possam ser aplicadas na sua degradação são as principais barreiras a ultrapassar para que este método se imponha e seja considerado uma real alternativa com custos aceitáveis. Não obstante, este método não deve ser menosprezado, devendo-se portanto valorizar e estimular a pesquisa de enzimas ou misturas de enzimas capazes de degradar a estrutura polimérica dos biofilmes industriais. Johansen *et al.* (1997), por exemplo, provaram que com uma complexa combinação de enzimas (envolvendo enzimas de hidrólise de polissacarídeos e oxidoreductases) foi possível remover e inactivar biofilmes bacterianos.

### **3.5.2 Bacteriófagos**

Os bacteriófagos, em termos pragmáticos, podem ser descritos como vírus que infectam e destroem bactérias (Johnsrud, 1997; Marks e Sharp, 2000). Embora existam em concentrações relativamente elevadas nos ecossistemas naturais (Ripp e Miller, 1997), só recentemente as suas potencialidades começaram a ser exploradas e aplicadas no controlo

de biofilmes. Para tal, é necessário, numa fase prévia, isolar e identificar, nos circuitos de água dos processos industriais, as principais bactérias produtoras de biofilme, e posteriormente proceder à pesquisa do bacteriófago, ou conjunto de bacteriófagos, mais adequado para atacar essas bactérias. Para além da sua acção lítica, os bacteriófagos possuem ainda a capacidade de sintetizar enzimas capazes de degradar polímeros extracelulares, pelo que, e de acordo com Hughes *et al.* (1998), a acção dos bacteriófagos em biofilmes é resultante da combinação entre a degradação da matriz polimérica pelas enzimas que sintetizam e a infecção e subsequente lise das bactérias embebidas no biofilme.

Até ao momento, este método ainda não está suficientemente bem desenvolvido a ponto de poder ser considerado uma real alternativa ao uso de biocidas. O desenvolvimento de resistência por parte das bactérias ao ataque por fagos (Hughes *et al.*, 1998), a enorme variedade de bactérias que podem estar presentes nos circuitos de água, e o ainda diminuto entendimento do ecossistema bactéria-fago (Johnsrud, 1997) são os principais óbices a este método.

### 3.5.3 Biodispersantes

Biodispersante é o termo normalmente usado para identificar os dispersantes produzidos por microrganismos. Estes têm vindo a adquirir um estatuto fundamental nos programas de tratamento para o controlo da formação de biofilmes (Rossmore, 1995; Cloete *et al.*, 1998). Um biodispersante efectivo deve dispersar as populações microbianas em suspensão, tornando-as mais susceptíveis à acção dos biocidas. Adicionalmente, os biodispersantes devem apresentar também a capacidade de fragilizar as interacções da matriz polimérica assim como as interacções entre o biofilme e o material de suporte (Flemming e Schaule, 1996). Para além disso, os biodispersantes ajudam a penetração dos biocidas nos depósitos orgânicos, facilitando a sua remoção pela turbulência da água circulante. Uma vez que os biodispersantes não eliminam os microrganismos nem inibem o seu crescimento, o uso de biocidas pode continuar a ser necessário, só que agora em concentrações manifestamente inferiores. Uma combinação de biocidas e biodispersantes será uma das estratégias mais eficiente para o controlo dos biofilmes do que qualquer um deles quando aplicado separadamente.

### 3.5.4 Organismos competidores

Durante a última década, foram feitas algumas abordagens no sentido de se resolver os problemas associados aos biofilmes através da inoculação nos circuitos de água de consórcios de organismos (geralmente bactérias) não formadores de biofilme para competir com os microrganismos formadores de biofilme. Também foi sugerido que se introduzisse no sistema, juntamente com as bactérias, outros aditivos (tensioactivos, enzimas, etc.) de maneira a favorecer a proliferação dos microrganismos competidores.

## 3.6 BIBLIOGRAFIA

- Al-Adham, I. S. I., Dinning, A. J., Eastwood, I. M., Austin, P. e Collier, P. J. 1998. Cell membrane effects of some common biocides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21, 6-10.
- Block, S. 1991. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Philadelphia, Lea and Febiger.
- Bott, T. R. 1992. The use of biocides in industry. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 567-581.
- Bott, T. R. 1995. *Fouling of Heat Exchangers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B. V.
- Brown, M. R. W. e Gilbert, P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 4339-4344.
- Characklis, W. G. 1990. Microbial biofouling control. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 585-635.
- Chen, C-I., Griebe, T., Srinivasan, R. and Stewart P. 1993. Effects of various metal substrata on accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and the efficacy of monochloramine as a biocide. *Biofouling*, 7, 241-251.
- Christensen, B. E., Characklis, W. G. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis, W. G., Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 93-130.
- Claus, G. e Muller, R. 1996. Biofilms in a paper mill process water system. In: Heitz, E., Flemming, H-C. e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer-Verlag, 429-437.
- Cloete, T. E., Brözel, V. S., Bruyn, E. E. e Pietersen, B. 1994. *Optimisation of Biofouling Control in Industrial Water Systems*. Report to the Water Research Commission by the Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, South Africa.
- Cloete, T. E., Jacobs, L. e Brözel, V. S. 1998. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*, 9, 23-37.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. J., Nickel, J. C., Dasgupta, M. e Marrie, T. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews of Microbiology*, 41, 435-464.
- Denyer, S. P. 1996. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36, 227-245.
- Denyer, S. P. e Stewart, G. S. A. B. 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 261-268.
- Flemming, H-C., Griebe, T. e Schaule, G. 1996. Antifouling strategies in technical systems – a short review. *Wat. Sci. Tech.*, 34(5-6), 517-524.

- Flemming, H-C. e Schaule, G. 1996. Measures against biofouling. *In: Heitz, E., Flemming, H-C. e Sand, W. eds. Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer-Verlag, 121-139.
- Gaylarde, C. C. e Morton, L. H. G. 1999. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. *Biofouling*, 14(1), 59-74.
- Gaylarde, C. C. e Videla, H. A. 1994. Control of corrosive biofilms by biocides. *Corrosion Reviews*, 12, 85-94.
- Heinzel, M. 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 225-234.
- Hughes, K. A., Sutherland, I. W. e Martin V. J. 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144, 3039-3047.
- Johansen, C., Falholt, P. e Gram, L. 1997. Enzymatic removal and disinfecting of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3724-3728.
- Johnsrud, S. C. 1997. Biotechnology for solving slime problems in the pulp and paper industry. *In: Scheper, T. ed. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry - Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 311-328.
- Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 24 de Abril de 1998, Directiva 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à colocação de produtos biocidas no mercado, L123, 41º ano.
- Klahre, J., Lustenberger, M. e Flemming, H-C. 1997. The achilles heel of paper production: microbial problems. *In: Wet and Chemistry Conference & COST Workshop*, Gatwick, 28-29 May, Pira International.
- LeChevallier, M. W. 1990. Biocides and the current status of biofouling control in water systems. *In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Heidelberg, Springer-Verlag, 113-132.
- LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D. e Lee, R. G. 1991. Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2492-2499.
- Lutey, R. W. 1995. Process cooling water. *In: Rossmore, H. W. ed. Handbook of Biocide and Preservative Use*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 51-82.
- Marks, T. e Sharp, R. 2000. Bacteriophages and biotechnology: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75, 6-17.
- Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*, 8(4), 573-603.
- Mittelman, M. W. 1990. Bacterial growth and biofouling control in purified water systems. *In: Flemming, H-C e Geesey, G. G. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Heidelberg, Springer-Verlag, 133-154.
- Morton, L. H. G., Greenway, D. L. A., Gaylarde, C. C. e Surman, S. B. 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 247-259.
- Nickels, J., Bobbie, R. J., Lott, D. F., Maritz, R. F., Benson, P. H. e White, D. C. 1981. Effect of manual brush cleaning on biomass and community structure of microfouling film formed on aluminium and titanium surfaces exposed to rapidly flowing seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 1442-1453.
- Paulus, W. 1993. *Microbicides for the Protection of Materials – A Handbook*. London, UK, Chapman & Hall.
- Paulus, W. 1996. Biocides – mode of action. *In: Heitz, E., Flemming, H-C. e Sand, W. eds. Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer-Verlag, 105-120.
- Pujo, M. D. e Bott, T. R. 1992. Biocide efficacy on biofilm growth. *In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 583-588.

- Ripp, S. e Miller, R. V. 1997. The role of pseudolysogen in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology*, 143, 2065-2070.
- Rossmore, H. W.: 1995. Introduction to biocide use. In: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Glasgow, UK, Blackie Academic & Professional, 1-18.
- Russel, A. D. 1995. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 247-265.
- Salzburger, W. 1996. Paper and additives. In: Heitz, E., Flemming, H-C e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*. Heidelberg, Springer-Verlag, 415-427.
- Saravia, S. G. G. e Gaylarde, C. C. 1998. The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Brassica nigra*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 145-148.
- Shepherd, J. M., Large, P. J., Midgley, M. e Ratledge, C. 1998. The cytoplasmic membrane as the site of the antimicrobial action of N-octylethanolamine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 535-541.
- Stewart, P. S., Grab, L. e Diemer, J. A. 1998. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 495-500.
- Videla, H. A. e Characklis, W. G. 1992. Biofouling and microbially influenced corrosion. *Biodeterioration and Biodegradation*, 29, 195-212.
- Weiler, E. D., Jayjock, M. A. e Greenley, D.E., H. C. 1993. Quality requirements for biocides in the 1990's. *Quality Assurance: Good Practice, Regulation, and Law*, 2(3), 244-250.
- Wills, A.J., Bott, T. R. 1997. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* biofilm development by hydrogen peroxide. In: *Understanding Heat Exchanger Fouling and Its Mitigation*. Ciocco Conference Center, Castelvechio Pascoli, Italy, 11-16 May.
- Woodcock, P. M. 1988. Biguanides as industrial biocides. In: Payne, K. R. ed. *Industrial biocides*. Chichester, John Wiley and Sons.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### Sumário

Neste capítulo são descritos os métodos analíticos e instrumentais aplicados durante a execução do trabalho experimental. São também expostas as metodologias e equipamentos utilizados no cultivo dos microrganismos na forma planctónica e na formação de biofilme. Faz-se também uma caracterização sumária dos biocidas testados bem como das partículas inorgânicas (caulino). As metodologias experimentais mais específicas serão descritas em capítulos subsequentes.

4.1 Microrganismo	62
4.2 Superfícies de adesão	64
4.3 Biocidas	65
4.4 Caulino	68
4.5 Instalações experimentais	69
4.6 Célula de fluxo	74
4.7 Métodos analíticos	78
4.8 Bibliografia	85

---

## 4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado ao longo de todo o trabalho, quer nos estudos em suspensão quer nos de formação de biofilme, foi uma estirpe da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas fluorescens*, proveniente da colecção americana (ATCC 13525). Foi utilizada esta estirpe devido à disponibilidade de informação relativa às condições de cultura (Oliveira *et al.*, 1994; Vieira, 1995), bem como ao conhecimento das potencialidades de formação de biofilme apresentadas por este microrganismo (Pinheiro, 1987; Vieira, 1995). O facto desta bactéria pertencer ao género *Pseudomonas*, que é um dos géneros mais frequentemente encontrados nos circuitos de água dos sistemas industriais (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Bott, 1995; Wirtanen, 1995), também contribuiu para esta opção.

### 4.1.1 Modo de preservação

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi conservada em meio sólido de nutriente agar (Merck) inclinado em tubos de ensaio rolhados com algodão cardado e mantidos à temperatura de 4 °C. Periodicamente, a cultura foi repicada para novos inclinados de nutriente agar.

A reactivação das células foi feita por espalhamento da bactéria em meio sólido de nutriente agar esterilizado (20 g L<sup>-1</sup>) em caixa de Petri e incubação a 27 °C ± 1 °C, durante cerca de 24 h. As colónias assim obtidas constituíam o “stock” de bactérias para pronta utilização.

### 4.1.2 Meio de cultura

Esta bactéria é capaz de crescer num meio sintético aquoso, cuja composição se descreve na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** Composição do meio de cultura para a bactéria *Pseudomonas fluorescens*

Componente	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Glicose anidra	5.00
Peptona	2.50
Extracto de levedura	1.25

O meio foi preparado dissolvendo todos os componentes em água destilada, sendo o pH mantido a  $7.0 \pm 0.2$  pela adição de uma solução de tampão fosfato pH 7, cuja composição se descreve na Tabela 4.2. A solução era então esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 min.

**Tabela 4.2** Composição da solução de tampão fosfato pH 7 (0.2 mol L<sup>-1</sup>) utilizada para a manutenção do pH do meio de cultura da bactéria *Pseudomonas fluorescens*

Componente	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.88
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.15
HCl ou NaCl <sup>(1)</sup>	-

<sup>(1)</sup> quando necessário para acerto do pH

#### 4.1.3 Composição das soluções de tampão

Para a preparação dos meios de cultura dos ensaios em fermentador foi sempre utilizado tampão fosfato pH 7 para dissolver os constituintes do meio, por forma a fomentar o pH óptimo de crescimento da bactéria *P. fluorescens*. No entanto, sempre que, *a posteriori*, se pretendeu que o pH fosse um factor de estudo, recorreu-se a outras soluções de tampão para ressuspender as bactérias e estabelecer os valores de pH pretendidos (5, 7 e 9). A composição destas soluções tampão está sumariada na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Composição das soluções de tampão utilizadas para implementar diferentes pH, nos vários ensaios

Componente	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	14.6	23.3	27.6
Ácido cítrico.H <sub>2</sub> O	10.2	3.7	0.59
HCl ou NaCl	(1)	(1)	(1)

<sup>(1)</sup> quando necessário para acerto do pH

A escolha desta gama de valores de pH teve por base vários factores, a saber: o pH 7 foi escolhido por ser o pH óptimo de crescimento da bactéria *P. fluorescens* (Pinheiro, 1987; Oliveira *et al.*, 1994); o pH 9 foi seleccionado porque a eficiência de ambos os biocidas é mais notória para pH alcalinos (Paulus, 1993; Rossmore, 1995); por fim elegeu-se também o pH 5 porque este valor de pH é encontrado em muitos sistemas industriais, nomeadamente nas indústrias de pasta e de papel (Väisänen *et al.*, 1994).

#### 4.1.4 Preparação do inóculo

A inoculação de um reactor deve fazer-se com uma quantidade de biomassa suficiente, estando as células de preferência na fase de crescimento exponencial. Para tal, preparou-se, em condições assépticas, um inóculo num matraz de 250 mL, inoculando 100 mL de meio de cultura tamponado com células obtidas a partir do espalhamento da bactéria em caixa de Petri e incubando a 27 °C com agitação orbital (120 m<sup>-1</sup>), durante aproximadamente 12 h (tempo necessário para que a cultura se encontre em plena fase exponencial). Decorrido esse tempo, o inóculo estava pronto a ser transferido para os reactores num volume correspondente a cerca de 10 % do volume de operação de cada um dos reactores.

## 4.2 SUPERFÍCIES DE ADESÃO

Nos testes que envolveram a formação de biofilmes, estes foram sempre desenvolvidos sobre placas de aço inox (ASI 316) de dimensões variáveis consoante o estudo programado. A opção pelo aço inox baseou-se essencialmente no facto da maioria dos equipamentos industriais serem fabricados com este material e também porque esta liga é compatível com

os biocidas seleccionados para este estudo. Antes de serem envolvidas nos ensaios de formação de biofilmes, as várias placas de aço inox foram polidas com lixa de água (Indasa, P-1200) e massa de polir de grão fino (Nuamel), sendo posteriormente desengorduradas (detergente comercial), lavadas abundantemente com água da torneira e reservadas em etanol.

### 4.3 BIOCIDAS

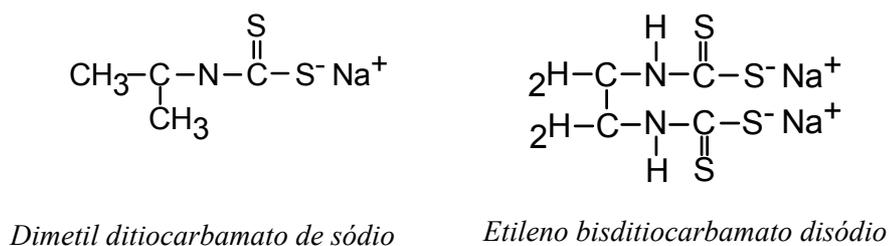
Durante a execução experimental foram testados dois biocidas não oxidantes obtidos da NALCO Chemical Company – delegação portuguesa. Por razões de confidencialidade, impostas pela empresa, os dois biocidas vão ser referidos pelos seus ingredientes activos, pelo que serão simplesmente designados por carbamato e glutaraldeído. Optou-se por estes biocidas porque, no momento da escolha, eram dos biocidas mais frequentemente usados nos sistemas industriais, nomeadamente nas indústrias de pasta e papel (Paulus, 1993; Rossmore, 1995). Algumas das características físicas e químicas de ambos os biocidas são apresentadas na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** Características físicas e químicas dos biocidas utilizados

<b>Parâmetro</b>	<b>Carbamato</b>	<b>Glutaraldeído</b>
Cor	palha	castanho amarelado
Cheiro	enxofre	acentuado a aldeído
pH, escala de Sorenson a 25 °C	11.5	3.1 a 4.5
Densidade	1.18	1.13
Solubilidade em água	imediate e completa	completa
Ponto de solidificação, °C	-1.1	-21.1
Viscosidade, kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0.0049	0.021

### 4.3.1 Carbamato

O carbamato é um biocida pertencente à família dos compostos organo-sulfurados e pode ser descrito como uma solução aquosa de dimetil ditiocarbamato de sódio e de etileno bisditiocarbamato disódio (Figura 4.1).



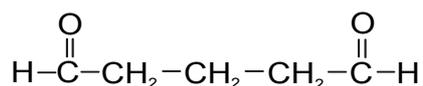
**Figura 4.1** Fórmulas estruturais dos componentes activos da solução de carbamato.

O mecanismo de acção dos compostos organo-sulfurados é muito similar, embora o pH de máximo desempenho varie de composto para composto. São normalmente vistos como bactericidas e fungicidas. Não são microbicidas de efeito letal rápido e geralmente requerem tempos de contacto intermédios na ordem de 4 h a 9 h, nas concentrações mínimas requeridas (Lutey, 1995). Por esta razão estes compostos são tipicamente usados em recirculação e em sistemas de circuito fechado.

Os carbamatos funcionam como constituintes anti-metabolito, isto é, interrompem a acção metabólica dos microrganismos, por ataque da sua membrana, mimetizando nutrientes essenciais requeridos pela célula para produzir aminoácidos. Deste modo, o processo de formação de proteínas, nomeadamente de proteínas de transporte, é bloqueado. Segundo alguns autores (Hunter e Evans, 1990; Cloete *et al.*, 1994), o mecanismo de acção do carbamato pode ser devido a combinações deste com alguns constituintes celulares, nomeadamente com os grupos tiol (~SH) de alguns aminoácidos, como a cisteína. A potencial reactividade do átomo nucleofílico de enxofre com os grupos tiol conduziria à alteração da estrutura tridimensional de enzimas e proteínas estruturais, pois os grupos tiol, pelo estabelecimento de pontes bi-sulfureto, influenciam a estrutura terciária das proteínas (Stryer, 1981).

### 4.3.2 Glutaraldeído

Este biocida é uma solução aquosa de glutaraldeído. A molécula de glutaraldeído ( $C_5H_8O_2$ ) consiste numa cadeia de três átomos de carbono alifáticos com um grupo aldeído em cada uma das extremidades (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Fórmula estrutural do glutaraldeído.

O seu mecanismo de acção é baseado nos seus dois grupos terminais de aldeído pois estes são quimicamente muito reactivos, podendo interagir com certos constituintes da parede e membrana celulares dos microrganismos, como, por exemplo, os grupo amino (amónia e aminas primárias e, ainda que menos frequente, aminas secundárias) e tiol das proteínas (Eagar *et al.*, 1986; Paulus, 1993). A natureza bi-funcional do glutaraldeído, devido à existência dos dois grupos aldeído nas extremidades da sua molécula, permite que cada grupo aldeído possa reagir com diferentes grupos amina, pelo que o glutaraldeído pode formar uma ponte, ou ligação cruzada, entre esses dois grupos (Bott, 1995; Eagar *et al.*, 1986). A interacção do glutaraldeído com os constituintes celulares é favorecida pelo aumento do pH, razão pela qual o pH é o factor de maior influência na actividade microbica desta substância. No entanto, outros factores, tais como o tempo de contacto, a concentração e temperatura, também podem influir no maior ou menor desempenho do glutaraldeído como biocida (Eagar *et al.*, 1986).

### 4.3.3 Concentrações de trabalho

Foram ensaiadas concentrações de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato e de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído. Estas concentrações de trabalho foram obtidas por diluição com água destilada esterilizada das respectivas soluções de biocida fornecidas pela empresa Nalco. A escolha destas concentrações foi baseada em trabalhos prévios (Bott 1995), estando estas concentrações dentro da gama recomendada pela empresa fornecedora dos biocidas.

#### 4.4 CAULINO

Para a investigação dos efeitos da presença de partículas inorgânicas na actividade das bactérias, quer no modo de vida sésil, quer no modo planctónico, nomeadamente quando eram sujeitas ao tratamento com os biocidas, recorreu-se ao caulino. Optou-se por esta argila porque, para além do seu interesse industrial, esta é bastante frequente a Noroeste de Portugal, onde são exploradas várias jazidas, sendo pois comum encontrar partículas de caulino nos sistemas naturais de água.

**Tabela 4.5** Características químicas das partículas de caulino (Oliveira, 1990)

<b>Parâmetro</b>	<b>mg g<sup>-1</sup></b>
Água (110 °C)	8.8
SiO <sub>2</sub>	442
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	379
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	12.6
FeO	<1.0
TiO <sub>2</sub>	1.6
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.37
K <sub>2</sub> O	0.74
CaO	0.74
MgO	21.9
MnO	0.12

O caulino pode ser descrito como sendo uma rocha argilosa pertencente ao grupo das rochas sedimentares cuja génese se deveu a alterações supergénicas de rochas ígneas, mais especificamente do granito. O constituinte principal do caulino é a caulinite, cuja fórmula química é Si<sub>2</sub>Al<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 4OH. Apresenta uma cor branca ou levemente esbranquiçada e reveste-se de elevado interesse, pois a sua aplicação abrange vários sectores industriais, sendo usado no branqueamento do papel, na indústria cerâmica, na construção civil e na composição de diversos produtos como tintas, borrachas e plásticos (Dias *et al.*, 1995).

O caulino utilizado (BA220C) foi proveniente da Companhia Anglo-Portuguesa de Caolino, tendo sido seleccionada uma granulometria compreendida entre 5  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Em todos os ensaios, a concentração efectiva de caulino implementada foi de aproximadamente 300  $\text{mg L}^{-1}$ . A escolha desta concentração baseou-se em estudos anteriormente efectuados por Vieira (1995).

## 4.5 INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS

A estratégia de investigação delineada para os ensaios experimentais envolveu, numa fase inicial, o estudo do modo de acção dos biocidas em culturas em suspensão de *Pseudomonas fluorescens* e, numa fase subsequente, a investigação do modo de actuação dos mesmos biocidas nas bactérias *P. fluorescens* quando estas estavam constituídas em biofilme. Esta estratégia obrigou a que fossem implementados diferentes sistemas experimentais que se passam a descrever.

### 4.5.1 Reactor contínuo

Para investigação do modo de actuação dos biocidas nas bactérias, quando estas assumiam uma forma de vida planctónica, foi necessário providenciar uma fonte constante de bactérias *Pseudomonas fluorescens* em fase exponencial de crescimento. Para tal, desenvolveu-se o cultivo das referidas células bacterianas num fermentador contínuo comercial (Duran). Este consistiu num tanque de vidro, de 3 L de capacidade máxima, dotado de agitação e de uma camisa de aquecimento para regulação da temperatura. A agitação foi promovida pela colocação do fermentador sob uma placa de agitação magnética de velocidade regulável e introdução de uma barra magnética adequada no seu interior. O controlo da temperatura no interior do fermentador conseguiu-se pela circulação de água a 27 °C na camisa de aquecimento. O arejamento do reactor foi conseguido pela entrada de ar atmosférico fornecido por um arejador de aquário de caudal regulável. O ar, antes de entrar no fermentador, atravessava um filtro (ampola de algodão), de modo a remover partículas e microrganismos.

#### 4.5.1.1 Esterilização e operação do reactor

O fermentador foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 30 min, já contendo meio de cultura tamponado (preparado de acordo com o descrito no ponto 4.1.2), bem como a barra magnética para posterior agitação, e tendo já instalados e devidamente acondicionados o tubo dispersor de oxigénio para promoção do arejamento, bem como os tubos em silicone necessários para a alimentação e arejamento do reactor.

A operação do fermentador iniciou-se com a transferência de um inóculo (Sub-capítulo 4.1.3) para o interior do reactor, que já continha meio de cultura esterilizado. Antes da inoculação foram fixadas as condições óptimas de operação no que respeita à temperatura, velocidade de agitação e caudal de arejamento.

Inicialmente o fermentador operou em modo descontínuo durante cerca de 12 h, por forma a obter-se uma concentração celular elevada. Findo este tempo, o reactor passou a operar em modo contínuo pela alimentação de meio de cultura fresco ao fermentador através de uma bomba peristáltica. Sempre que necessário, foram adicionadas à cultura 1 a 3 gotas de agente anti-espuma de silicone (Merck 7743). O nível do fermentador foi mantido pela saída do excesso de cultura microbiana para o esgoto. O caudal de alimentação foi ajustado a cerca de 100 mL h<sup>-1</sup> por forma a garantir uma taxa de diluição inferior à taxa máxima de crescimento desta bactéria nestas condições.

#### 4.5.2 Associação do Reactor Contínuo e Tanque de mistura

Para estudo do modo de acção dos biocidas sobre biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* foi necessário promover a formação de biofilmes nas superfícies seleccionadas. Estes biofilmes foram desenvolvidos essencialmente de duas maneiras: pela imersão de pequenas placas de aço inox numa cultura bacteriana agitada ou pela circulação da cultura microbiana em células de fluxo que continham placas de aço inox amovíveis na sua parede interna (adesão em fluxo). Em ambos os casos, a cultura microbiana foi obtida de modo similar numa instalação experimental, esquematicamente representada na Figura 4.3, que compreendia essencialmente um fermentador e um tanque de diluição. Com a associação deste tanque ao fermentador pretendeu-se obter uma cultura bacteriana diluída (concentração bacteriana aproximada de  $6 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> e uma concentração de glicose próxima de 20 mg L<sup>-1</sup>), à qual se convencionou chamar *suspensão celular*.

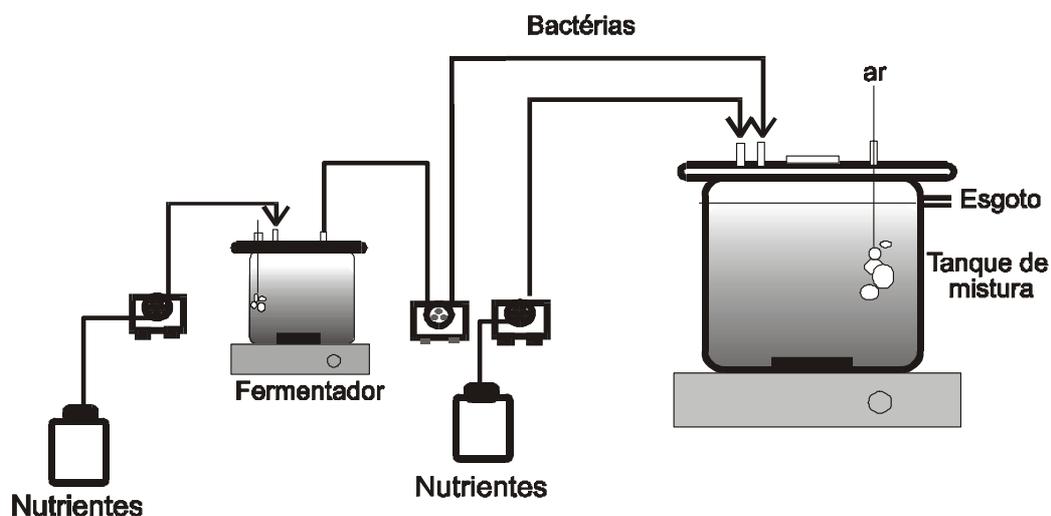


Figura 4.3 Esquema da instalação experimental.

#### 4.5.2.1 Características do equipamento

A instalação onde foi produzida a suspensão celular, basicamente, compreendeu num fermentador similar ao descrito no ponto 4.4.1, e com modos de esterilização e operação idênticos, só que de menor capacidade (volume útil de 0.5 L) e um segundo vaso de reacção associado ao fermentador, ao qual se convencionou chamar *tanque de mistura*. Este consistiu num tanque agitado fechado de 3 L de capacidade, construído em acrílico (Perspex<sup>TM</sup>). A agitação e arejamento foram conseguidos procedendo-se de modo semelhante ao descrito para o reactor contínuo. A temperatura foi controlada por meio duma serpentina enrolada no exterior do corpo do tanque por onde circulava água a 27 °C, proveniente de um banho termostaticado equipado com uma bomba de circulação e uma resistência eléctrica.

#### 4.5.2.2 Esterilização e lavagem

O modo de esterilização do fermentador foi idêntico ao descrito para o fermentador de maior volume (ponto 4.4.1.1).

Dado que o material utilizado na construção do tanque de mistura não suportava temperaturas elevadas, procedeu-se à esterilização química do tanque pela circulação, em circuito fechado, de uma solução de hipoclorito de sódio comercial (10 mL L<sup>-1</sup>) durante 24 h. Após esse período, removeu-se a solução de hipoclorito e procedeu-se à lavagem

através da circulação, em circuito aberto, de água previamente esterilizada, por forma a reduzir ao mínimo a concentração residual de hipoclorito de sódio. Finda esta operação, o reactor encontrava-se estéril, pronto a receber meio de cultura estéril. Todos os restantes acessórios (tubo dispersor, tubos para alimentação de meio fresco, rolhas de algodão, etc.) foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 min.

#### 4.5.2.3 *Modo de operação*

O modo de operação do fermentador foi idêntico ao descrito para o reactor contínuo de maior volume (sub-capítulo 4.4.1.1). Parte da cultura produzida neste fermentador (cerca de 100 mL h<sup>-1</sup>) foi usada para continuamente inocular o tanque de mistura. Numa fase prévia, e após esterilização, o tanque de mistura foi carregado com 2 L de meio de cultura estéril e foram fixadas todas as condições de operação (Tabela 4.6). Todos estes procedimentos foram realizados em condições de assépsia. A alimentação de 2.5 L h<sup>-1</sup> de meio de cultura tamponado realizou-se com o auxílio de uma bomba peristáltica, a partir de recipientes em plástico, esterilizáveis em autoclave, com uma capacidade de 30 L. Esta corrente, para além de constituir a fonte de nutrientes, também funcionou como uma corrente de diluição da concentração bacteriana e da fonte de carbono. A composição do meio de cultura deste tanque de mistura (Tabela 4.7) diferia da implementada no fermentador pois a quantidade de nutrientes por unidade de volume foi significativamente menor. Este meio foi preparado por dissolução dos seus constituintes em tampão fosfato pH 7 (Tabela 4.2), previamente preparado com água da torneira. Uma saída para o esgoto manteve o nível do tanque de mistura constante.

**Tabela 4.6** Condições de operação do tanque de mistura

Variável	Valor
Temperatura	27.0 °C ± 1.0 °C

pH	$7.0 \pm 0.2$
Taxa de diluição	$0.8 \text{ h}^{-1}$

**Tabela 4.7** Composição do meio de cultura alimentado à suspensão celular desenvolvida no tanque de mistura

Componente	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
Glicose anidra	0.050
Peptona	0.025
Extracto de levedura	0.013

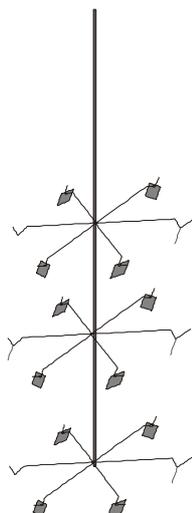
#### 4.5.2.4 Monitorização do sistema

Periodicamente foram recolhidas amostra da suspensão celular do tanque de mistura, para quantificação da biomassa bacteriana e da glicose.

#### 4.5.3 Formação de biofilmes em placas suspensas

Sempre que se desenvolveram biofilmes em placas de aço inox suspensas no seio de uma cultura bacteriana agitada, foram introduzidas no tanque de mistura, após a suspensão celular ter atingido o estado estacionário (isto é, uma concentração celular próxima de  $6 \times 10^7$  bactérias  $\text{mL}^{-1}$  e uma concentração em glicose de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), várias placas de aço inox devidamente fixadas num suporte metálico construído para o efeito. Este consistiu numa vareta central de aço inox, à qual foram fixadas radialmente várias hastes para acomodação de várias placas de aço inox, para suporte do biofilme a formar (Figura 4.4).

A tampa do tanque de mistura foi construída de maneira a ser possível encaixar uma rolha em borracha perfurada, por forma a ajustar o suporte de acomodação das várias superfícies de adesão. O conjunto suporte + placas de aço foi esterilizado em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 min, antes de ser introduzido no tanque de mistura.



**Figura 4.4** Pormenor esquemático do suporte das placas de aço.

#### **4.5.4 Formação de biofilmes em sistemas de adesão em fluxo**

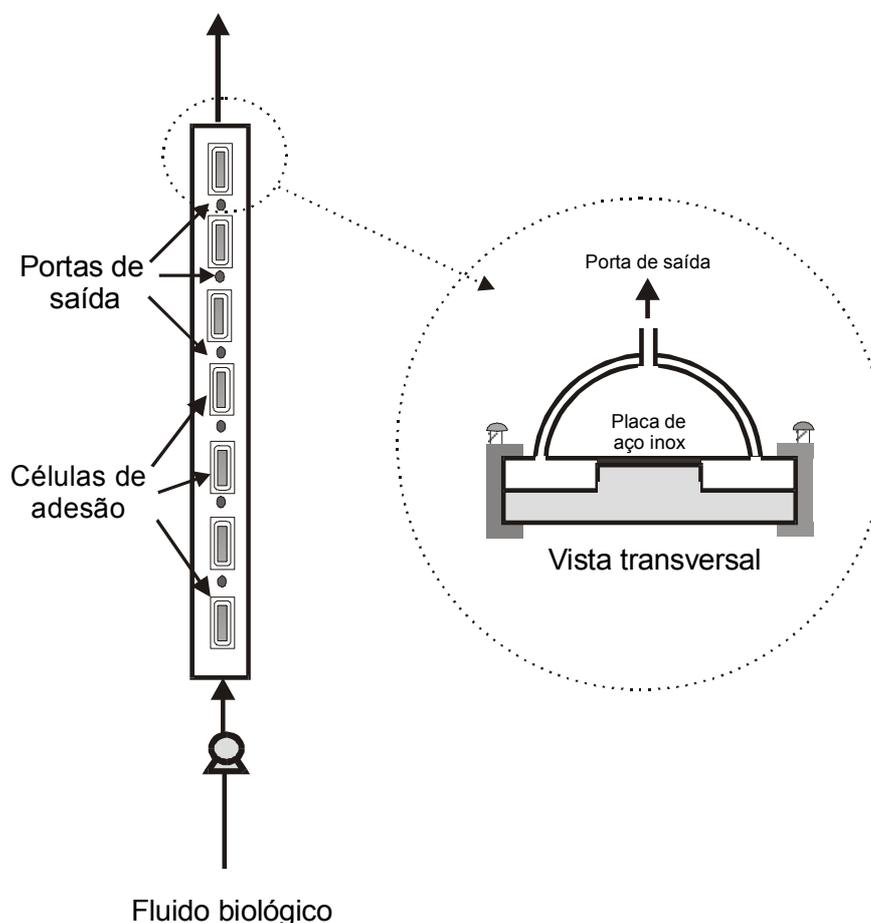
A obtenção de biofilmes sobre placas de aço inox foi conseguida pela recirculação da suspensão celular, continuamente obtida no tanque de mistura, no interior de células de fluxo idealizadas e desenvolvidas propositadamente para este efeito. Dada a sua especificidade e carácter mais inovador, as células de fluxo irão ser, de seguida, objecto de uma descrição mais particular.

### **4.6 CÉLULA DE FLUXO**

#### **4.6.1 Características**

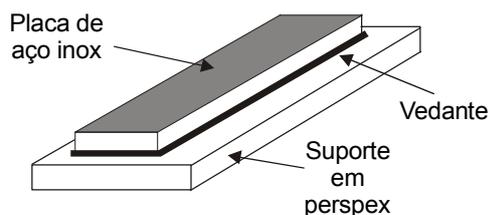
A Figura 4.5 representa esquematicamente uma célula de fluxo desenvolvida no âmbito do presente trabalho e utilizada nos ensaios de formação de biofilme por fluxo contínuo de suspensão celular. Cada célula de fluxo foi construída em acrílico (Perspex<sup>TM</sup>) e pode-se descrever como sendo uma pequena conduta, posicionada verticalmente, de secção semi-circular de 45 cm de comprimento e 2.02 cm de diâmetro hidráulico. Na sua face plana, cada célula de fluxo possui várias aberturas rectangulares (equidistantes 5 cm) para adequadamente alojar as várias superfícies de suporte do biofilme. Na face circular de cada célula de fluxo foram construídas várias portas de saída (0.8 cm de diâmetro interno),

localizadas ao nível do espaçamento entre cada superfície de adesão. Estas portas de saída foram cuidadosamente fechadas recorrendo a pinças Hoffman.



**Figura 4.5** Representação esquemática da Célula de fluxo.

As superfícies de adesão são constituídas por pequenas placas de aço inox coladas (cola epóxi Araldite® rapide) em suportes rectangulares de acrílico (Perspex™). Ao conjunto suporte de acrílico mais placa aço foi convencionado chamar-se *placa de adesão*. Esta designação decorre do facto da adesão bacteriana constituir um pré requisito para a formação de biofilme. A geometria (Figura 4.6) destas placas de adesão foi projectada por forma a que cada uma ficasse adequadamente ajustada nas aberturas da face plana de cada célula de fluxo. A fixação de cada placa de adesão à face plana da célula de fluxo foi reforçada por meio de um conjunto de parafusos. A inclusão de um vedante em cada placa de adesão garantiu as condições de estanquicidade do sistema.



**Figura 4.6** Pormenor de uma placa de adesão.

#### 4.6.2 Esterilização e lavagem

A esterilização das células de fluxo, dado os materiais de construção não suportarem temperaturas elevadas, foi conseguida por circulação, em circuito fechado, de uma solução de hipoclorito de sódio comercial ( $10 \text{ mL L}^{-1}$ ) durante 24 h. Após esse período, removeu-se a solução de hipoclorito e procedeu-se à lavagem através da circulação, em circuito aberto, de água previamente esterilizada por forma a reduzir ao mínimo a concentração residual de hipoclorito de sódio.

Finda esta operação, as tubagens de entrada e saída das células de fluxo foram assepticamente introduzidas e fixadas no tanque de mistura, ficando então as células de fluxo prontas para receber a suspensão celular e iniciar-se a formação de biofilme.

#### 4.6.3 Modo de operação

Após esterilização das células de fluxo e obtenção da suspensão celular em estado estacionário (sub-capítulo 4.5.2), procedeu-se então ao desenvolvimento de biofilme pela circulação da suspensão celular no interior das células de fluxo a um caudal pré determinado, que foi regulado manualmente. A circulação contínua de suspensão celular nas células de fluxo foi efectuada por bombas centrífugas de aquário. As ligações das bombas às células de fluxo foram feitas por tubagem em silicone.

Sempre que programado, podiam ser removidas placas de adesão para análises posteriores e substituídas por outras limpas e estéreis, previamente reservadas em etanol. A retirada das placas de adesão fez-se sempre em sentido descendente, a partir do topo da célula de fluxo. A remoção de placas de adesão e conseqüente substituição por outras ocorria sem a paragem do fluxo da suspensão celular pois este, durante o período de remoção, era desviado para a porta de saída imediatamente abaixo da placa de adesão que se

pretendia amostrar. Deste modo, a formação de biofilme nas placas de adesão remanescentes nas células de fluxo não era perturbada.

**Tabela 4.8** Características dos principais equipamentos usados na execução dos trabalhos práticos

<b>Equipamento</b>	<b>Marca (Origem)</b>	<b>Modelo</b>
Estufa de incubação	Memmert (Alemanha)	Typ 840
Autoclave	Uniclave (Portugal)	AJC 6Kw 88
Agitador orbital	B. Braun (Alemanha)	Certomat S
Eléctrodo de pH	Ingold (Suíça)	-
Medidor de pH	Orion (USA)	420 A
Placa de agitação	ERT (Portugal)	AM.O
Arejador de aquário	Tagus (Portugal)	Tagus 2000
Bombas peristálticas	Ismatec (Suíça)	Reglo Analog MS-2/6
Bombas de aquário	Eheim (Alemanha)	Typ 1060; Typ 1048
Bombas peristálticas	Univ. Birmingham (Inglaterra)	-
Centrífuga angular	J. P. Selecta (Espanha)	Tubos de 15 mL
Centrífuga angular	Sigma (Alemanha)	113; eppendorfs
Centrífuga	Sigma (Alemanha)	4K10

## 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1 Determinação da biomassa

#### 4.7.1.1 Contagem celular

O número de células presente nas suspensões bacterianas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, por observação directa num microscópio óptico (Zeiss, Alemanha) com ampliação adequada.

#### 4.7.1.2 *Determinação dos Sólidos totais e Sólidos voláteis totais*

A quantificação da biomassa em biofilme foi efectuada pelo método gravimétrico de matéria seca, de acordo com o descrito no Standard Methods of Analysis (1989).

#### 4.7.1.3 *Quantificação de proteínas*

A concentração de células foi relacionada com o seu conteúdo em proteína total, tendo este sido doseado pelo método de Lowry modificado (Sub-capítulo 4.7.6.1) após ruptura das células por ultra-sons.

### 4.7.2 **Quantificação da glicose**

#### 4.7.2.1 *Doseamento de açúcares redutores pelo método de Miller (DNS)*

A concentração de glicose foi estimada pelo doseamento dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959), vulgarmente conhecido pelo método de DNS. Este método baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. A presença do tartarato duplo de sódio e de potássio (sal de La Rochele) destina-se a proteger o reagente da acção do oxigénio dissolvido.

O procedimento experimental consiste em adicionar a 0.5 mL de amostra 0.5 mL de reagente DNS e, após agitação em vórtex, colocar num banho de água a 100 °C durante 5 min. Findo este tempo, e após arrefecimento rápido com água fria, adicionar 5 mL de água destilada e ler a absorvência a 540 nm. Para a obtenção do branco, substituíam-se a amostra por água destilada e seguia-se o mesmo procedimento. A calibração era feita previamente recorrendo a soluções padrão de glicose (0.0 g L<sup>-1</sup> a 1.0 g L<sup>-1</sup>).

O reagente de DNS prepara-se dissolvendo 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 mL de NaOH 2 mol L<sup>-1</sup>, a 80 °C. Simultaneamente, dissolvem-se 150 g de tartarato duplo de sódio e de potássio (sal de La Rochele) em 250 mL de água destilada, também a 80 °C. Após a dissolução completa misturam-se as duas soluções ajustando o volume final a 500 mL, com água destilada. A solução deve conservar-se num frasco escuro.

### 4.7.3 Determinação da carga superficial

#### 4.7.3.1 Potencial zeta

Para a determinação da carga superficial das entidades envolvidas em interacções electrostáticas recorre-se, geralmente, ao conceito do potencial de “superfície de corte” (Hunter, 1988). Sumariamente, este conceito refere que, quando uma partícula em solução aquosa é sujeita a um campo eléctrico, esta mover-se-á tangencialmente com uma velocidade que depende do potencial da “superfície de corte” ou potencial zeta. O potencial zeta não pode ser medido directamente, mas pode ser relacionado, sob certas condições (van Oss, 1995; Azeredo, 1998), com os valores de mobilidade electroforética. A determinação desta baseia-se na medição da velocidade de migração de partículas ou células microbianas, a temperatura constante, quando sujeitas a um campo eléctrico.

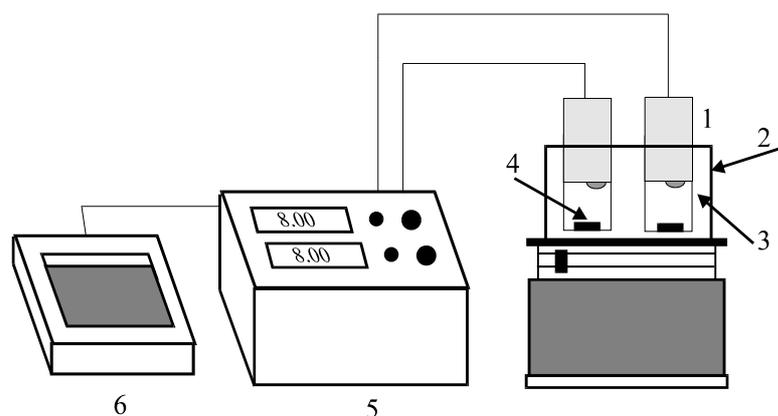
Neste trabalho experimental, o potencial zeta foi determinado de acordo com Loosdrecht *et al.* (1990), numa câmara fechada transparente (célula de electroforese), que incluía nas suas extremidades dois eléctrodos de platina (um cátodo e um ânodo). A esta câmara estava associado um sistema ZetaMeter 3.0+ (ZetaMeter Incorporated, New York). Quando uma diferença de potencial (entre 200 V e 300 V) era aplicada à célula de electroforese, as partículas que se encontravam em suspensão no interior da câmara moviam-se em direcção a um dos eléctrodos. O tempo que cada partícula demorava a percorrer um determinado percurso era registado pelo ZetaMeter que, após cálculos internos, intrínsecos ao aparelho, apresentava o valor de potencial zeta característico dessa partícula, nas condições do ensaio.

### 4.7.4 Determinação da actividade microbiana

#### 4.7.4.1 Método respirométrico

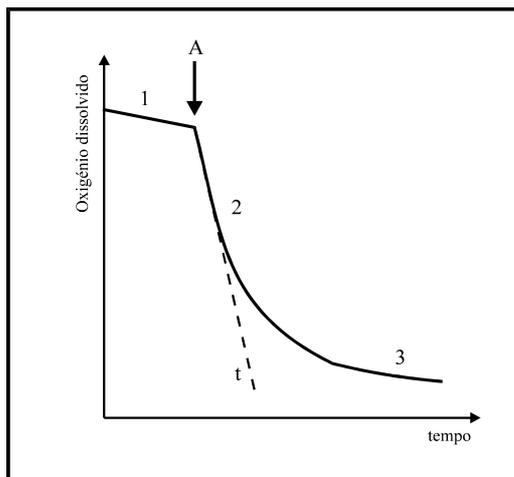
A taxa específica de consumo de oxigénio, ou taxa específica de respiração, pode ser definida como a quantidade de oxigénio consumido por unidade de biomassa existente e por unidade de tempo. Para a medição da taxa de consumo de oxigénio, expressa em massa de oxigénio consumida por unidade de volume e por unidade de tempo, existem vários tipos de aparelhos denominados respiómetros, que permitem a medição em contínuo ou

descontínuo. São essencialmente constituídos por um ou vários eléctrodos de oxigénio, um medidor de oxigénio, uma câmara de reacção ou célula respirométrica onde circula ou se encontra a biomassa, dependendo do modo de operação do respirómetro, e um sistema de aquisição de dados enviados pelo medidor. Neste trabalho experimental utilizou-se um respirómetro de funcionamento descontínuo (Yellow Spring Biological Oxygen Monitor, model 53), que se encontra esquematicamente representado na Figura 4.6, sendo os dados adquiridos em computador através do programa LABTECH NOTEBOOKpro.



**Figura 4.6** Diagrama esquemático do respirómetro descontínuo: (1) Eléctrodo de oxigénio; (2) Câmara de termostatização; (3) Célula do respirómetro; (4) Barra magnética; (5) Monitor de oxigénio; (6) Aquisição de dados.

A taxa específica de consumo de oxigénio pode ser determinada na presença ou ausência de fontes de carbono e energia externas aos microrganismos. No caso de não estarem presentes fontes de carbono ou de energia externas, o consumo de oxigénio é devido ao metabolismo endógeno designando-se esta taxa de respiração por taxa de respiração endógena. Na presença de fontes de carbono e energia, o consumo de oxigénio é devido às reacções de oxidação, designando-se a taxa de respiração por taxa de respiração total. Um respirómetro de funcionamento descontínuo permite obter a evolução da concentração em oxigénio dissolvido ao longo do tempo. Este registo é denominado de respirograma (Figura 4.7).



**Figura 4.7** Respirograma típico: 1 e 3 - respiração endógena; 2 - respiração total; A - injeção de substrato; t - tangente no ponto de injeção de substrato.

A interpretação de um respirograma envolve o cálculo da taxa de respiração endógena (fases 1 e 3) e da taxa de respiração total (fase 2). A taxa de respiração endógena é calculada a partir do declive da recta obtida na fase 1 e a taxa de respiração total é calculada a partir da tangente no momento da injeção de substrato. A taxa de respiração devido à adição de uma determinada concentração de substrato é igual à diferença entre a taxa de respiração total e a taxa de respiração endógena. Esta diferença, após normalização pela quantidade de biomassa, foi apelidada de actividade respiratória específica e representada, abreviadamente, pela sigla OUR (“Oxygen Uptake Rate”).

#### 4.7.5 Caracterização física de biofilmes

##### 4.7.5.1 Determinação do peso húmido

O peso húmido do biofilme foi determinado imediatamente após a sua remoção do local de formação, numa balança analítica com a capacidade máxima de 200 g e precisão de 0.001 g. Foi avaliado o peso do conjunto biofilme húmido + superfície de suporte, sendo posteriormente descontado o peso do suporte. Este foi determinado previamente.

##### 4.7.5.2 Determinação do peso seco

O peso seco da massa total de biofilme formado nas várias superfícies de suporte foi estimado, por gravimetria, determinando-se os sólidos totais após o biofilme ter sido seco,

até peso constante, numa estufa a 105 °C. O procedimento efectuado foi baseado no *Standard Method of Analysis* (1989).

#### 4.7.5.3 Determinação da quantidade de água num biofilme

A percentagem de água presente nos biofilmes foi determinada calculando a diferença entre os pesos húmido e seco e dividindo pelo peso húmido. O resultado foi multiplicado por 100.

#### 4.7.5.4 Quantificação da biomassa

A biomassa presente num biofilme foi estimada determinando o teor em sólidos voláteis totais. Estes eram obtidos após ignição da massa total de biofilme a 500 °C ± 50 °C, seguindo-se o método descrito no *Standard Method of Analysis* (1989).

### 4.7.6 Caracterização bioquímica de biofilmes

#### 4.7.6.1 Proteína total

A quantificação da proteína total foi efectuada pelo método modificado de Lowry *et al.* (1951) utilizando o kit Sigma P5656. O reagente de Folin & Ciocalteu, cujo constituinte activo é o ácido misto fosfomolibdotúngstico, está na base deste método. Este ácido, na presença de proteína, é reduzido por perda de 1 a 3 átomos de oxigénio. Obtêm-se assim várias espécies reduzidas possuindo uma cor azul característica (absorção máxima a 745 nm a 750 nm). A fixação do cobre por quelação facilita a transferência de electrões para o ácido misto.

O procedimento experimental consiste em adicionar a 1 mL de amostra 1 mL de reagente de Lowry e homogeneizar no vórtex durante 30 s. Após 20 min de reacção, à temperatura ambiente, voltar a homogeneizar e adicionar simultaneamente 0.5 mL de reagente de Folin & Ciocalteu's. Deixar reagir à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 min, findo o qual se lê a absorvência a 740 nm. O branco obtém-se pela substituição da amostra por solução tampão (a mesma utilizada na preparação das culturas bacterianas), seguindo-se o mesmo procedimento utilizado na amostra.

Antes das determinações e sempre que se mudava de reagentes, procedia-se à calibração do espectrofotómetro através da análise de soluções padrão de albumina sérica de bovino ( $0 \text{ mg L}^{-1}$  a  $400 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 4.7.6.2 *Conteúdo em polissacarídeos*

A determinação do conteúdo em polissacarídeos foi realizada pelo método de Dubois *et al.* (1956). Segundo Horan e Eccles (1986), a glicose e outros açúcares, como por exemplo galactose e manose, apresentam uma grande semelhança com os monómeros que compõem os polissacarídeos. Deste modo, a utilização de glicose como padrão no doseamento destas macromoléculas permite estimar a sua quantidade nas amostras.

O procedimento experimental consiste em adicionar a 1 mL de amostra 1 mL de solução de fenol ( $50 \text{ g L}^{-1}$ , preparado com água ultra pura filtrada) e, de forma rápida, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (97 %). Agitar vigorosamente no vórtex e, após arrefecimento à temperatura ambiente, ler a absorvência a 490 nm. O branco obtém-se pela substituição da amostra por solução de tampão (a mesma utilizada na preparação das culturas bacterianas) seguindo-se o mesmo procedimento utilizado na amostra.

A calibração do espectrofotómetro foi realizada recorrendo a soluções padrão de glicose (entre  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $80 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 4.7.7 **Microscopia de epifluorescência**

A microscopia de epifluorescência baseia-se na propriedade que os fluorocromos apresentam de se fixarem num local específico dos microrganismos, atribuindo-lhes cor. O método de epifluorescência com laranja de acridina (um dos fluorocromos mais comuns) estima a viabilidade celular pela perda de capacidade reprodutiva. A molécula de acridina pode ligar-se à cadeia de ARN (ácido ribonucleico) das células bacterianas, quando estas estão numa fase de crescimento exponencial (o teor em ARN predomina em células activas), conduzindo ao desenvolvimento de uma fluorescência laranja avermelhada. Pelo contrário, quando se liga ao ADN (ácido desoxirribonucleico), que predomina nas células mortas ou com baixa taxa de reprodução, as células fluorescem de verde (Porter e Feig, 1980).

O procedimento experimental consiste em corar as várias amostras com uma solução de laranja de acridina ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) durante 15 min, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Findo este tempo, são cuidadosamente lavadas com água destilada esterilizada, para remover o excesso de corante, e rapidamente observadas ao microscópio óptico de fluorescência com o filtro apropriado (filtro Zeiss nº 09, excitação BP entre 450 nm e 490 nm).

#### 4.7.8 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

Para observação da estrutura superficial do biofilme recorreu-se à observação por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Antes da observação, o biofilme suportado nas placas metálicas era desidratado através da imersão em soluções de etanol absoluto de concentração crescente até 100 % (10, 25, 40, 50, 70, 80 e 90 %), permanecendo cerca de 15 min em cada solução. Posteriormente, as placas eram transferidas para um exsiccador para secagem completa (2 d a 3 d). As amostras foram cobertas com ouro e examinadas num microscópio electrónico de varrimento entre 10 kV e 15 kV. As várias observações foram documentadas através da aquisição de registos fotográficos.

Não foi seguido o método típico de preparação de amostras para SEM (fixação com uma solução de glutaraldeído, 3 % preparada em tampão cacodilato, pH 7.2, antes da desidratação pelas soluções de etanol) porque certos autores referem que o glutaraldeído pode perturbar a estrutura da matriz polimérica (Azeredo *et al*, 1999) e consequentemente alterar a arquitectura do biofilme.

**Tabela 4.9** Características dos principais equipamentos necessários para a realização dos métodos analíticos

<b>Equipamento</b>	<b>Marca (Origem)</b>	<b>Modelo</b>
Estufa de secagem	Sanyo, (Suiça)	MOV-212F
Estufa de incubação	Memmert,(Alemanha)	Typ 840
Mufla	Lenton Furnaces (Inglaterra)	-

Exsicador	Simax (Portugal)	-
Balança análitica	Scaltec, (Alemanha)	SBC 31
Espectrofotómetro	Unicam, Helios (Inglaterra)	
Vórtex	Heidolph, (Suíça)	Reax 2000
Microscópio óptico	Zeiss, Axioskop (Alemanha)	
Microscópio electrónico de varrimento	Leica	S360
Sonicador	Vibracell, (USA)	VC 600
Centrifuga angular	J. P.Selecta, (Espanha)	6, Tubos 15 mL
Centrifuga angular	Sigma, (Alemanha)	113, Eppendorfs

#### 4.8 BIBLIOGRAFIA

- APHA, AWWA, WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition, Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. e Trussel, R. R. eds. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Azeredo, J. 1998. Dissertação de Doutoramento: Adesão de microrganismos e composição da matriz de bioagregados – desenvolvimento de técnicas e estudo da influência de exopolímeros. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Azeredo, J., Lazarova, V. e Oliveira, R. 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Wat. Sci. Technol*, 39(7), 243-250.
- Bott, T. R. 1992. The use of biocides in industry. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 567-581.
- Bott, T. R. 1995. *Fouling of Heat Exchangers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B. V..
- Cloete, T. E., Brözel, V. S., De Bruyn, E. E. e Pietersen, B. 1994. Optimisation of biofouling control in industrial water systems. Water Research Commission Report n° 318/1/94. South Africa.
- Dias, A. J. G., Rodrigues, B. G. e Praia, F. J. 1995. Geologia do concelho de Matosinhos, aspectos mais significativos. Monografia do Concelho de Matosinhos, 13-37.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eagar, R. G., Leder, J. and Theis, A. B. 1986. Glutaraldehyde: factors important for microbiocidal efficacy. 3rd Conference on Progress in Chemical Disinfection, Binghamton, NY, 3-5 April
- Horan, N. J. e Eccles, C. R. 1986. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Reserach*, 20, 1427-1432.
- Hunter, R. J. 1988. Zeta potential. In: Ottewill, R. and Rowell, R. eds. *Colloid Science, Principles and Applications*. London: Coloid Science Academic Press.
- Hunter, J. E. e Evans, L. V. 1990. The toxicity of the biocides Zineb, Nabam and their derivatives to the ship-fouling diatom *Amphora coffeaeformis*. *Biofouling*, 2, 267-287.
- Loosdrecht, M., Norde, W., Lyklema, J. and Zehnder, A. 1990. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences*, 52, 103-114.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. I. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lutey, R. W. 1995. Process cooling water. In: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 51-82.
- Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: A Review. *Food Reviews International*, 8(4), 573-603.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Oliveira, D. R. 1990. Dissertação de Doutoramento: Sujamento por partículas em suspensão aquosa – interações superficiais. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Oliveira, R., Melo, L., Oliveira, A. and Salgueiro, R. 1994. Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2, 41-46.
- Paulus, W. 1993. *Microbicides for the Protection of Materials – A Handbook*. London, UK, Chapman & Hall.
- Pinheiro, M., M. 1987. Dissertação de Doutoramento: Sujamento Biológico de Superfícies de Transferência de Calor. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Porter, K. G. e Feig, Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943-948.
- Rossmore, H. W: 1995. Introduction to biocide use. In: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Glasgow, UK, Blackie Academic & Professional, 1-18.
- Stryer, L. 1981. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Väisänen, O. M., Nurmiäho-Lassila, E-L., Marmo, S. A. e Salkinoja-Salonen, M. S. 1994. Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 641-653.
- van Oss, C. J. 1995. L'influence de la forme et de la dimension des molécules sur leur mobilité en électrophorèse, second thesis, University of Paris.
- Vieira, M. J. 1995. Dissertação de Doutoramento: Estudo da Formação de Filmes Biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos Efeitos Associados à Transferência de Massa Interna e à Incorporação de Partículas de Caulino. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Wirtanen, G. 1995. *Biofilm Formation and its Elimination from Food Processing Equipment*. VTT Publications, Espoo, Finland.

## 5. EFEITO DOS BIOCIDAS NA CARGA SUPERFICIAL E NA ADESÃO INICIAL DE *P. fluorescens*

---

### Sumário

Para a compreensão dos fenómenos envolvidos na adesão de bactérias a suportes, é decisivo conhecer as propriedades superficiais, quer das células quer dos suportes, e relacionar essas propriedades com a quantidade de bactérias aderidas.

Este capítulo apresenta resultados referentes à acção dos biocidas na adesão inicial de bactérias *P. fluorescens* a superfícies de aço inox e na carga superficial das bactérias quando tratadas com diferentes concentrações de carbamato e glutaraldeído. A relação destes valores com a adesão inicial das bactérias também é discutida.

5.1 Introdução	88
5.2 Objectivos	90
5.3 Metodologia experimental	90
5.4 Resultados e discussão	92
5.5 Conclusões	102
5.6 Bibliografia	103

---

## 5.1 INTRODUÇÃO

A prática mais comum para lidar com biofilmes indesejáveis centra-se na aplicação de biocidas. Para que se possa correctamente delinear a estratégia de aplicação destas substâncias antimicrobianas, é fundamental conhecer previamente o seu modo de actuação, isto é, conhecer o seu potencial de interferência com o processo de formação do biofilme, designadamente no que respeita aos efeitos na fase inicial de adesão dos microrganismos às superfícies de adesão.

Os mecanismos que governam a adesão de microrganismos estão intimamente associados com as propriedades superficiais que estes apresentam, bem como com as apresentadas pelas superfícies de adesão. A carga superficial, a tensão superficial e a hidrofobicidade são das propriedades que química e fisicamente mais significativamente interferem com o processo inicial de adesão, pelo que a sua caracterização ajudará a descrever o processo inicial de adesão de bactérias a suportes sólidos.

### 5.1.1 Propriedades eléctricas superficiais

A adesão de bactérias a superfícies sólidas, no período inicial de formação de biofilme, é frequentemente dependente das cargas eléctricas das entidades envolvidas, isto é, da carga eléctrica superficial das bactérias e da superfície do suporte. As interações electrostáticas (de repulsão ou de atracção) entre as partículas em solução (nas quais as bactérias se incluem), poderiam ser quantificadas se fosse conhecido o potencial eléctrico de cada uma das superfícies interactuantes. Contudo, do ponto de vista experimental, o potencial eléctrico é difícil de determinar, pelo que usualmente se recorre à determinação do potencial electrocinético (ou potencial zeta) (Hunter, 1988), que permite a obtenção de um valor aproximado para a força de interacção.

Assumindo algumas simplificações, o potencial zeta pode ser calculado a partir da mobilidade electroforética (Wal *et al.*, 1997), e como está directamente relacionado com a carga eléctrica da superfície, os dois termos são frequentemente usados quase como sinónimos.

Qualquer superfície sólida pode ser caracterizada em termos da sua carga superficial, energia livre de superfície e rugosidade. A adesão de bactérias a superfícies aparentemente inertes é influenciada pelas propriedades inerentes à superfície sólida e pela maneira como estas propriedades são modificadas pela adsorção molecular à superfície (Marshall e Blainey, 1990).

A carga superficial dos microrganismos é determinada pela adsorção de iões ou por ionização de grupos superficiais, sendo estes fenómenos dependentes das propriedades da solução aquosa, nomeadamente do pH, pois os grupos ácidos (carboxilo e fosfato) e básicos (amina), existentes na superfície dos microrganismos, podem reagir com os iões  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  da solução.

Muitos dos agentes antimicrobianos podem afectar negativamente a adesão inicial de microrganismos, alterando a energia livre de superfície ou a hidrofobicidade da parede celular (Cheung e Beech, 1996).

### 5.1.2 Teoria DLVO

De acordo com o preconizado por Marshall (1976), as bactérias podem ser consideradas partículas coloidais, uma vez que o seu tamanho não excede  $2\ \mu\text{m}$ , possuem normalmente uma carga global negativa e uma densidade ligeiramente superior à da água, pelo que a sua adesão inicial a suportes sólidos pode ser descrita em termos de fenómenos físico-químicos, sendo frequente o recurso à teoria DLVO (Derjaguin e Landau, 1941; Verwey e Overbeek, 1948). Esta teoria aborda a adesão de uma partícula a uma superfície tendo em consideração as interacções dos corpos quando estes se aproximam um do outro. Consequentemente, a atracção entre a partícula e a superfície poderá ocorrer então no mínimo secundário de energia, balanço entre as forças atractivas de van der Waals e as interacções electrostáticas (atractivas ou repulsivas) resultantes da sobreposição da dupla camada eléctrica que circunda a superfície de cada uma das entidades envolvidas (Marshall e Blainey, 1990). Uma vez que a maioria das superfícies adquire uma carga negativa quando em solução (Hunter, 1988), as forças da dupla camada eléctrica assumem geralmente um carácter repulsivo.

## 5.2 OBJECTIVOS

Nestes ensaios procurou-se investigar a influência dos biocidas nas propriedades superficiais da bactéria *P. fluorescens*, nomeadamente no potencial electrocinético, e consequentemente determinar a sua influência no processo inicial de adesão da referida bactéria a superfícies de aço inox, quando sujeita ao tratamento com os biocidas. Procurou-se também conhecer o efeito do pH na carga superficial das bactérias, quando sujeitas aos mesmos biocidas, e relacionar estes factores com a maior ou menor aptidão das bactérias para a adesão. A influência de ambos os biocidas no potencial zeta do aço inox (material usado como suporte para o desenvolvimento de biofilmes) foi também determinada.

## 5.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 5.3.1 Ensaios de adesão inicial

A adesão inicial de bactérias *P. fluorescens* a placas de aço inox foi investigada por microscopia de epifluorescência com base no método de coloração com laranja de acridina, descrito no sub-capítulo 4.7.8. A adesão foi efectuada pela imersão, em posição horizontal, de placas de aço inox (1.5 cm de largura por 1.5 cm de comprimento e 1 mm de espessura) em suspensões de bactérias *P. fluorescens*, às quais foram adicionados os biocidas. As observações microscópicas foram documentadas por registos fotográficos representativos.

#### 5.3.1.1 Preparação das suspensões celulares

Para a preparação das suspensões bacterianas foi centrifugado (3800 g, 10 min) um volume representativo de cultura bacteriana de *P. fluorescens*, cultivada no reactor contínuo (sub-capítulo 4.5.1), reservando-se o sobrenadante. O sedimentado celular obtido foi lavado três vezes com tampão fosfato salino  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $0.29 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.19 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $4.93 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) e ressuspenso num determinado volume de sobrenadante, entretanto filtrado (membrana de nitrato de celulose de  $0.45 \mu\text{m}$ , Gelman Sciences, 66234), por forma a obter-se uma concentração celular final de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  bactérias  $\text{mL}^{-1}$ . A suspensão bacteriana assim obtida era equitativamente dividida por vários frascos *Schott* (Duran),

previamente esterilizados, cada um contendo várias placas metálicas suspensas, constituindo os suportes para a adesão bacteriana.

#### 5.3.1.2 *Aplicação dos biocidas*

A cada um dos frascos, contendo um determinado volume de suspensão bacteriana, foi adicionado um volume de biocida (carbamato ou glutaraldeído) de maneira a obterem-se concentrações finais de 100 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup> e 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato e 50 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído. Um dos frascos foi reservado para controlo e a este não foi adicionado nenhuma quantidade de biocida. Durante todo o período de adesão, os frascos contendo as várias suspensões celulares foram mantidos em agitação (120 m<sup>-1</sup>) a uma temperatura de cerca de 27 °C. Após 1 h e 3 h de contacto com a suspensão celular contendo biocida, uma das placas de cada frasco foi retirada, lavada cuidadosamente com água destilada esterilizada (para eventual remoção de bactérias fracamente aderidas) e preparada para observação no microscópio de epifluorescência.

### 5.3.2 **Ensaio de determinação do potencial zeta**

O efeito da aplicação de biocidas na carga superficial das bactérias *P. fluorescens* foi avaliado pela determinação do potencial zeta, à temperatura ambiente, conforme descrito no sub-capítulo 4.7.3. Possíveis interacções dos biocidas com o material de construção das superfícies de adesão também foram investigadas através da determinação do potencial electrocinético da limalha de aço inox, quando submetida ao contacto com os biocidas em estudo.

Em cada ensaio, e para cada condição testada, foram efectuadas, no mínimo, 20 leituras de potencial zeta.

#### 5.3.2.1 *Preparação das suspensões bacterianas*

As suspensões bacterianas foram obtidas de modo semelhante ao descrito para a investigação da adesão inicial, só que, para esta determinação, o sedimentado celular foi ressuspenso em soluções tampão pH 5, 7 e 9, consoante o pH pretendido, e de maneira a obterem-se suspensões celulares mais concentradas, isto é, com uma concentração celular

final na gama de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  bactérias  $\text{mL}^{-1}$ . A determinação do potencial zeta foi realizada após a adição dos biocidas.

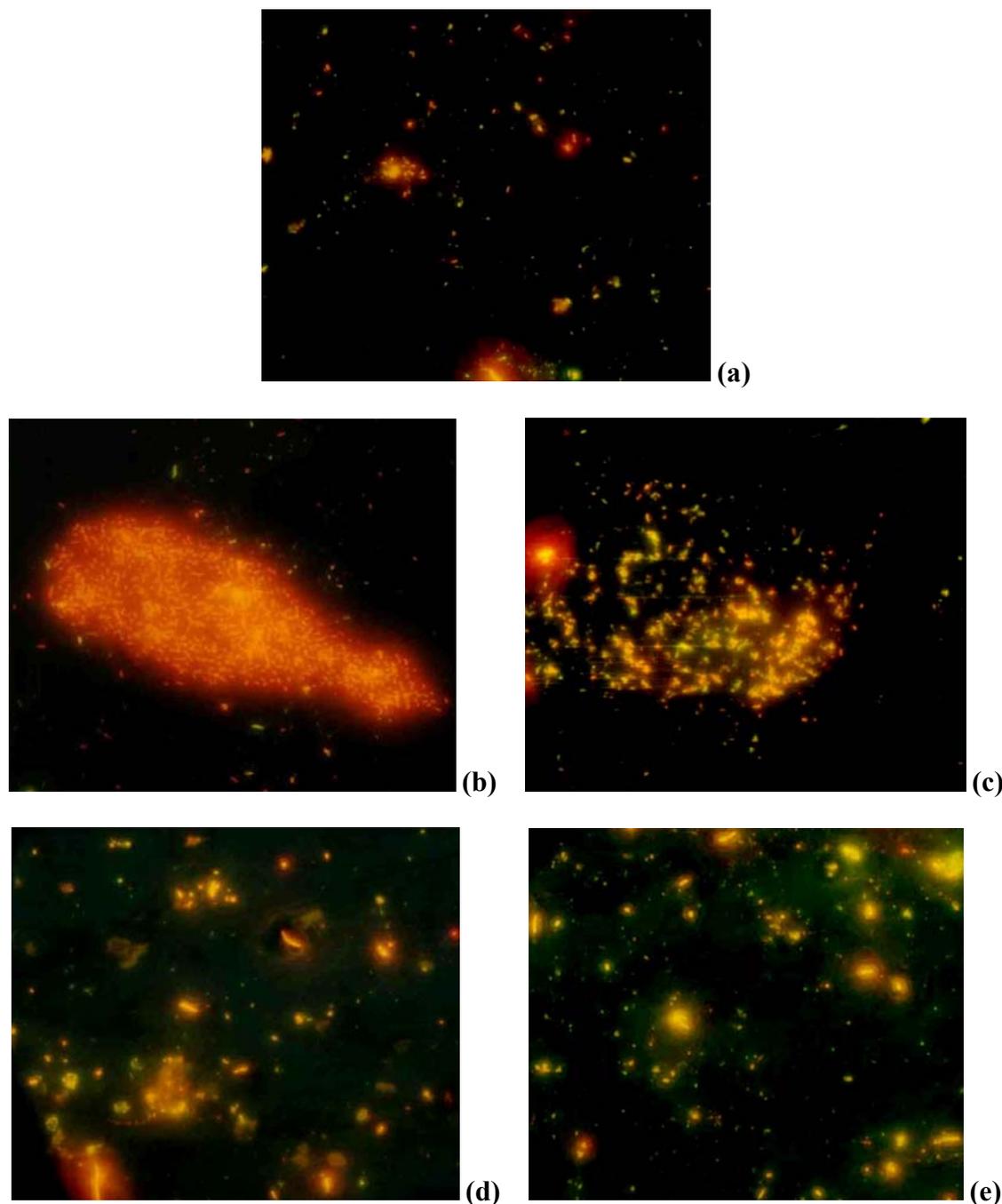
### 5.3.2.2 Obtenção da limalha de aço inox

Para a determinação do potencial electrocinético do aço inox, este foi reduzido a pequenas partículas por limagem com uma lima murça (lima de serrilha fina). Quantidades idênticas desta limalha de aço inox foram distribuídas por vários frascos, aos quais se adicionaram soluções de tampão com diferentes valores de pH.

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 5.1 mostra algumas imagens que ilustram o efeito da aplicação de várias concentrações de carbamato na adesão inicial da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (até 1 h e 3 h) às superfícies de aço inox. O efeito da aplicação de glutaraldeído pode ser observado nas imagens apresentadas na Figura 5.2. Pela observação destas figuras é possível constatar que, na ausência de biocidas (Figuras 5.1a e 5.2a), as bactérias aderem às superfícies metálicas isoladamente e de forma dispersa e aleatória.

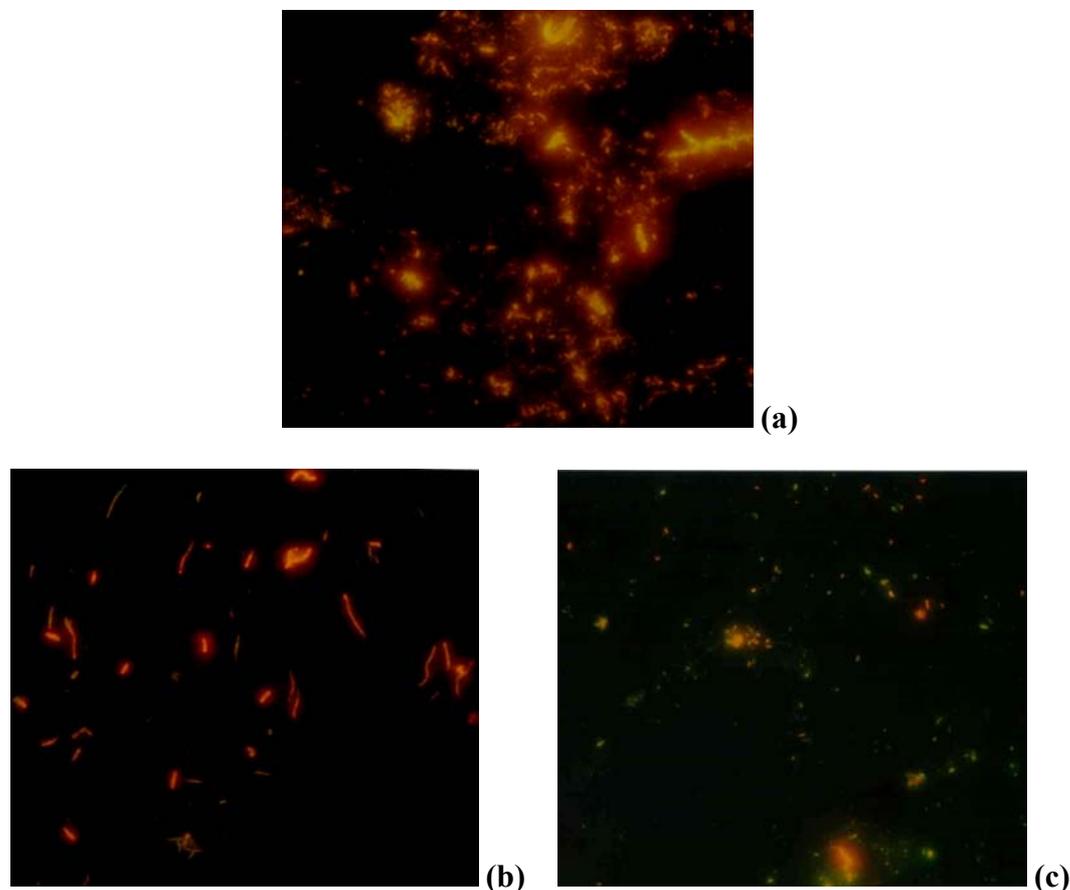
Com a aplicação dos biocidas o perfil de adesão inicial é substancialmente modificado, sendo mais inesperado o obtido com a adição de carbamato. A adição deste biocida, de uma forma global, fomentou uma maior adesão de bactérias à superfície metálica e adicionalmente um comportamento de adesão diferente, isto é, as bactérias aderiram sob a forma de agregados. Com efeito, a aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato à suspensão bacteriana fez com que a grande maioria das bactérias aderisse à superfície metálica preferencialmente sob a forma de agregados, não obstante algumas estarem aderidas de forma dispersa (Figura 5.1b,c). Na presença de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 5.1d) e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato (Figura 5.1e), o padrão de distribuição das bactérias no suporte metálico é similar ao observado na ausência dos biocidas, apesar de ser notório uma maior quantidade de células aderidas e alguns agregados, só que de menor dimensão comparativamente com os observados com a aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato.



**Figura 5.1** Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia de epifluorescência de *P. fluorescens* aderidas ao aço inox: **(a)** 1 h de exposição à suspensão bacteriana sem aplicação de carbamato; **(b)** e **(c)** respectivamente, 1 h e 3 h de exposição à suspensão bacteriana tratada com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato; **(d)** 1 h de exposição à suspensão celular tratada com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato; **(e)** 1 h de exposição à suspensão bacteriana tratada com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato. Ampliação de 400x.

Nos ensaios em que ocorreu a adição de glutaraldeído às suspensões bacterianas, e tal como pode ser observado na Figura 5.2, a adesão inicial de bactérias apresentou sempre um

comportamento similar, isto é, o número de bactérias aderidas diminuiu à medida que se aumentou a concentração de biocida adicionado (Figura 5.2b,c), sendo esta diminuição mais acentuada quando se aplicou  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído (Figura 5.2c).



**Figura 5.2** Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia de epifluorescência de bactérias *P. fluorescens* aderidas ao aço inox, ao fim de 1 h de exposição à suspensão bacteriana: **(a)** sem aplicação de glutaraldeído; **(b)** e **(c)** com aplicação de, respectivamente,  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído. Ampliação de 400x.

Perante os perfis de adesão obtidos, e tendo presente que a adesão inicial de bactérias a superfícies sólidas depende frequentemente das cargas eléctricas das entidades em presença, levanta-se a hipótese das propriedades eléctricas superficiais das bactérias e/ou da superfície de aço inox serem alteradas em presença do carbamato, no sentido de facilitar a adesão bacteriana. Em relação ao glutaraldeído, e dado o comportamento de adesão ser, de certa forma, o previsto, isto é a aplicação do biocida conduziu a uma menor adesão de células, à partida, pode inferir-se que, a haver alterações electrostáticas, estas ocorrem de forma a aumentar a repulsão entre os dois tipos de entidades.

Com o intuito de se obterem informações que corroborassem estas hipóteses efectuou-se a determinação do potencial zeta, quer das bactérias quer do suporte de adesão. Como as cargas eléctricas superficiais variam com o pH (Oliveira, 1992), a determinação do potencial zeta das bactérias *P. fluorescens* e do aço inox foi efectuada a diferentes valores de pH.

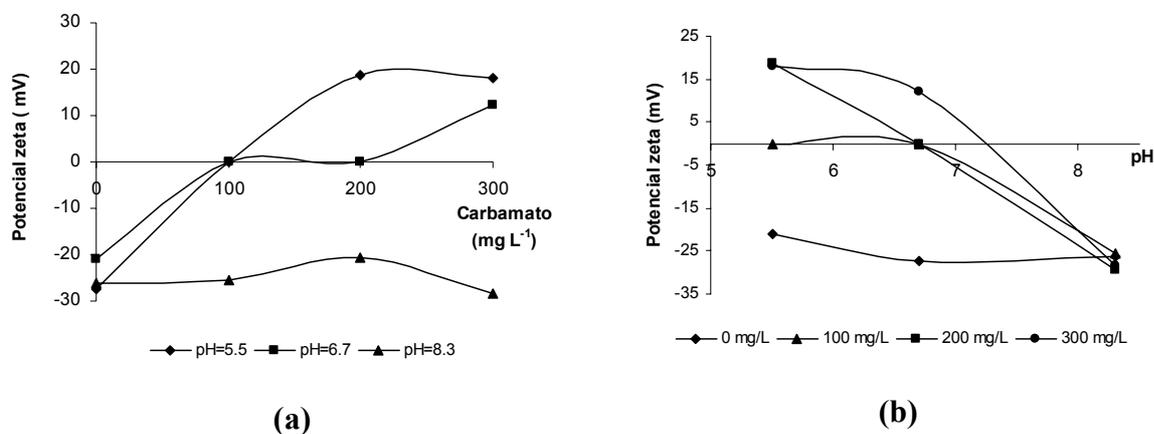
Nas Tabelas 5.1 e 5.2 apresentam-se os valores de potencial zeta das suspensões celulares, com e sem aplicação de carbamato, para vários valores de pH. Estes valores revelam que a bactéria *Pseudomonas fluorescens* apresenta, na gama de pH estudada, uma carga superficial negativa, similar a valores já referenciados na literatura (Pinheiro *et al.*, 1988). A carga superficial de partículas sólidas é devida a vários mecanismos (Hunter, 1988). No entanto, para o caso de microrganismos, esta é adquirida por adsorção de iões ou por ionização de grupos superficiais (Oliveira, 1992). Sendo assim, a carga negativa das bactérias *P. fluorescens* pode ser atribuída aos lipopolissacarídeos (LPS) aniónicos presentes na membrana externa da bactéria, tal como indicado por Bradley e Pritchard (1990) para justificar o potencial zeta negativo da *Desulfovibrio desulfuricans*. As proteínas presentes na superfície bacteriana também podem justificar a carga negativa (Bradley e Gaylarde, 1988).

Pela observação da Tabela 5.1, é possível constatar-se que a aplicação de carbamato às suspensões celulares altera substancialmente a carga superficial das bactérias, sendo esta alteração dependente do valor de pH do meio e da concentração de biocida aplicada. Quando se aplicou 100 mg L<sup>-1</sup> de carbamato às suspensões celulares, o potencial zeta das bactérias *P. fluorescens* apresentou valor nulo até valores de pH próximos de 7, mantendo uma carga eléctrica negativa, semelhante à obtida na ausência de biocida, quando o pH do meio rondava 8.5. Com a aplicação de uma concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, o potencial zeta das bactérias permaneceu negativo para pH 8.3, ainda que num valor ligeiramente inferior ao registado na ausência de carbamato, mas assumiu um valor nulo para pH próximo de 7 e positivo para um valor de 5.9. Aplicando 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, a carga superficial das bactérias assumiu valores positivos para pH 5.9 e 6.7, permanecendo num valor negativo, e idêntico aos obtidos com menores concentrações de biocida, para pH 8.3.

**Tabela 5.1** Efeito da concentração de carbamato e do valor de pH no potencial zeta da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (valores médios  $\pm$  desvio padrão)

Sistema	pH	Potencial zeta (mV)
<i>P. fluorescens</i>	5.5	-20.988 ( $\pm$ 7.156)
	6.7	-27.400 ( $\pm$ 6.906)
	8.3	-26.235 ( $\pm$ 7.906)
<i>P. fluorescens</i> + 100 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	5.4	0
	6.7	0
	8.3	-25.633 ( $\pm$ 5.948)
<i>P. fluorescens</i> + 200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	5.5	18.687 ( $\pm$ 3.103)
	6.9	0
	8.3	-29.547 ( $\pm$ 5.076)
<i>P. fluorescens</i> + 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	5.4	17.905 ( $\pm$ 2.953)
	6.7	12.241 ( $\pm$ 6.093)
	8.3	-28.463 ( $\pm$ 7.156)

Para melhor visualização dos dados reunidos na Tabela 5.1, estes estão representados graficamente na Figura 5.3. Nesta é possível observar a relação existente entre o potencial zeta das bactérias *P. fluorescens*, a concentração de carbamato aplicada (Figura 5.3a) e o valor de pH ensaiado (Figura 5.3b).



**Figura 5.3** Efeito da concentração de carbamato (a) e do pH (b) no potencial zeta da *P. fluorescens*.

Pela observação da Figura 5.3 ou da Tabela 5.1 é possível constatar que, dependendo da concentração de carbamato, o ponto isoeléctrico (potencial para o qual a carga eléctrica superficial da partícula é nula) da bactéria *P. fluorescens* é alcançado para valores de pH próximos de 5.5 e 6.9, afastando-se do valor de pH 3.5, que é referido por Pinheiro *et al.* (1988) como sendo o pH ao qual o ponto isoeléctrico desta bactéria é atingido, só por ajuste de pH. Estas circunstâncias facilitam a aproximação das bactérias, permitindo que as forças atractivas de van der Waals se sobreponham às forças electrostáticas de repulsão, favorecendo-se o fenómeno de agregação das bactérias (Cantrell e LeFevre, 1990).

Com o intuito de verificar se as alterações induzidas, ao nível do potencial zeta das bactérias, pela presença de carbamato nas suspensões celulares, podiam ser dependentes do tempo de contacto das células com o biocida, realizaram-se alguns ensaios de determinação do potencial zeta das bactérias ao longo do tempo. A Tabela 5.2 sumaria os resultados obtidos em duas situações específicas: uma a pH 8.3 e com a aplicação de 100 mg L<sup>-1</sup>, situação em que não foi verificada nenhuma alteração substancial no potencial zeta da *P. fluorescens*; e a segunda a pH 5.5 e com adição de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, situação que originou a mudança do valor de potencial zeta de negativo para positivo.

**Tabela 5.2** Efeito do tempo de contacto com o carbamato no potencial zeta da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (valores médios ± desvio padrão)

Sistema	pH	Tempo (min)	Potencial zeta (mV)
<i>P. fluorescens</i>		5	-24.892 (± 6.281)
+ 100 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	8.3	15	-24.696 (± 4.406)
		25	-25.774 (± 7.156)
<i>P. fluorescens</i>		5	16.721 (± 2.501)
+ 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	5.5	15	17.741 (± 1.759)
		30	18.651 (± 1.591)

Os valores obtidos parecem indicar que o factor tempo de contacto com o biocida não é relevante, uma vez que, em ambas as situações, a acção do biocida manifesta-se

rapidamente, isto é, nos primeiros 5 min de exposição, não se observando nenhuma alteração significativa adicional no restante tempo de duração do ensaio. Face a estes resultados, pode-se salientar que o efeito do biocida carbamato na carga eléctrica superficial das bactérias é mais dependente da concentração do que do tempo de contacto das suspensões com o biocida.

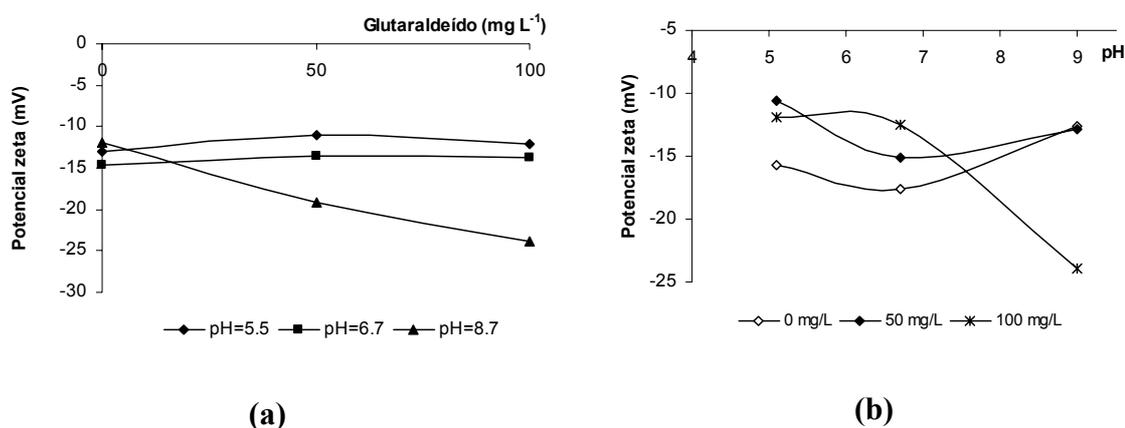
Segundo alguns autores (Hunter e Evans, 1990; Cloete *et al.*, 1994), o modo de acção do carbamato pode ser devido a combinações deste com alguns constituintes celulares, nomeadamente com os grupos tiol ( $\sim\text{SH}$ ) da bactéria. Estas ligações não específicas podem determinar, em parte, a influência do carbamato na carga eléctrica superficial das bactérias *P. fluorescens*, para certos valores de concentração e pH. Com efeito, a alteração da carga eléctrica superficial da *P. fluorescens* pode ser resultado do estabelecimento de ligações entre o carbamato e certas proteínas da parede celular, mais especificamente com os aminoácidos que possuam grupos tiol, como é o caso da cisteína.

A análise da Tabela 5.3 mostra que, com a adição de glutaraldeído, e para as várias condições de pH, os valores de potencial zeta da bactéria *P. fluorescens* não sofrem, de uma maneira geral, alterações significativas. Ainda que o valor numérico sofra algumas oscilações, o sinal da carga eléctrica permanece negativo independentemente da concentração de glutaraldeído e do valor de pH.

**Tabela 5.3** Efeito da concentração de glutaraldeído e do valor de pH no potencial zeta da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (valores médios  $\pm$  desvio padrão)

Sistema	pH	Potencial zeta (mV)
<i>P. fluorescens</i>	5.5	-15.740 ( $\pm$ 5.136)
	6.7	-17.568 ( $\pm$ 6.101)
	9.0	-12.632 ( $\pm$ 6.756)
<i>P. fluorescens</i> + 50 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído	5.3	-10.631 ( $\pm$ 6.821)
	6.7	-15.061 ( $\pm$ 4.980)
	8.7	-12.912 ( $\pm$ 5.702)
<i>P. fluorescens</i> + 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído	5.5	-11.913 ( $\pm$ 4.903)
	6.9	-12.456 ( $\pm$ 3.936)
	8.6	-23.547 ( $\pm$ 6.706)

Pode-se, no entanto, referir que, para valores de pH inferiores a 7, a aplicação de concentrações crescentes de glutaraldeído induz uma ligeira redução, em termos absolutos, no valor de potencial zeta, tornando, conseqüentemente, as bactérias menos negativas. Para um pH próximo de 9, sucede o contrário, isto é, o aumento da concentração de biocida torna as bactérias significativamente mais negativas. Estas variações podem ser mais claramente observadas na Figura 5. 4.



**Figura 5.4** Efeito da concentração de glutaraldeído (a) e do pH (b) no potencial zeta da bactéria *P. fluorescens*.

A influência de ambos os biocidas na carga eléctrica superficial do aço inox foi também avaliada em termos de potencial electrocinético. Na Tabela 5.4 são apresentados os valores de potencial zeta de limalha de aço inox em função do pH, bem como a sua variação face ao contacto da limalha com os biocidas em estudo. Os valores obtidos permitem afirmar que o aço inox apresenta uma carga eléctrica negativa que se acentua com o aumento do pH. O contacto da limalha de aço inox com os biocidas, carbamato e glutaraldeído, repercutiu-se de maneira diferente: embora a carga eléctrica superficial do aço inox mantenha o seu carácter negativo na presença dos biocidas, a maior concentração de carbamato, 300 mg L<sup>-1</sup>, parece tornar o aço inox mais negativo, acontecendo o contrário quando se submete a limalha a 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído. Estas diferenças, contudo, não parecem ser muito significativas, pois estão dentro da ordem de grandeza dos valores de desvio padrão apresentados.

**Tabela 5.4** Efeito dos biocidas e do pH no potencial zeta do aço inox; valores médios  $\pm$  desvio padrão

Sistema	pH	Potencial zeta (mV)
	5.6	-16.901 ( $\pm$ 4.390)
Água destilada +	8.3	-15.211 ( $\pm$ 5.093)
+ Limalha de aço inox	8.9	-24.801 ( $\pm$ 6.614)
	10.9	-35.322 ( $\pm$ 8.937)
Água destilada +		
+ Limalha de aço inox	9.5	-38.104 ( $\pm$ 3.515)
+ 300 mg L <sup>-1</sup> de carbamato		
Água destilada +		
+ Limalha de aço inox	5.7	-11.350 ( $\pm$ 4.218)
+ 100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído		

À luz da teoria DLVO, pode-se dizer que as interações entre as bactérias *P. fluorescens* e a superfície em aço inox são resultado da acção combinada entre as forças atractivas de van der Waals e as forças electrostáticas da dupla camada eléctrica. Não obstante as forças electrostáticas assumirem um carácter repulsivo, devido ao facto de ambas as entidades, na ausência de biocidas, estarem carregadas negativamente (Tabelas 5.1, 5.2 e 5.4), mesmo assim a adesão de bactérias à superfície metálica acontece, tal como pode ser observado na Figura 5.1a e Figura 5.2a. Isto ocorre porque, provavelmente, nestas condições, são as forças atractivas de van der Waals que predominam e controlam o processo de adesão. Esta é uma adesão no mínimo secundário de energia e terá um carácter reversível (Characklis e Cooksey, 1983; Marshall e Blainey, 1990; Bos *et al.*, 1999), isto é, as bactérias poderão ser removidas do suporte pela aplicação de forças de tensão de corte moderadas.

Outras explicações, contudo, podem ser sugeridas para justificar a adesão inicial da *P. fluorescens* ao aço inox, entre as quais, a possibilidade de estabelecimento de pontes poliméricas fomentadas pela atracção entre os polímeros que revestem as bactérias e a

superfície metálica de adesão (van Loosdrecht *et al.*, 1990). A adesão inicial também pode ter sido fomentada pelo facto das bactérias apresentarem na sua superfície apêndices extracelulares, que de certa maneira encurtam a distância entre as células e a superfície, e por consequência diminuem a repulsão entre estes corpos (van Loosdrecht, 1988).

Adicionalmente, sabe-se também que a intensidade das interações de van der Waals é variável de acordo com as entidades envolvidas, uma vez que estas forças compreendem uma componente –constante de Hamaker– que depende da natureza (propriedades físicas e químicas) das partículas interactuantes e do seu tamanho (Hamaker, 1937). Como as bactérias e a superfície metálica têm uma composição química diferente, é de esperar que as constantes de Hamaker para a interação bactéria–bactéria e bactéria–superfície metálica apresentem valores diferentes (Visser, 1972) contribuindo, deste modo, para que as forças de van der Waals estabelecidas em cada interação apresentem valores de diferente intensidade. Este facto parece explicar o perfil de adesão obtido nos ensaios de controlo, isto é, na ausência de biocidas (Figuras 5.1a e Figura 5.2a) e nos ensaios de adição de glutaraldeído. Nestes ensaios as bactérias carregadas negativamente (Tabelas 5.1 e 5.3) aderiram à superfície metálica, também carregada negativamente (Tabela 5.4), porque foram capazes de ultrapassar a barreira de energia devida às interações de carácter repulsivo. A sua distribuição dispersa, sinal da existência de efeitos mútuos de repulsão entre as bactérias, parece dever-se ao desenvolvimento de interações de van der Waals significativamente menos intensas que as estabelecidas entre as bactérias e a superfície metálica.

Nos ensaios de adição de glutaraldeído, o perfil inicial de adesão de bactérias ao aço inox pode ser caracterizado pela diminuição do número de bactérias aderidas com o aumento da concentração de glutaraldeído (Figura 5.2). Novamente, com base na teoria DLVO, e como quer a carga eléctrica das bactérias (Tabela 5.3) quer do aço inox (Tabela 5.4) não é alterada pela presença do biocida, a adesão das bactérias à superfície metálica resulta da prevalência das forças atractivas de van der Waals sobre as interações electrostáticas repulsivas que dificultam a aproximação dos corpos e por consequência o estabelecimento da adesão de bactérias. A diminuição de células aderidas com o aumento da concentração de glutaraldeído justifica-se, em parte, recorrendo ao modo de acção deste biocida. A parede celular das bactérias também é constituída por proteínas, fundamentalmente de transporte, muitas delas possuindo grupos amina livres.

Consequentemente, o glutaraldeído pode rapidamente reagir com estes grupos levando à formação de uma complexa rede de interacções cruzadas entre os grupos aldeído e os grupos amina. Estas interacções na superfície bacteriana podem bloquear o acesso de substâncias ao interior da célula (Walsh *et al.*, 1999), exercendo uma acção análoga à aplicação de uma cola molecular à parede celular (Eagar *et al.*, 1986), impedindo deste modo que a bactéria desempenhe rapidamente a maioria das funções celulares.

O emaranhado de interacções cruzadas na, ou perto da superfície da célula, limita, como anteriormente referido, o desempenho funcional das células microbianas que se poderá reflectir também na adesão das bactérias a superfícies inertes, tais como o aço inox.

A teoria de DLVO parece também explicar os perfis de adesão inicial observados com a aplicação de carbamato às suspensões bacterianas. Na presença de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato e para valores de pH não alcalinos, o ponto isoeléctrico das bactérias é atingido, ou seja a sua carga superficial é nula. Consequentemente, as interacções electrostáticas repulsivas entre as bactérias e entre as bactérias e o suporte metálico deixam de existir, significando que são as forças atractivas de van der Waals a controlar o processo de adesão inicial. Estas considerações fundamentam indubitavelmente a ocorrência e predominância dos agregados bacterianos documentados na Figura 5.1b,c. Quando a concentração de carbamato é aumentada e as bactérias adquirem uma carga eléctrica positiva (Tabela 5.1), permanecendo o aço carregado negativamente (Tabela 5.4), a adesão das células à superfície metálica é favorecida, pois nesta situação os corpos possuem cargas de sinal oposto implicando que as forças electrostáticas se tornem atractivas. Nestas circunstâncias, as bactérias facilmente se aproximam do mínimo primário de energia, obtendo-se uma adesão forte e irreversível (van Loosdrecht, 1988). Claro que o facto das células possuírem carga eléctrica positiva não invalida que alguma repulsão ocorra ente elas, tal como na situação de ausência de biocida, daí ser possível observar-se bastantes células aderidas de forma dispersa (Figura 5.1d,e).

## 5.5 CONCLUSÕES

Em face dos resultados acima expostos é possível concluir que ambos os biocidas interferem com o processo de adesão inicial da bactéria *P. fluorescens* à superfície de aço inox, ainda que de modo distinto.

O carbamato, sob determinadas condições de concentração e pH, altera a carga eléctrica das bactérias para valores nulos ou positivos, favorecendo a sua adesão. Com a sua aplicação foi possível observar-se formação de agregados bacterianos aderidos ao suporte metálico, sendo estes mais evidentes para a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de carbamato e serão consequência da anulação da carga eléctrica superficial das bactérias.

O glutaraldeído, embora não pareça exercer efeito significativo nas propriedades eléctricas superficiais das células, interfere com a sua adesão pois o número de bactérias aderidas é reduzido pela sua aplicação, sendo esta redução mais acentuada para a concentração mais elevada aplicada. As alterações provocadas por ambos os biocidas na carga eléctrica superficial do aço-inox não foram significativas.

Uma análise mais atenta e abrangente dos resultados acima expostos, especialmente os referentes à formação de agregados bacterianos, fez surgir a possibilidade do carbamato, contrariamente ao glutaraldeído, poder ser usado como um agente de agregação microbiana, nomeadamente na indústria do papel, para além da sua utilização clássica como biocida. Neste tipo de indústrias é muito comum recorrer-se a agentes de retenção para promoção da formação de agregados que possam ser retidos pelas telas filtrantes. Esta hipótese foi investigada, sendo objecto de discussão no capítulo seguinte.

## 5.6 BIBLIOGRAFIA

- Bos, R., van der Mei, H. C. e Busscher, J. H. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 179-230.
- Bradley, G. e Pritchard, D. T. 1990. Surface charge characteristics of sulphate-reducing bacteria and the initiation of a biofilm on mild steel surfaces. *Biofouling*, 2, 299-310.
- Bradley, G. e Gaylarde, C. C. 1988. Iron uptake by *D. vulgaris* outer membrane components in artificial vesicles. *Current Microbiology*, 17, 189-192.
- Cantrell, J. A. e LeFevre, 1990. Control of detrimental substances. CPPA Conference, Vancouver, Canada, Abril 1990.
- Characklis, W. G. e Cooksey, K. E. 1983. Biofilms and microbial fouling. *Adv. Appl. Microbiol*, 29, 93-138.
- Cheung, S. C. W. e Breech, I. B. 1996. The use of biocides to control sulphate-reducing bacteria in biofilms on mild steel surfaces. *Biofouling*, 9, 231-249.
- Cloete, T. E., Brözel, V. S., De Bruyn, E. E. e Pietersen, B. 1994. Optimisation of biofouling control in industrial water systems. Water Research Commission Report nº 318/1/94. South Africa.
- Derjaguin, B. V. e Landau, L. 1941. Acta physicochemistry URSS, 14, 633-662. (referido por Oliveira, 1992).

- Eagar, R. G., Leder, J. and Theis, A. B. 1986. Glutaraldehyde: factors important for microbiocidal efficacy. 3rd Conference on Progress in Chemical Disinfection, Binghamton, NY, 3-5 April.
- Hamaker, H. C. 1937. The London – van der Waals attraction between spherical particles. *Physica*, 4, 1058-1072. (referido por Oliveira, 1992).
- Hunter, R. J. 1988. *Zeta Potential in Colloid Science – Principles and Applications*. Academic Press, London.
- Hunter, J. E. e Evans, L. V. 1990. The toxicity of the biocides Zineb, Nabam and their derivatives to the ship-fouling diatom *Amphora coffeaeformis*. *Biofouling*, 2, 267-287.
- Marshall, K. C. 1976. *Interfaces in Microbial Ecology*: Harvard University Press, Cambridge MA.
- Marshall, K. C. e Blainey, B. L. 1990. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: Flemming H-C, Geesey G G. eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg, pp 29-45.
- Oliveira, D. R. 1992. Physico-chemical aspects of adhesion. In: Melo L F, Bott T R, Fletcher M, Capdeville B. eds. *Biofilms-Science and Technology*: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: pp 45-58
- Pinheiro, M. M., Melo, L. F., Bott, T. R., Pinheiro, J. D. e Leitão, L. 1988. Surface phenomena and hydrodynamic effects on the deposition of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Chem. E*, 66, 63-67.
- van der Wal, A., Minor, M., Norde, W., Zehnder, J. B. e Lyklema, J. 1997. Electrokinetic potential of bacterial cells. *Langmuir, the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 13(2), 165-171.
- van Loosdrecht, M. 1988. Bacterial adhesion. PhD thesis, Agriculture University of Wageningen, Wageningen, Netherlands.
- van Loosdrecht, M., Norde, W., Lyklema, J. e Zehnder, A. 1990. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences*, 52, 103-114.
- Verwey, E. J. e Overbeek, J. 1948. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier, Amsterdam.
- Visser, J. 1972. On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz-Van der Waals constants. *Advances in Colloid and Interface*, 3, 331-363.
- Walsh, S. E., Maillard, J.-Y., Simons, C. e Russel, A. D. 1999. Studies on the mechanisms of the antibacterial action of ortho-phthaldehyde. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 702-710.
- Walsh, S. E., Maillard, J.-Y. e Russel, A. D. 1999. Ortho-phthaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 1039-1046.

## 6. ENSAIOS DE RETENÇÃO DE *P. fluorescens* EM FIBRAS DE CELULOSE

---

### Sumário

Neste capítulo averigua-se a possibilidade do carbamato poder ser utilizado como um ajudante de retenção, para além do seu uso convencional como biocida, nas indústrias de pasta e papel. A capacidade, apresentada pelo biocida, de modificação da carga eléctrica superficial da *Pseudomonas fluorescens* foi o principal factor que induziu esta possibilidade.

6.1 Introdução	106
6.2 Objectivos	107
6.3 Metodologia experimental	107
6.4 Resultados e Discussão	110
6.5 Conclusões	115
6.6 Bibliografia	116

---

## 6.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as pressões de mercado e da sociedade em geral obrigaram, de modo incisivo, os produtores de papel a adoptar novas estratégias produtivas no sentido de se reduzir os custos de produção e da carga poluidora dos efluentes e simultaneamente melhorar a qualidade e a quantidade do papel produzido (Bihani, 1996). Tais estratégias englobaram, entre outras medidas, a utilização de fibra secundária, o aumento do pH das suspensões fibrosas e o encerramento parcial ou total dos circuitos de água (Auhorn, 1983; Cantrell e LeFevre, 1989). Paralelamente, a implementação destas estratégias fez emergir outros problemas geralmente associados aos elevados níveis de substâncias prejudiciais que passaram a existir nas várias correntes líquidas (Cantrell e LeFevre, 1989). O termo “substância prejudicial” é vulgarmente usado para identificar uma grande variedade de substâncias dissolvidas ou coloidais, nas quais os microrganismos se incluem, que afectam negativamente o processo de produção e a qualidade do papel, pois podem depositar-se nos equipamentos originando sujamento com todas as suas consequências negativas, interferir com outros aditivos da suspensão fibrosa e serem responsáveis pelo aparecimento na folha de papel de certos defeitos tais como buracos e sujidades.

Para combater estes problemas diversas estratégias de controlo têm vindo a ser implementadas (Cantrell e LeFevre, 1989). Todavia, a opção por programas adequados de retenção de partículas sólidas, em particular da retenção de finos, na teia filtrante e na suspensão fibrosa, tem revelado ser uma das estratégias mais efectivas na remoção das substâncias indesejáveis (Robertson, 1995)

Na indústria da pasta e do papel, mais especificamente nos circuitos de água da máquina de papel, define-se retenção como sendo um processo de filtração em que as partículas em suspensão são retidas pela teia filtrante e pela camada de fibras que entretanto se vai formando sobre esta. Neste contexto, um agente de retenção é tradicionalmente referenciado como sendo uma substância que, quando adicionada a uma suspensão fibrosa, influencia os processos de coagulação-floculação (Beleza, 1991). Este efeito engloba, geralmente, a desestabilização de colóides (coagulação) e a promoção da sua agregação (floculação) com conseqüente aumento do tamanho das partículas em suspensão, favorecendo o processo de retenção.

O processo de retenção pode reger-se por dois mecanismos distintos: retenção mecânica e retenção quimicamente assistida, sendo que a predominância de um ou outro mecanismo depende essencialmente do tamanho das partículas em causa. De uma maneira geral, as partículas de maior dimensão serão retidas mecanicamente nos interstícios da folha que se está a formar, enquanto que a retenção de colóides dependerá da implementação de processos físico-químicos baseados nos mecanismos de coagulação-floculação (Britt e Unbehend, 1976).

A determinação dos índices de retenção são de suma importância pois são uma medida da eficiência do processo de formação da folha de papel. Índices elevados de retenção são geralmente sinónimo de aumento da produção, melhoria da qualidade do papel produzido, redução efectiva dos custos de operação e redução da carga poluidora do efluente fabril.

## 6.2 OBJECTIVOS

Face às alterações induzidas pelo carbamato na carga eléctrica superficial de *P. fluorescens*, tentou-se, com estes ensaios, investigar a praticabilidade do carbamato poder favorecer o processo de retenção das bactérias na teia filtrante e na camada de fibras de celulose que entretanto se vai formando sobre ela, e, conseqüentemente, avaliar a possibilidade deste poder ser equiparado aos convencionais agentes de retenção amplamente usados nas indústrias de pasta e papel.

## 6.3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

A possibilidade de utilização do carbamato como um agente de retenção, isto é, como um agente capaz de agregar colóides, neste caso bactérias *P. fluorescens*, nos circuitos de água das indústrias de pasta e papel, foi avaliada em termos de retenção bacteriana nas fibras celulósicas. Para a execução destes ensaios tentou-se simular, em laboratório, o processo industrial de fabrico de pasta de papel de maneira a ser possível sujeitar suspensões de pasta de papel, previamente inoculadas com *P. fluorescens*, ao contacto com diferentes concentrações de carbamato. A retenção foi determinada quantificando a concentração em biomassa bacteriana nas suspensões fibrosas, antes e após estas terem sido

sujeitas a filtração através de uma tela filtrante de malha similar à da teia filtrante de máquinas de papel.

### 6.3.1 Preparação das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas foram obtidas de modo semelhante ao descrito no Sub-capítulo 5.3.1.1, só que para estes ensaios, o sedimentado celular era ressuspenso em água destilada esterilizada.

### 6.3.2 Obtenção das suspensões de pasta de celulose

As suspensões de celulose foram obtidas por mistura gradual e homogeneização de fibras de celulose com água destilada esterilizada, recorrendo a um misturador triturador (vulgo varinha mágica), de modo a conseguir-se uma concentração final de  $6 \text{ g L}^{-1}$  em fibra celulósica. As fibras de celulose foram obtidas dividindo finamente folhas de pasta de papel bisufito com o auxílio de uma picadora de cozinha.

### 6.3.3 Ensaios de retenção

A suspensão fibrosa foi inoculada com a cultura bacteriana *de P. fluorescens*, de maneira a obter-se uma concentração final de bactérias compreendida entre  $1 \times 10^8$  e  $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Com a opção por esta gama de valores tentou-se reproduzir as concentrações microbianas habitualmente encontradas nos circuitos de água das indústrias de produção de pasta e papel (Williams e Shaw, 1991). Esta suspensão foi posteriormente dividida equitativamente por vários recipientes de vidro (1 L de volume útil) e mantida em agitação ( $120 \text{ min}^{-1}$ ) por agitadores com impulsores tipo pá.

Após aproximadamente 30 min (o tempo arbitrado como necessário para promover a adaptação das bactérias à suspensão fibrosa), a cada um dos recipientes foi adicionado um determinado volume de carbamato de maneira a se obterem concentrações finais de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  do agente biocida. Um dos recipientes foi reservado para controlo e a este não foi adicionado biocida. Imediatamente antes da adição de carbamato, foram recolhidas amostras representativas de cada um dos recipientes que após filtração foram guardadas para posterior caracterização. Periodicamente, isto é, ao fim de 5 min, 15 min, 30 min e 90 min de contacto com o biocida, o conteúdo de cada um dos

recipientes (suspensão de fibras inoculada com bactérias) foi filtrado através de um filtro-tela de 200 mesh tendo-se reservado o filtrado para posterior avaliação. As amostras recolhidas antes da adição de carbamato foram também sujeitas a filtração através da tela filtrante.

A opção pelo filtro-tela utilizado baseou-se nas características das teias de filtração das máquinas de papel. Estas, de uma forma geral, apresentam malhas de 200 mesh (<76 µm) de modo a impedir que as fibras celulósicas, de tamanho à volta de 200 µm a 300 µm, passem através da teia e contribuam para o aumento da fracção de fibras rejeitadas. As bactérias, de tamanho significativamente inferior às fibras de celulose (<2 µm), enquanto entidades isoladas, facilmente passam através dos poros da tela filtrante.

#### 6.3.4 Medição da retenção microbiana

Todas as amostras recolhidas, antes e após os vários tempos de contacto com o biocida foram caracterizadas em termos de proteínas totais, como uma medida indirecta da concentração de biomassa celular, de acordo com o método descrito no Sub-capítulo 4.7.1.3. Estes valores foram usados para calcular a percentagem de retenção de bactérias nas fibras celulósicas, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Retenção celular} = \frac{PROT_{\text{suspensão}} - PROT_{\text{filtrado}}}{PROT_{\text{suspensão}}} \times 100 \quad (6.1)$$

em que  $PROT_{\text{suspensão}}$  representa a concentração em proteína da suspensão fibrosa inoculada com as bactérias e  $PROT_{\text{filtrado}}$  representa o mesmo parâmetro mas determinado no filtrado resultante da filtração da suspensão de fibras através do filtro-tela.

Como um dos objectivos deste estudo era verificar se a adição de carbamato promovia a formação de agregados bacterianos, optou-se por quantificar a biomassa em termos de proteínas totais em detrimento do método convencional de contagem celular em placa (mais usual na determinação da carga microbiana dos circuitos de água das indústrias de pasta e papel) pois este sobrestimaria os resultados, uma vez que um agregado celular seria contabilizado como uma unidade formadora de colónias tal qual uma célula isolada.

## 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do carbamato na retenção de bactérias *P. fluorescens* está sumariado nas Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3, nomeadamente para 100 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup> e 300 mg L<sup>-1</sup> do agente biocida. Pela observação destas tabelas é possível afirmar-se que os valores de retenção aumentam com o aumento da concentração de carbamato aplicada. Pode constatar-se ainda que nos vários ensaios de controlo não é perceptível nenhuma retenção significativa.

**Tabela 6.1** Valores de retenção obtidos nos ensaios com suspensões de pasta de papel na presença de 100 mg L<sup>-1</sup> de carbamato; valores médios ± desvio padrão

Tempo de contacto com o carbamato (min)	Proteína (mg L <sup>-1</sup> )				
	Controlo	Recipiente 1	Recipiente 2	Recipiente 3	Recipiente 4
0	70.082 (±0.795)	71.284 (±6.256)	70.964 (±3.750)	72.897 (±1.486)	67.421 (±2.053)
5	67.684 (±2.251)	40.266 (±0.626)			
15	77.534 (±9.732)		33.681 (±0.205)		
30	73.301 (±1.372)			36.155 (±2.271)	
90	69.270 (±2.003)				43.321 (±0.716)
<b>Retenção (%)</b>	-	43.5 (±0.158)	52.5 (±0.013)	50.4 (±0.133)	35.7 (±0.054)

**Tabela 6.2** Valores de retenção obtidos nos ensaios com suspensões de pasta de papel na presença de 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato; valores médios ± desvio padrão

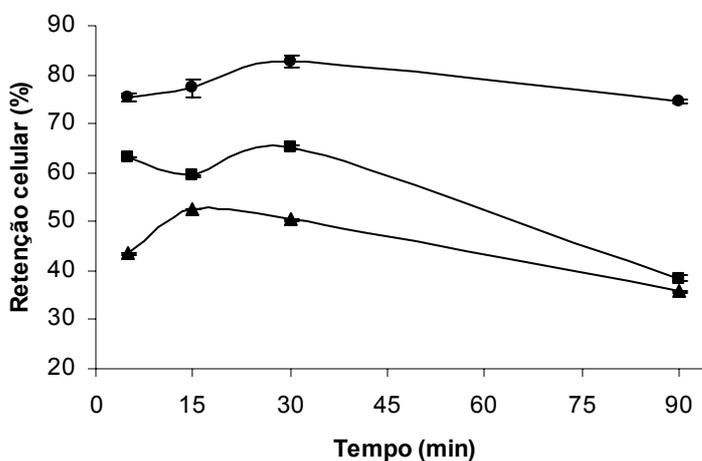
Tempo de contacto com o carbamato (min)	Proteína (mg L <sup>-1</sup> )				
	Controlo	Recipiente 1	Recipiente 2	Recipiente 3	Recipiente 4
0	72.493 (±1.141)	65.225 (±1.230)	63.333 (±4.114)	66.096 (±2.917)	69.321 (±2.073)
5	71.606 (±3.301)	24.083 (±0.800)			
15	65.621 (±2.686)		25.785 (±0.804)		
30	69.200 (±0.339)			23.093 (±3.194)	
90	70.542 (±2.039)				42.598 (±0.205)
<b>Retenção (%)</b>	-	63.1 (±0.011)	59.3 (±0.177)	65.1 (±0.416)	38.5 (±0.049)

**Tabela 6.3** Valores de retenção obtidos nos ensaios com suspensões de pasta de papel na presença de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato; valores médios ± desvio padrão

Tempo de contacto com o carbamato (min)	Proteína (mg L <sup>-1</sup> )				
	Controlo	Recipiente 1	Recipiente 2	Recipiente 3	Recipiente 4
0	62.548 (±2.995)	69.940 (±3.738)	70.963 (±3.977)	68.641 (±4.741)	69.094 (±1.850)
5	69.360 (±1.471)	17.140 (±3.441)			
15	66.889 (±6.515)		16.167 (±6.572)		
30	73.625 (±2.978)			11.958 (±2.330)	
90	68.248 (±1.879)				17.546 (±1.265)
<b>Retenção (%)</b>	-	75.5 (±0.848)	77.2 (±1.801)	65.1 (±0.416)	74.6 (±0.303)

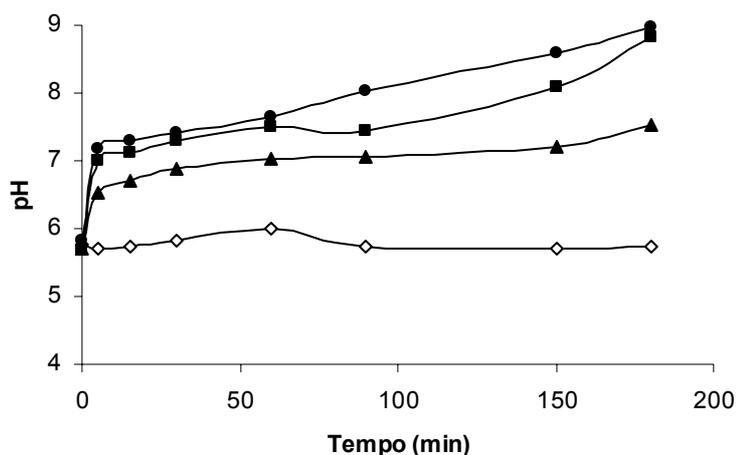
A evolução da retenção com o tempo de contacto da suspensão de pasta com as várias concentrações de biocida pode ser mais claramente observada na Figura 6.1. Para todas as concentrações ensaiadas verifica-se que os valores de retenção apresentam uma tendência, de um modo geral, crescente para tempos de contacto até 30 min, decrescendo para tempos

superiores. No entanto, os maiores valores de retenção são sempre obtidos com a aplicação de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, decrescendo, respectivamente, para valores de 200 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 6.1** Efeito da concentração de carbamato na retenção celular ao longo do tempo. (▲) 100 mg L<sup>-1</sup> carbamato, (■) 200 mg L<sup>-1</sup> carbamato, (●) 300 mg L<sup>-1</sup> carbamato.

Sabendo-se do papel fundamental que o pH desempenha no modo de acção do carbamato, nomeadamente no modo como interfere com a carga superficial das bactérias, o pH das várias suspensões de pasta de papel, na ausência e na presença de biocida, foi monitorizado ao longo do tempo (Figura 6.2). Os perfis de pH revelam que, na presença de carbamato, o pH das suspensões aumenta gradualmente com o aumento do tempo de contacto com o biocida, registando-se, todavia, maior acréscimo nos primeiros 5 min de exposição. As oscilações de pH observadas no ensaio de controlo não são significativas, principalmente quando comparadas com as variações registadas nos ensaios com adição de carbamato.



**Figura 6.2** Efeito da concentração de carbamato no pH das suspensões de pasta celulósica ao longo do tempo. (◇) controlo, (▲)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  carbamato, (■)  $200 \text{ mg L}^{-1}$  carbamato, (●)  $300 \text{ mg L}^{-1}$  carbamato.

O aumento gradual do pH das suspensões de pasta de papel, para valores directamente dependentes da concentração de biocida aplicada, pensa-se ser, nos primeiros 5 min, resultado do equilíbrio ácido-base estabelecido devido à adição de uma solução de pH mais elevado, como é o caso, da solução de carbamato (sub-capítulo 4.3). No entanto, o contínuo aumento de pH, para tempos superiores a 5 min, indicia que, para além do equilíbrio ácido-base, outro tipo de reacção parece ocorrer entre as fibras e os constituintes do carbamato.

A caracterização da carga superficial das bactérias em função do pH e na presença de várias concentrações de carbamato, apresentada no capítulo anterior (Tabela 5.1), conjuntamente com os perfis de pH registados nas suspensões de pasta (Figura 6.2) são contributos importantes para a interpretação dos resultados de retenção apresentados nas Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3.

Com a aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato, os valores de retenção alcançados ao fim de 5 min ou ao fim de 90 min são similares (Tabela 6.1), sendo, durante este período de tempo, o valor de pH da suspensão fibrosa inferior a pH 7 (Figura 6.2). Nestas circunstâncias, as bactérias atingem o seu ponto isoeléctrico (Tabela 5.1), as interacções electrostáticas entre as células e as fibras deixam de se manifestar, e, conseqüentemente, a agregação de bactérias é promovida. Os aglomerados bacterianos tenderiam a aumentar

gradualmente de tamanho, podendo ser retidos pela tela filtrante favorecendo-se então o processo de retenção celular.

Com a aplicação de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato, e após 5 min de contacto, o pH da suspensão fibrosa é próximo de 7 (Figura 6.2). As bactérias apresentam, nestas condições, carga superficial neutra (Tabela 5.1), ocorrendo então agregação bacteriana e consequente retenção dos agregados no filtro tela. Após 90 min de contacto com o biocida, o pH da suspensão atinge um valor à volta de 7.5 e as bactérias readquirem a carga negativa. Nestas circunstâncias, reincidem as interações electrostáticas repulsivas entre as próprias bactérias e entre as bactérias e as fibras celulósicas, diminuindo a retenção (Tabela 6.2).

Com a adição de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de biocida, o pH das suspensões de pasta é inferior a pH 7.5, para períodos de contacto ao carbamato inferiores a 60 min (Figura 6.2), as bactérias estão carregadas positivamente (Tabela 5.1) e, por consequência, as forças electrostáticas de atracção entre as células e as fibras celulósicas predominam. Refira-se que as fibras celulósicas, quando mergulhadas numa solução aquosa, adquirem carga negativa (Gama *et al.*, 1997). Nestas circunstâncias, a adesão de células às fibras de celulose é promovida, favorecendo-se novamente o fenómeno de retenção celular (Tabela 6.3). Para tempos de contacto com o biocida superiores a 60 min, o pH da suspensão de papel aumenta para um valor próximo de 8.5 e, consequentemente, as bactérias voltam a estar carregadas negativamente. Nesta situação, a adesão entre bactérias e entre as bactérias e as fibras é prejudicada desfavorecendo-se o processo de retenção, tal como os resultados indicam (Tabela 6.3).

À luz dos resultados obtidos, e nas condições de ensaio implementadas, a retenção celular verificada pode ser caracterizada como sendo essencialmente uma retenção quimicamente assistida, na qual o carbamato parece assumir o papel de ajudante de retenção funcionando como o agente de desestabilização das bactérias, através da neutralização da carga eléctrica, e como o agente de promoção de formação de agregados. A retenção mecânica, mais vocacionada para partículas de maior dimensão, parece não ter expressão nos valores de retenção de bactérias nas fibras celulósicas, pois a existir teria que manifestar-se também nos ensaios de controlo e nestes a retenção não assume valores significativos.

Em geral, numa suspensão fibrosa real predominam as partículas coloidais de carga negativa (Brouwer, 1991), sendo as forças electrostáticas de repulsão responsáveis pela dispersão das partículas na suspensão de pasta facilitando-se assim a sua passagem através da camada fibrosa e teia filtrante na formação da folha de papel. A celulose, principal constituinte da pasta de papel, quando introduzida numa solução aquosa adquire carga negativa devido à adsorção de iões específicos da solução e à ionização dos grupos carboxilo da superfície da fibra celulósica (Gama *et al.*, 1997). As bactérias, tal como referido anteriormente, apresentam também carga eléctrica superficial negativa, pelo que, em condições normais, a agregação entre bactérias e entre bactérias e fibras celulósicas não é favorecida.

Perante estes resultados facilmente se depreende que o carbamato, em certas condições de concentração e pH, potencia a formação de aglomerados bacterianos e/ou agregados bactérias-fibra celulósica que podem ser retidos pela camada fibrosa + tela filtrante. Os microrganismos assim retidos passam a incorporar a folha de papel sem prejuízo da qualidade da mesma, pois são removidos da fase líquida antes de se constituírem em depósitos biológicos, e por consequência, antes de excretarem polímeros, e exercerem efeitos nefastos quer no processo produtivo quer na qualidade do produto final. Simultaneamente, contribui-se para a redução da concentração microbiana em suspensão nos circuitos de água da máquina de papel.

## 6.5 CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos é possível concluir-se que a presença de carbamato nas suspensões de pasta de papel desempenha um papel preponderante na retenção de bactérias pelas fibras celulósicas, uma vez que a concentração celular das suspensões foi reduzida quando estas foram tratadas com diferentes concentrações de biocida e posteriormente filtradas através de um filtro-tela de 200 mesh.

A adição de carbamato originou índices de retenção celular bastante expressivos, na ordem de 45 % a 75 %, em menos de 5 min de contacto com o biocida, podendo estes valores ser sinónimo da formação de agregados célula-célula e célula-fibra celulósica. Os perfis de pH das suspensões fibrosas conjuntamente com os resultados referentes às

alterações de carga eléctrica das bactérias, na presença de carbamato, constituem factores capitais na interpretação dos resultados obtidos.

O carbamato provou assim ter, para além do seu efeito biocida, potencialidades que o assemelham aos convencionais agentes de retenção vulgarmente utilizados na indústria do papel. Este resultado faz ressurgir a possibilidade dos tradicionais agentes de retenção poderem também ser usados como agentes de controlo dos efeitos nefastos da presença microbiana nos circuitos de água, sem os inconvenientes ambientais dos biocidas.

## 6.6 BIBLIOGRAFIA

- Beleza, V. M. 1991. Inovações na aplicação de ajudantes de retenção na fabricação de papel. XII Encontro Nacional da Tecnicelpa, Setúbal.
- Bihani, B. G. 1996. Goal of closed-cycle operation hinges on fiberline developments. *Pulp and Paper Magazine*, 23-26 July 1996.
- Britt, K. W. e Unbehend, J. E. 1976. New methods for monitoring retention. *TAPPI*, 59(2), 67-70.
- Brouwer, P. H. 1991. The relationship between zeta potential and ionic demand and how it affects wet-end retention. *TAPPI Journal*, 170-179.
- Cantrell, J. A. e LeFevre, G. 1989. Control of detrimental substances. Western Section CPPA Conference, Vancouver, Canada, Abril 1989
- Gama, F. M., Carvalho, M. G., Figueiredo, M. M. e Mota, M. 1997. Comparative study of cellulose fragmentation by enzymes and ultrasound. *Enzyme and Microbial Technology*, 20,12-17.
- Robertson, L. R. 1995. Impact of water reuse on microbial colonization of paper machines. TAPPI Papermakers Conference, Abril 23-26, Chicago, Illinois.
- Williams, T. M. e Shaw, D. A. 1991. Methods for evaluating pulp and paper slimicides: a review. In: Rossmore. ed. *Biodeterioration and Biodegradation 8*. Elsevier Applied Science, England, 367-368.

## 7. ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA DE *P. fluorescens* EM SUSPENSÃO: EFEITO DOS BIOCIDAS E DAS PARTÍCULAS DE CAULINO

---

### Sumário

O uso de biocidas no controlo microbiano dos circuitos de água é uma prática corrente, mas que deve ser sempre considerada com ponderação, principalmente no que respeita à concentração mais adequada de biocida a aplicar e ao tempo de exposição dos microrganismos ao agente antimicrobiano.

Este capítulo avalia o efeito de dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, na actividade respiratória de suspensões bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*, em função da concentração de biocida aplicado, do tempo de contacto das bactérias com o biocida e do valor de pH do meio.

Também se inclui neste capítulo o estudo que visou investigar se a presença de partículas inorgânicas, caulino, nas suspensões bacterianas interferia com o desempenho antimicrobiano dos biocidas. Simultaneamente, também foi avaliada a possibilidade das partículas de caulino interferirem com a actividade respiratória das bactérias e, por consequência, dissimular a eficiência dos biocidas.

7.1 Efeito dos biocidas na actividade da <i>P. fluorescens</i>	118
7.2 Efeito do caulino na eficiência dos biocidas	127
7.2.4 Efeito do caulino na actividade respiratória de <i>P. fluorescens</i>	132
7.2.5 Efeito do caulino no desempenho dos biocidas	138
7.3 Conclusões	147
7.4 Bibliografia	149

---

## 7.1 EFEITO DOS BIOCIDAS NA ACTIVIDADE DA BACTÉRIA *P. fluorescens*

### 7.1.1 Introdução

Um programa de controlo microbiano, quer dos microrganismos em suspensão quer dos constituídos em biofilme, apoiado na utilização de substâncias antimicrobianas, requer o conhecimento prévio da intensidade de interferência dessas substâncias com a viabilidade celular. Intrinsecamente, a concentração de biocida mais adequada a adicionar aos sistemas e o tempo de exposição dos microrganismos com os biocidas são parâmetros que devem ser cuidadosamente seleccionados para o correcto planeamento do programa de controlo (Cloete *et al.*, 1994; Holah *et al.*, 1998). Tempos de contacto insuficientes e concentrações inadequadas podem originar o aparecimento de microrganismos resistentes aos biocidas (Heinzel, 1998; Gaylarde e Morton, 1999). Esta situação, que por vezes é ignorada, pode contribuir para a proliferação de microrganismos nos sistemas aquosos e para a persistência de biofilmes indesejáveis.

Uma das primeiras etapas de prevenção da formação de biofilmes passa por controlar a concentração microbiana presente nos circuitos de água. Reduzir a concentração de microrganismos para níveis aceitáveis, reduz, logo à partida, o número de bactérias disponíveis para adesão a superfícies sólidas e consequente formação de biofilmes. Deve ser, novamente, reiterado que a presença de microrganismos nos circuitos de água é praticamente inevitável e que eliminar todos os microrganismos é tarefa quase inexecutável, pelo que o objectivo primordial passa por controlar, ou mesmo impedir, o crescimento e a actividade metabólica dos microrganismos (Lutey, 1995).

A eficácia de biocidas no controlo das populações microbianas em suspensão numa corrente líquida ou no controlo da formação de biofilmes indesejáveis tem vindo, tradicionalmente, a ser medida com base no método de contagem de colónias em placa de Petri contendo meio de crescimento em agar. Este método apresenta alguns inconvenientes pois, para além de ser um método relativamente lento, a capacidade das bactérias poderem crescer num determinado meio de crescimento com agar pode não reflectir a sua actividade ou viabilidade no ambiente de onde foram removidas (McFeters *et al.*, 1995). Com efeito, os microrganismos expostos a biocidas podem perder a capacidade de formação de colónias em placa de agar, continuando, no entanto, a exhibir actividade respiratória significativa

(Stewart *et al.*, 1994). Deste modo, ao subestimar as populações bacterianas expostas ao biocida, o potencial antimicrobiano dos biocidas é erradamente sobreavaliado. Estas constatações fazem com que cada vez mais se recorra a outros métodos alternativos de avaliação da eficácia dos biocidas, tais como: bioluminescência (Walter *et al.*, 1992; Dhir e Dodd, 1995), marcadores fisiológicos fluorescentes (Yu e McFeters, 1994; Holah *et al.*, 1998), contagem directa de células viáveis (Srinivasan *et al.*, 1995), actividade respiratória (Tashiro *et al.*, 1991).

A determinação da actividade respiratória específica como forma de avaliar a eficácia de biocidas tem a vantagem de ser um processo mais rápido (este teste completa-se em menos de 2h), principalmente quando comparado com os tradicionais testes de cultura celular em placa, pois estes geralmente requerem, no mínimo 24 h de incubação.

### **7.1.2 Objectivos do trabalho**

Pretendeu-se, com estes ensaios, conhecer a acção de ambos os biocidas na viabilidade celular de culturas em suspensão de bactérias *P. fluorescens*. A dependência dessa acção relativamente à concentração de biocida aplicada, ao tempo de contacto com o biocida e ao valor de pH do meio foi também testada.

### **7.1.3 Metodologia experimental**

O efeito dos biocidas na viabilidade celular foi avaliado pela determinação da actividade respiratória específica de bactérias *P. fluorescens*, quando cultivadas em suspensão, antes e após a adição das várias concentrações de biocida e para diferentes tempos de contacto. A actividade respiratória específica foi quantificada através da determinação da taxa de consumo de oxigénio necessário para a degradação microbiana de glicose em solução.

Tendo presente que o desempenho de ambos os biocidas é influenciado pelo valor de pH do meio, a actividade respiratória das bactérias foi também avaliada em função do pH.

#### *7.1.3.1 Preparação das suspensões bacterianas*

As suspensões bacterianas foram obtidas de maneira similar ao descrito para os ensaios de adesão inicial e de determinação do potencial electrocinético da bactéria. O sedimentado

celular, obtido por centrifugação (3800 g, 10 min) de um determinado volume de cultura bacteriana de *P. fluorescens*, foi lavado três vezes com tampão fosfato salino  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $0.29 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.19 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $4.93 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) e ressuspendido em igual volume de uma das soluções tampão de pH 5, 7 ou 9 (Sub-capítulo 4.1.3), de acordo com o pH que se pretendia implementar. Obtiveram-se, assim, suspensões bacterianas com pH definido, que foram equitativamente divididas por vários frascos *Schott* (Duran), previamente esterilizados.

#### 7.1.3.2 *Aplicação dos biocidas*

A cada um dos frascos contendo um determinado volume de suspensão bacteriana foi adicionado um determinado volume de biocida por forma a conseguirem-se concentrações finais de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído. Alguns frascos, representativos de cada uma das suspensões bacterianas a diferente valor de pH, foram reservados para controlo e a estes não foi adicionado biocida.

Durante todo o ensaio, os frascos contendo as várias suspensões celulares foram mantidos em agitação ( $120 \text{ min}^{-1}$ ) a uma temperatura aproximada de  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ . Imediatamente após a adição (5 min a 6 min) e decorrido 1 h, 3 h e 7 h de contacto com cada uma das concentrações de cada biocida, de cada um dos frascos, incluindo dos frascos de controlo, foi retirado um determinado volume de suspensão bacteriana a fim de se avaliar a actividade respiratória específica das bactérias.

#### 7.1.3.3 *Determinação das taxas de consumo de oxigénio*

As bactérias de cada uma das amostras de várias suspensões celulares, tratadas com os biocidas, foram recolhidas por centrifugação (5 min), lavadas com tampão fosfato salino, e ressuspendidas em 10 mL de solução tampão de pH idêntico ao da suspensão celular inicial. Estas novas suspensões celulares, agora isentas de biocida, foram transferidas para as câmaras de reacção do respirómetro, devidamente termostatizadas a  $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , a fim de se avaliar a actividade respiratória das células de acordo com o método referenciado no Sub-capítulo 4.7.4. Após a obtenção da curva correspondente à respiração endógena, foi injectado em cada uma das câmaras do respirómetro  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de uma solução de glicose de concentração  $50 \text{ mg L}^{-1}$  para determinação da taxa de respiração total. Findo o ensaio de

respirometria, o conteúdo de cada câmara de reacção foi recolhido e reservado para posterior quantificação da biomassa celular. Todos os ensaios de foram efectuados em duplicado.

#### 7.1.3.4 Determinação da biomassa celular

A biomassa bacteriana foi quantificada pela determinação da concentração de proteína total seguindo o método modificado de Lowry, descrito no Capítulo 4.

#### 7.1.3.5 Avaliação da redução da actividade

O efeito dos biocidas na actividade respiratória específica das bactérias *P. fluorescens* foi avaliado quantitativamente em termos de redução da actividade respiratória, tendo por referência a actividade obtida, para cada intervalo de tempo, nos ensaios de controlo. Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados com base na seguinte equação:

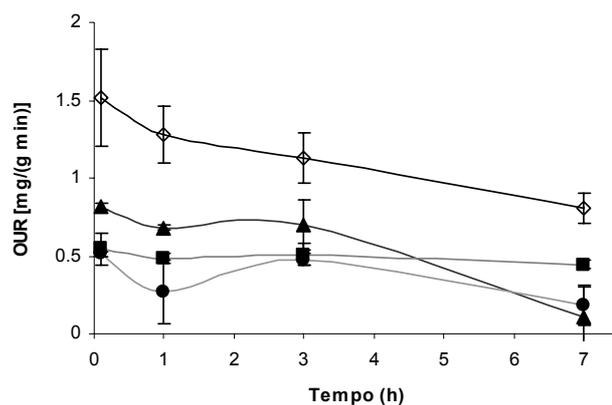
$$\% \text{ Redução} = \frac{OUR_{\text{controlo}} - OUR_{\text{ensaio}}}{OUR_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (7.1)$$

em que  $OUR_{\text{controlo}}$  representa a taxa específica de consumo de oxigénio necessário para oxidar a glicose no ensaio de controlo e  $OUR_{\text{ensaio}}$  representa a mesma taxa medida nos testes de aplicação de biocida.

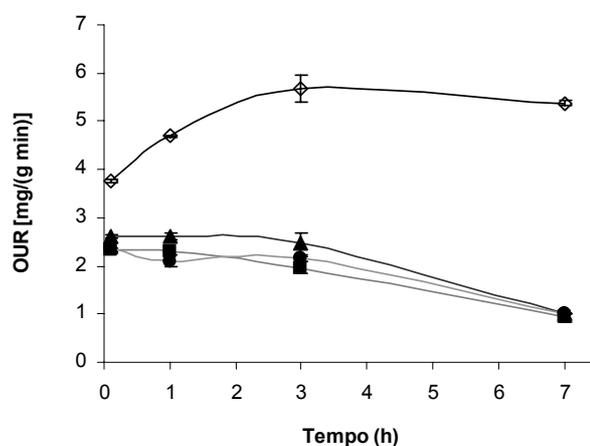
### 7.1.4 Resultados e Discussão

O efeito das várias concentrações de ambos os biocidas, carbamato e glutaraldeído, na actividade respiratória específica de culturas em suspensão de bactérias *P. fluorescens* foi avaliado ao longo do tempo (até 7 h) e para vários valores de pH (5, 7 e 9).

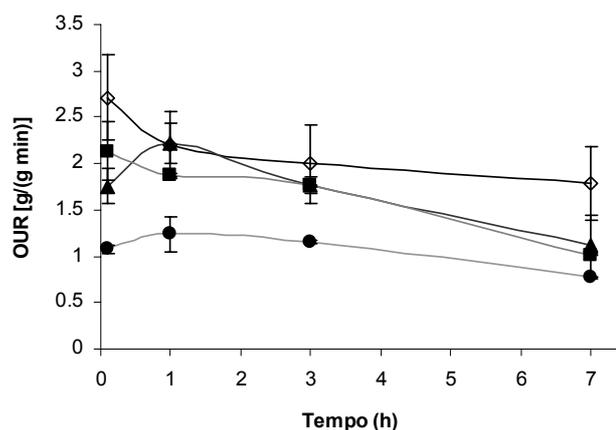
A acção do carbamato na actividade respiratória da bactéria está resumida na Figura 7.1.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.1** Efeito do carbamato na actividade respiratória da bactéria *P. fluorescens* para vários valores de pH, respectivamente, pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (▲) 100 mg L<sup>-1</sup>, (■) 200 mg L<sup>-1</sup> e (●) 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato.

A título de nota, refira-se que, durante a construção dos gráficos que constituem esta figura, se optou por não uniformizar as escalas dos eixos das ordenadas no sentido de tornar mais visível a tendência das curvas representadas nas Figuras 7.1a,c.

A análise da Figura 7.1 permite constatar que, de uma maneira geral, a aplicação de carbamato reduz a actividade respiratória específica da *P. fluorescens* para todos os valores de pH ensaiados. Esta redução parece ser mais significativa para pH 7 (Figura 7.1b) e menos marcada quando o pH do meio se situa na zona alcalina (Figura 7.1c). Note-se, no entanto, que em nenhuma das situações estudadas, foi registada ausência total (redução completa) de actividade respiratória.

Para uma avaliação mais efectiva da eficácia deste biocida, a redução da actividade bacteriana, para cada situação de pH e tempo de contacto com o carbamato, foi também expressa em percentagem (Tabela 7.1), tomando-se como referência os valores de actividade respiratória obtida nos ensaios de controlo, isto é na ausência de carbamato.

**Tabela 7.1** Redução da actividade respiratória específica da suspensão bacteriana de *P. fluorescens* obtida pela aplicação de carbamato, de acordo com a Equação 7.1

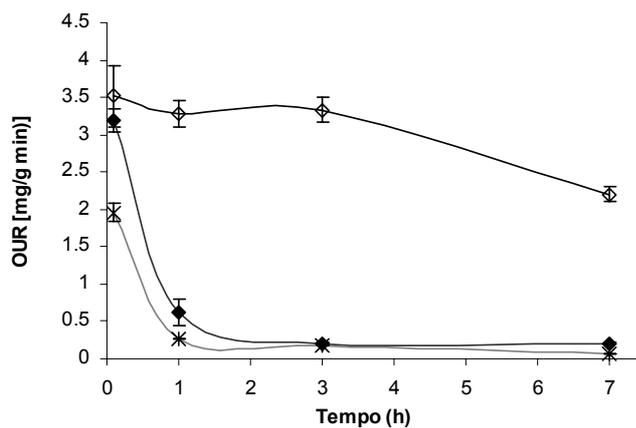
Tempo (h)	Redução da actividade respiratória (%)								
	100 mg L <sup>-1</sup>			200 mg L <sup>-1</sup>			300 mg L <sup>-1</sup>		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
0.1	45.9	31.1	35.2	63.9	38.2	21.1	66.2	37.2	60.2
1	46.8	44.4	0	62.0	51.3	14.6	79.2	55.1	43.5
3	37.9	56.5	11.8	55.1	65.4	11.8	57.7	62.2	42.4
7	86.3	81.2	37.7	44.8	82.8	43.2	77.3	81.3	56.9

Os valores obtidos reforçam o anteriormente referido, isto é, as maiores reduções de actividade são conseguidas, de uma forma geral, nos ensaios a pH 7, e as menores para pH 9. Pela observação da tabela é possível, também, inferir-se que, de um modo geral, a redução da actividade respiratória da *P. fluorescens* aumenta com o aumento da concentração de carbamato adicionado às culturas bacterianas.

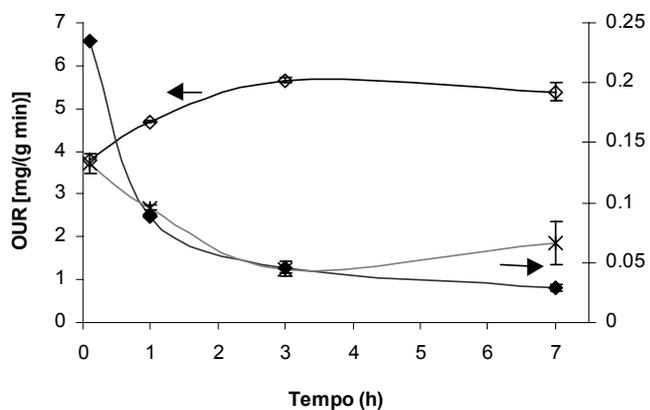
Uma análise mais atenta dos valores sumariados na Tabela 7.1 evidencia ainda que, quando o pH ensaiado ronda a neutralidade, e para todas as concentrações de carbamato aplicadas, a redução da actividade respiratória de *P. fluorescens* assume valores superiores para tempos de exposição das bactérias ao biocida mais longos. Este facto indicia que a acção do carbamato, a pH 7, não é imediata e só se faz sentir de maneira mais significativa para tempos de contacto iguais ou superiores a 3 h. Este facto não é de todo surpreendente pois este microbocida é referenciado como não sendo de efeito letal rápido, geralmente requerendo tempos de contacto na ordem de 4 h a 9 h, para um desempenho máximo (Lutey, 1995). A mesma tendência, contudo, não é observada para os valores de pH 5 e 9, pois, de uma maneira geral, a redução da actividade respiratória decresce nas primeiras 3 h, aumentando significativamente somente ao fim de 7 h de exposição das bactérias ao carbamato.

A evolução da actividade respiratória específica das bactérias *P. fluorescens*, face à aplicação de glutaraldeído às suspensões celulares, pode ser observada na Figura 7.2. Refira-se, novamente, que a não uniformização da escala do eixo das ordenadas dos vários gráficos, correspondente à actividade respiratória específica, se explica pela necessidade de tornar visível a tendência das curvas, nomeadamente no caso dos testes realizados a pH 5 e pH 9.

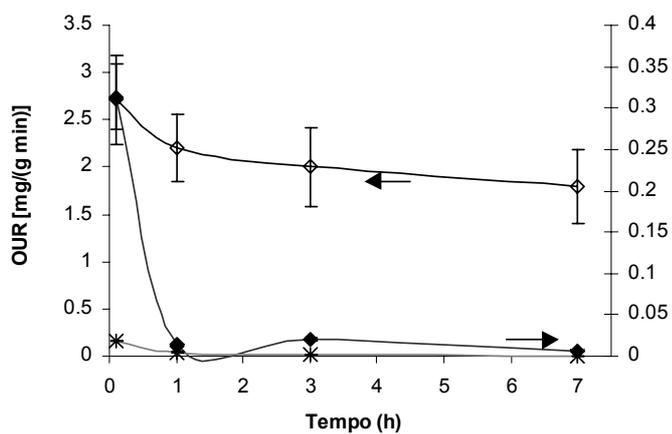
Tal qual o carbamato, a adição deste biocida às culturas bacterianas em suspensão provoca a redução da actividade respiratória, para todos os valores de pH testados e para as duas concentrações de glutaraldeído ensaiadas. Contrariamente ao observado com a adição de carbamato, parece não haver diferenças significativas, em termos de redução de actividade, em função do valor de pH. Novamente, para uma melhor avaliação do desempenho do glutaraldeído, a redução da actividade respiratória específica, em função do pH e da concentração de glutaraldeído testados, foi expressa em percentagem relativa aos ensaios de controlo em cada instante de tempo, estando os valores obtidos coligidos na Tabela 7.2.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.2** Efeito do glutaraldeído na actividade respiratória de *P. fluorescens* para vários valores de pH, respectivamente, pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (◆) 50 mg L<sup>-1</sup> e (\*) 100 mg L<sup>-1</sup> glutaraldeído.

Pela observação da Tabela 7.2 pode-se constatar que as percentagens de redução de actividade respiratória, obtidas com a adição de glutaraldeído, são assaz significativas pois são quase sempre superiores a 90 %, registando-se até uma situação (pH 9 e aplicação de 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído) em que a redução da actividade respiratória foi total. Regra geral, a redução da actividade respiratória aumenta com o tempo de contacto das bactérias com o glutaraldeído, ainda que as diferenças nem sempre sejam muito significativas. A este facto não é alheio o conhecimento de que o glutaraldeído é um biocida de acção rápida (Paulus, 1993).

**Tabela 7.2** Redução da actividade respiratória específica da suspensão bacteriana de *P. fluorescens* obtida pela aplicação de glutaraldeído, de acordo com a Equação 7.1

Tempo (h)	Redução na actividade respiratória (%)					
	50 mg L <sup>-1</sup>			100 mg L <sup>-1</sup>		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
0.1	9.1	93.8	88.4	44.3	96.5	99.3
1	81.0	98.1	99.3	91.9	98.0	99.8
3	93.9	99.2	99.0	94.6	99.2	99.9
7	90.6	99.5	99.7	96.7	98.8	100

As diferenças nos valores de percentagem de redução obtidos para os vários pH ensaiados não são, de facto, muito significativas. Note-se, contudo, que, se tomarmos o valor de pH 7 como referência, os valores de redução obtidos a pH 5 são inferiores, e os determinados a pH 9 quase sempre superiores. Esta constatação era de certa forma esperada, pois a acção antimicrobiana do glutaraldeído acentua-se na gama alcalina, não porque ocorra alguma alteração química deste, mas sim porque, com o aumento do pH para valores superiores a 7, aumentam os sítios reactivos na parede bacteriana que podem potencialmente interagir com o glutaraldeído e, por consequência, aumentar a acção biocida deste (Eagar *et al.*, 1986; Walsh *et al.*, 1999). Em meio ácido, os sítios reactivos da parede celular estão, na sua maioria, protonados e portanto protegidos da interacção negativa com os grupos aldeído do biocida.

O efeito da duplicação da concentração de glutaraldeído aplicada não se traduziu por um aumento expressivo da redução de actividade, ainda que, com a aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , se tenham registado valores um pouco superiores.

Pela comparação das Tabelas 7.1 e 7.2, é possível concluir que, regra geral, as percentagens de redução de actividade obtidas com a adição de glutaraldeído às suspensões bacterianas são muito superiores às obtidas com a aplicação de carbamato. Este facto demonstra que, em termos de efeito letal, e nas condições testadas, o glutaraldeído apresenta uma eficiência antimicrobiana bastante mais acentuada que o carbamato, como aliás é conhecido.

## **7.2 EFEITO DO CAULINO NA EFICIÊNCIA DOS BIOCIDAS**

### **7.2.1 Introdução**

Muitas indústrias, principalmente aquelas que requerem grandes volumes de água, captam a água de alimentação necessária aos seus processos produtivos directamente de rios e lagos. A utilização de água destes sistemas naturais justifica-se pelo facto desta constituir um manancial abundante e a baixo custo. No entanto, o uso deste tipo de fontes de água introduz nos sistemas produtivos, para além de mais microrganismos, material particulado de origem abiótica como areias, sedimentos e argilas que, devido às suas reduzidas dimensões (diâmetros equivalente geralmente na ordem dos micrómetros), não são removidos pelos normais processos de filtração a montante da produção. Esta ocorrência assume particular destaque na medida em que estas partículas podem interagir com os microrganismos presentes nos circuitos de água, bem como com outras substâncias intrínsecas ao próprio processo produtivo.

As interacções entre as partículas e os microrganismos são assunto de grande relevância devido à acção que as partículas podem exercer nos processos de adesão de microrganismos, nomeadamente bactérias, bem como na actividade microbiana. A presença de certas partículas de argila, como a caulinite, nos sistemas aquosos modifica as características físico-químicas do ambiente (habitat) no qual os microrganismos vivem - efeitos indirectos- e, por consequência, o crescimento e a actividade metabólica dos

microrganismos. Os efeitos que envolvem interações superficiais (isto é, os processos de adesão) entre as partículas de argila e os microrganismos são considerados efeitos directos e relativamente pouco se sabe acerca destes. A adsorção e ligação de compostos orgânicos a partículas de argila são também geralmente discutidas como efeitos directos, devido à similaridade dos mecanismos envolvidos (Stotzky, 1986).

As partículas de argila possuem uma área superficial elevada e são ionogénicas, portanto capazes de atrair substratos, adsorver nutrientes, iões e mesmo macromoléculas e reter moléculas de água (Burns, 1989). Estas características concedem às argilas um importante papel na actividade microbiana.

Durante o processo de formação das argilas, alguns iões Al e Si podem ser substituídos por outros iões de menor valência, segundo um processo denominado de “substituição isomórfica”. Este processo origina um excesso de carga negativa, situação que é compensada pela adsorção de catiões provenientes da fase aquosa circundante (Burns, 1979; Stotzky, 1986). Estes iões adsorvidos na superfície das argilas, geralmente Ca, Mg, S, Na, K e Al (Michaels e Bolger, 1962), podem ser posteriormente permutados por iões equivalentes do meio de cultura (Burns, 1979). Esta propriedade das argilas, usualmente designada por “capacidade de permuta catiónica” e que, em termos práticos, pode ser traduzida pela quantidade máxima de iões que uma argila pode permutar com o meio (Hattori, 1973), parece desempenhar um importante papel na actividade dos microrganismos.

Em termos estruturais, as partículas de argila podem estar organizadas segundo dois arranjos básicos de moléculas de silício e óxido de alumínio. A caulinite, principal constituinte do caulino, e um dos principais constituintes dos solos (Janczuk *et al.*, 1989), pode ser descrita como sendo um mineral de argila de estrutura 1:1, isto é, um arranjo em que as unidades de Si e Al estão agrupadas numa razão 1:1 (-Si.Al.Si.Al-) fortemente unidas por ligações de hidrogénio (Burns, 1979), isto é, um silicato de alumínio, que ocorre na Natureza sob a forma de finas lâminas hexagonais ásperas. Em suspensão aquosa, as partículas de caulino possuem uma carga global negativa distribuída sobre as superfícies basais (Michaels e Bolger, 1962). Em condições ácidas, e elevadas concentrações de electrólito, as arestas das lâminas tendem a ligar iões de hidrogénio, assumindo uma carga positiva. Esta mudança provoca atracção electrostática entre as arestas e as faces conduzindo à formação de uma estrutura altamente expandida a que se convencionou

chamar “castelo de cartas” (Michaels e Bolger, 1962; Strenge e Sontag, 1987). Em condições alcalinas, as arestas das lâminas de caulinite tornam-se neutras, ou então positivamente carregadas, e a estrutura da argila desflocula. Em condições de elevada concentração electrolítica, as forças de repulsão electrostática resultantes das interacções entre as lâminas é reduzida, formando-se então agregados muito densos cuja configuração se assemelha a um “baralho de cartas”, em consequência da adesão das partículas ao longo das suas superfícies basais (Michaels e Bolger, 1962).

### 7.2.2 Objectivo do trabalho

O objectivo deste trabalho foi, em primeira instância, indagar se a presença de partículas de caulino em culturas em suspensão de *P. fluorescens* interferia no desempenho antibacteriano dos biocidas. Paralelamente, também foi investigada a possibilidade das mesmas partículas de argila poderem, só pela sua presença nas culturas bacterianas, afectar a actividade respiratória das bactérias e, por consequência, dissimular a eficácia dos biocidas.

### 7.2.3 Metodologia experimental

A metodologia experimental, no que respeita à aplicação de biocidas, determinação das taxas de consumo de oxigénio e avaliação da redução da actividade respiratória, foi similar à descrita no Sub-capítulo 7.1.3. As suspensões bacterianas foram obtidas de maneira análoga à referida no mesmo sub-capítulo, só que, para estes testes, a cada um dos frascos *Schott* foi previamente adicionada uma determinada quantidade de caulino por forma a conseguir-se em cada uma das várias suspensões microbianas uma concentração final em caulino de 300 mg L<sup>-1</sup>.

#### 7.2.3.1 Determinação da biomassa celular em cada amostra

Após a avaliação da actividade respiratória, a biomassa celular das amostras foi determinada recorrendo-se, novamente, ao método modificado de Lowry (Capítulo 4). Constatou-se, no entanto, que a presença de partículas de caulino interferia com este método de doseamento, pelo que os teores em proteína das amostras tiveram que ser corrigidos através da subtracção da parcela referente ao “teor em proteína” de uma suspensão de

caulino. Este valor foi determinado sujeitando uma suspensão de 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino ao mesmo procedimento seguido com as suspensões bacterianas, isto é, da suspensão foi retirado um volume idêntico ao amostrado de cada uma das suspensões bacterianas que foi centrifugado, ressuspendido em 10 mL de solução tampão e sujeito ao procedimento experimental para doseamento de proteína.

Acrescente-se ainda que, imediatamente antes da leitura da absorvência, as várias amostras foram centrifugadas por forma a remover as partículas de caulino, minimizando-se então a interferência deste com as leituras no espectrofotómetro.

### 7.2.3.2 Avaliação do aumento da actividade respiratória

O efeito do caulino na actividade respiratória das bactérias *P. fluorescens* foi avaliado quantitativamente em termos de aumento da actividade respiratória, tendo por referência a actividade respiratória obtida, para cada intervalo de tempo, nos ensaios realizados na ausência de caulino. Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Aumento} = \frac{OUR_{\text{caulino}} - OUR_{\text{controlo}}}{OUR_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (7.2)$$

em que  $OUR_{\text{controlo}}$  representa a taxa específica de consumo de oxigénio necessário para oxidar a glicose nos ensaios de controlo, *i.e.*, nos ensaios realizado na ausência de caulino e  $OUR_{\text{caulino}}$  representa a mesma taxa medida nos testes efectuados na presença de partículas de caulino, para as mesmas condições de tempo e pH.

### 7.2.3.3 Monitorização do pH

O pH de cada uma das suspensões bacterianas em contacto com 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino foi monitorizado ao longo do tempo. A calibração do eléctrodo de pH foi feita *a priori*, recorrendo a duas soluções de tampão a pH 7 (zero) e a pH 4 (declive).

#### 7.2.3.4 *Investigação da adsorção do carbamato no caulino*

A possibilidade do carbamato poder adsorver às partículas de caulino foi investigada pela leitura da absorvência a 280 nm de soluções de carbamato em contacto directo com partículas de caulino. Para tal, prepararam-se soluções de carbamato de diferentes concentrações iniciais (1, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 200 e 300 mg L<sup>-1</sup>) às quais foi adicionado 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino. Estas suspensões foram mantidas em agitação (150 min<sup>-1</sup>) e temperatura (25 °C) constantes, num agitador orbital. Periodicamente, *i.e.*, imediatamente após a adição de caulino e após 1 h, 3 h, 7 h, 24 h, 48 h, 96 h e 144 h de contacto das soluções de biocida com as referidas partículas, foi retirada de cada suspensão uma amostra representativa que posteriormente foi filtrada (filtro membrana de 0.2 µm de poro, Gelman Sciences), tendo o seu conteúdo em carbamato sido avaliado pela leitura da absorvência. Simultaneamente, também foi preparada uma suspensão de caulino (300 mg L<sup>-1</sup>) que, para cada um dos intervalos de tempo referidos, e após filtração, funcionou como o “branco” contra o qual a absorvência das várias amostras foi lida.

A determinação do pico máximo de absorvência do carbamato foi conseguida fazendo vários varrimentos de uma solução de carbamato (10 mg L<sup>-1</sup>) na região ultravioleta (comprimentos de onda compreendidos na gama de 190 nm a 320 nm) num espectrofotómetro de varrimento (JASCO 7850).

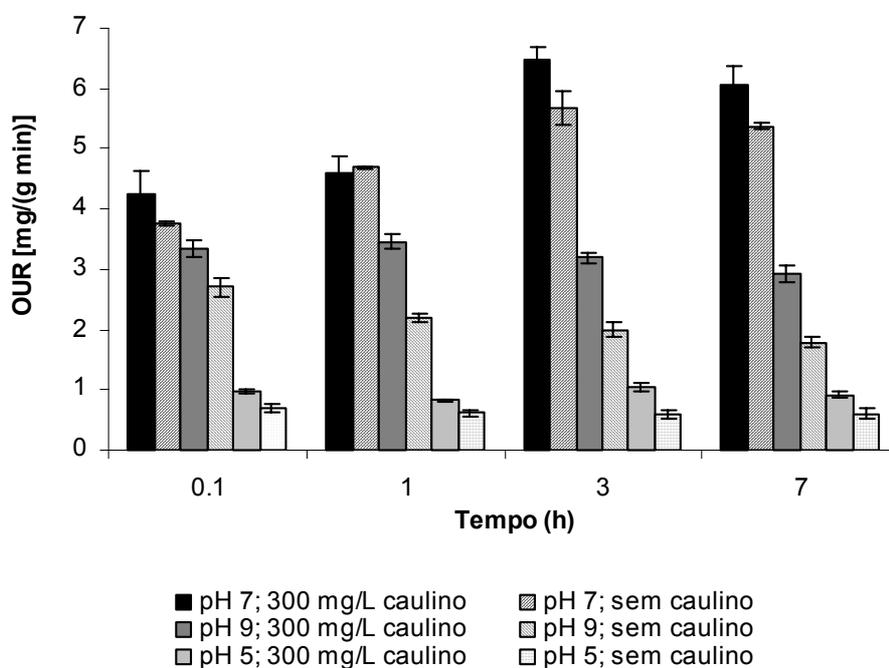
#### 7.2.3.5 *Ensaios de varrimento*

Amostras de uma solução de carbamato (10 mg L<sup>-1</sup>), de uma suspensão de caulino (300 mg L<sup>-1</sup>) e de uma suspensão mista de carbamato (10 mg L<sup>-1</sup>) + caulino (300 mg L<sup>-1</sup>) foram sujeitas a varrimentos na região ultravioleta (comprimentos de onda compreendidos na gama de 190 nm a 320 nm). Este procedimento foi também aplicado a amostras filtradas (filtro membrana de 0.2 µm de poro, Gelman Sciences.) das mesmas soluções e suspensões. Estes ensaios foram realizados com o objectivo de se indagar acerca do tipo de interacção que eventualmente se estabelecia entre as partículas de caulino e o carbamato.

## 7.2.4 Efeito do caulino na actividade respiratória da bactéria *P. fluorescens*

### 7.2.4.1 Resultados e Discussão

Paralelamente aos ensaios de investigação da acção antimicrobiana dos biocidas na presença e na ausência de caulino, foi também importante investigar se a presença de caulino podia só por si interferir de algum modo com as bactérias, ou melhor com a sua actividade respiratória específica. Novamente, tal qual nos testes com os biocidas, os ensaios de avaliação dos possíveis efeitos das partículas de caulino na actividade das bactérias *P. fluorescens* foram realizados a diferentes valores de pH (5, 7 e 9) e para vários tempos de contacto das culturas bacterianas com o caulino. Os resultados obtidos (Figura 7.3) demonstram claramente que a actividade respiratória é superior nas culturas bacterianas em contacto com as partículas de caulino. Esta tendência crescente é verificada para todos os valores de pH ensaiados e para quase todos os tempos de contacto das bactérias com as partículas. A Figura 7.3 também evidencia que os maiores valores de actividade respiratória são obtidos nos ensaios a pH 7, quer na ausência quer na presença de caulino, e que os menores são observados nos ensaios a pH 5.



**Figura 7.3** Efeito do caulino na actividade respiratória específica de culturas suspensas de *P. fluorescens*.

O efeito do caulino na actividade respiratória das bactérias pode ser também observado na Tabela 7.3, pois esta expressa, em percentagem, o aumento verificado na actividade bacteriana devido à presença das partículas de caulino nas suspensões celulares. Para a construção desta tabela, tomou-se como referência os valores de actividade respiratória obtidos nos ensaios efectuados na ausência de caulino (ensaios de controlo).

Pela análise da Tabela 7.3 verifica-se que o aumento da actividade respiratória de *P. fluorescens* é dependente do valor de pH testado. Com efeito, as maiores percentagens de aumento da actividade bacteriana são registadas a pH 5 (27 % a 43 %) diminuindo nos ensaios realizados, respectivamente, a pH 9 (19 % a 36 %) e pH 7 (11 % a 13%). Refira-se que, na gama testada, os valores de pH 7 e 5 são, respectivamente, o pH óptimo e o pH menos favorável ao desenvolvimento da bactéria *P. fluorescens* (Pinheiro *et al.*, 1988; Oliveira *et al.* 1994). Parece, pois, que o efeito estimulador do caulino é mais significativo quando as condições de crescimento da bactéria se desviam dos valores óptimos.

**Tabela 7.3** Aumento da actividade respiratória específica da bactéria *P. fluorescens* obtida com a presença de caulino, de acordo com a Equação 7.2, para vários valores de pH; valores médios  $\pm$  desvio padrão

Tempo (h)	Aumento da actividade respiratória (%)		
	pH 5	pH 7	pH 9
0.1	28.6 ( $\pm$ 10.1)	10.1 ( $\pm$ 11.0)	19.1 ( $\pm$ 7.7)
1	27.0 ( $\pm$ 8.7)	-	36.4 ( $\pm$ 10.3)
3	43.1 ( $\pm$ 16.7)	12.5 ( $\pm$ 7.1)	37.3 ( $\pm$ 20.2)
7	33.6 ( $\pm$ 15.4)	11.2 ( $\pm$ 9.6)	38.8 ( $\pm$ 17.2)

Os resultados apresentados, quer na Figura 7.3 quer na Tabela 7.3, indiciam que a presença de partículas de caulino nas suspensões bacterianas exerce um efeito positivo sobre as bactérias de tal ordem que a sua actividade respiratória é estimulada. Em 1980, Macura e Stotzky já referenciavam que a taxa respiratória de bactérias em culturas puras era estimulada pela presença de argilas, mas do tipo 2:1 (-Si.Al.Si.Si.Al.Si-), como por exemplo a montmorilonite, que são caracterizadas por uma grande área superficial e uma grande capacidade de permutar iões com o meio (Hattori, 1973; Stotzky, 1986; Burns, 1989). Os resultados obtidos com estes testes mostram que também com argilas do tipo 1:1, como a caulinite (principal constituinte do caulino), de área superficial e capacidade de troca iónica

comparativamente mais reduzidas (Burns, 1989), a actividade respiratória das bactérias é substancialmente estimulada.

Alguns autores (Stotzky, 1986; Burns, 1989; Castellar *et al.*, 1998) referem que a estimulação da actividade microbiana em consequência da adição de partículas inorgânicas é provavelmente devida, entre outros factores, à capacidade destas partículas conseguirem manter o pH do meio em valores adequados ao crescimento dos microrganismos. Nestas circunstâncias, as partículas assumiriam então um papel similar ao das soluções tampão, em que as propriedades de tampão durante o metabolismo microbiano estariam relacionadas com a permuta de iões da estrutura da argila por iões  $H^+$  produzidos durante o metabolismo, mantendo-se assim constante a concentração de hidrogeniões (Burns, 1989) e, por consequência, o pH do meio. Este argumento, contudo, não pode ser utilizado para justificar o aumento da actividade respiratória observada nestes ensaios em consequência da presença de caulino (Figura 7.3 e Tabela 7.3), pois a preparação das suspensões bacterianas envolveu a utilização de soluções tampão, por forma a ajustar-se o pH aos valores pretendidos. A monitorização do pH das várias suspensões mistas de bactérias e caulino (Tabela 7.4) atesta que não foi detectada nenhuma alteração significativa no valor de pH ajustado inicialmente.

**Tabela 7.4** Valores de pH registados nas várias suspensões bacterianas, na presença de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de caulino, ao longo do tempo (para diferentes valores iniciais de pH do meio)

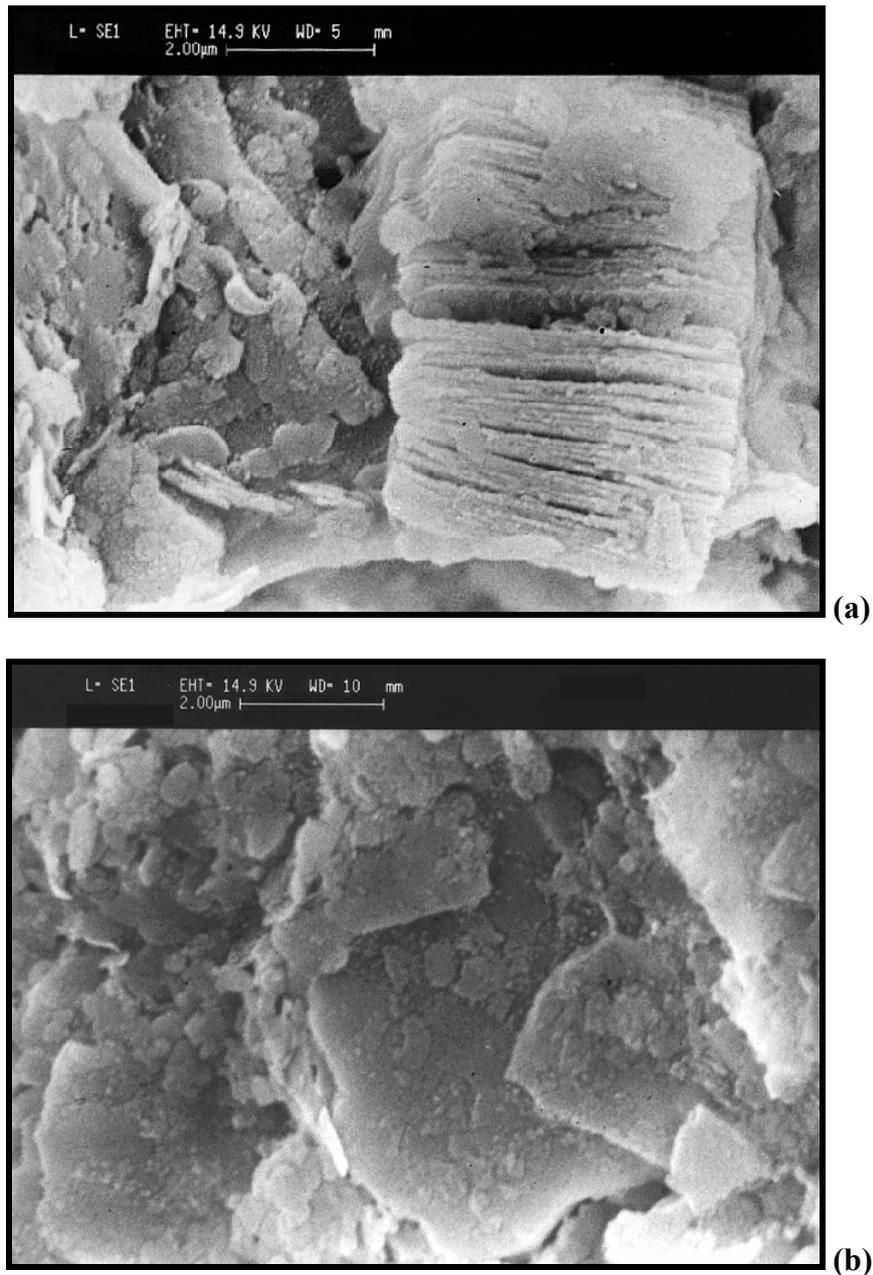
Tempo (h)	pH medido após a adição de caulino		
	pH 5	pH 7	pH 9
0	5.10	7.00	9.10
1	5.04	6.96	9.08
3	5.05	6.99	9.07
7	5.05	6.98	8.93
24	5.05	6.98	8.89

A manutenção do pH de cada suspensão à volta do pH inicialmente implementado, indício da supremacia da força iónica do tampão, indica que o efeito do caulino como regulador de pH não se manifesta nestas suspensões bacterianas tamponadas, pelo que, o carácter estimulador na actividade respiratória por parte do caulino tem que ser devido a outro factor que não o da regulação do pH. Stotzky (1986) já sugeria que outros mecanismos adicionais teriam que estar envolvidos na estimulação microbiana por parte das

partículas de argila, uma vez que algumas destas contribuíam de facto para o aumento das taxas de respiração, mesmo quando o pH do meio de cultura estava tamponado ou inicialmente ajustado ao pH óptimo de crescimento microbiano. Estes mecanismos adicionais responsáveis pelo efeito estimulador das partículas de argila ainda não estão, até ao momento, bem definidos, embora algumas hipóteses tenham vindo a ser sugeridas (Srinivasan *et al.*, 1995) apesar de não confirmadas.

A caracterização da configuração espacial do caulino, nomeadamente as suas alterações estruturais consoante o valor do pH do meio onde está inserido, foi um dos factores a que se recorreu na busca de informações complementares capazes de contribuir para o entendimento do efeito estimulador do caulino. Para tal, foram retiradas amostras das várias suspensões mistas de bactérias com caulino para posterior observação por microscopia electrónica de varrimento (SEM). O registo de algumas dessas observações está patente na Figura 7.4.

A análise da figura evidencia diferenças inequívocas na estrutura do caulino, podendo essas diferenças ser directamente relacionadas com o valor de pH da suspensão de onde as partículas foram retiradas. A Figura 7.4a evidencia a estrutura “baralho de cartas” característica das partículas de caulino em condições alcalinas (Michaels e Bolger, 1962). Na Figura 7.4b é visível uma configuração estrutural muito diferente da registada na Figura 7.4a, que corresponderia à estrutura floclada do caulino, denominada “castelo de cartas”. Esta não é completamente perceptível devido à manipulação experimental a que se submeteram as amostras para observação por SEM. Com efeito, a observação por SEM pressupõe a desidratação prévia das amostras (sub-capítulo 4.7.8), pelo que a água existente nos interstícios do caulino foi removida, tendo-se perdido, conseqüentemente, a estrutura aberta e expandida do “castelo de cartas”, que caracteriza o caulino para valores de pH inferiores a 7.



**Figura 7.4** Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia electrónica de varrimento de suspensões de bactérias *P. fluorescens* + partículas de caulino, respectivamente, a pH 9, ampliação de 7400x (a) e pH 5, ampliação de 8000x (b).

Ainda que não seja evidente na Figura 7.4b, a configuração espacial do caulino em “castelo de cartas” representa um sistema expandido com uma grande área superficial, quer interna quer externa. Esta configuração proporciona então uma considerável extensão de área disponível para interacção com as bactérias, para a adsorção de iões  $H^+$  (resultantes do metabolismo bacteriano) bem como para concentração de nutrientes orgânicos e/ou

inorgânicos (Burns, 1989), conseguindo-se, deste modo, desenvolver dentro dos flocos de caulino um microambiente bastante favorável para o desenvolvimento bacteriano. Este factor talvez fundamente o maior aumento de actividade respiratória registada nos testes realizados a pH 5. Um raciocínio análogo pode ser sugerido para explicar os menores valores de aumento da actividade respiratória observados nos ensaios a pH 9, comparativamente com os obtidos a pH 5 (Tabela 7.3). Com efeito, na gama alcalina, as partículas de caulino organizam-se segundo a estrutura “baralho de cartas” em resultado da sobreposição das partículas (Figura 7.4a). Nestas circunstâncias, a área superficial disponível para interacção com as bactérias e com os componentes do meio de cultura é drasticamente reduzida. A limitação da área para a adesão bacteriana, nomeadamente entre as lâminas do caulino, restringe substancialmente o estabelecimento de locais propícios ao crescimento bacteriano.

Acrescente-se também que, segundo Stotzky (1966), o efeito estimulador que as argilas parecem exercer sobre o metabolismo bacteriano poderá dever-se, em parte, à capacidade de troca catiónica que estas possuem. No caso específico do caulino, ainda que esta argila seja caracterizada por apresentar baixa capacidade de troca catiónica, comparativamente com as demais (Burns, 1989), a estrutura “castelo de cartas” em relação à configuração “baralho de cartas” favorece a troca iónica, pelo que as partículas de caulino podem libertar iões (Ca, Mg, S, Na, K e Al) da sua estrutura para o meio de cultura (Stotzky, 1986), iões estes que geralmente são benéficos para o metabolismo bacteriano. A configuração “baralho de cartas” limita a capacidade de permuta de iões, devido à redução da área superficial exposta.

Saliente-se, todavia, que em ambas as situações de pH é possível vislumbrar-se bactérias aderidas às partículas de caulino, sendo até interessante observar algumas bactérias situadas entre as lâminas de caulino (Figura 7.4a).

Em relação aos testes realizados a pH 7, não foram encontrados argumentos plausíveis capazes de explicar o menor efeito do caulino na actividade respiratória de *P. fluorescens*, quando comparado com os ensaios realizados a pH 5 e 9. Refira-se, no entanto, que a pH 7 as condições do meio são óptimas para o desenvolvimento de *P. fluorescens*, pelo que será difícil aumentar o metabolismo da bactéria neste meio favorável. Consequentemente, o benefício associado à presença de caulino no meio de cultura não será tão notório como nos testes realizados a pH 5 e pH 9, onde as condições do meio se afastam dos valores óptimos

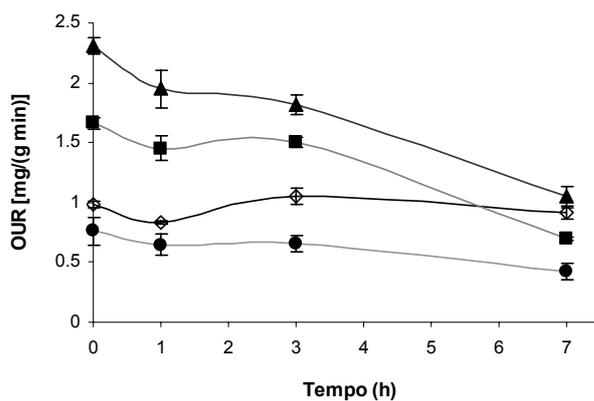
para esta bactéria. Nesta situação, qualquer modificação benéfica para a bactéria, como por exemplo a existência de partículas de caulino, irá manifestar-se de forma, comparativamente, mais significativa.

## 7.2.5 Efeito do caulino no desempenho antimicrobiano dos biocidas

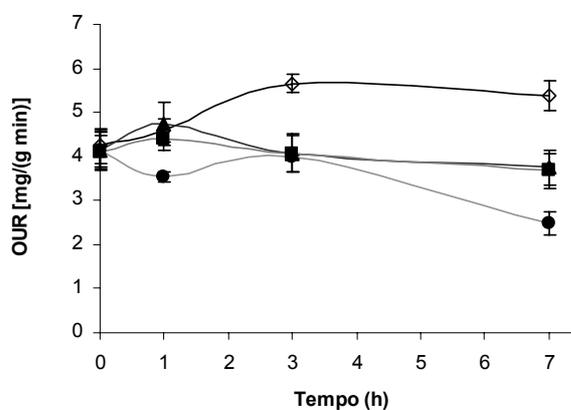
### 7.2.5.1 Resultados e Discussão

Com o intuito de investigar se a presença de partículas de caulino nas várias suspensões bacterianas de *P. fluorescens* alterava, de algum modo, o desempenho antimicrobiano dos biocidas, foram repetidos os testes de determinação da actividade respiratória das bactérias, para diferentes valores de pH e para diferentes tempos de exposição das suspensões com os biocidas, acrescentando-se, agora, 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino a cada uma das suspensões bacterianas.

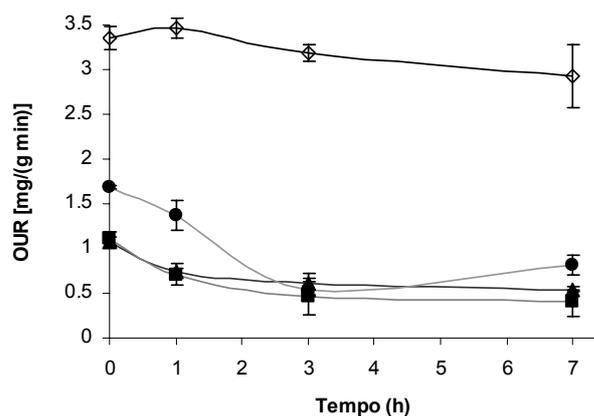
Os resultados obtidos com a aplicação das várias concentrações de carbamato, e para os vários pH ensaiados, são apresentados na Figura 7.5. No sentido de mostrar claramente a tendência das várias curvas apresentadas nos gráficos desta figura, optou-se, mais uma vez, por não uniformizar a escala do eixo das ordenadas. Da análise da figura verifica-se que, para os valores de pH 7 e 9, a actividade respiratória das bactérias diminui com a aplicação de carbamato, parecendo contudo essa diminuição ser mais marcada a pH 9 (Figura 7.5c). Nos testes a pH 7 (Figura 7.5b), o pH óptimo de crescimento da *P. fluorescens*, a redução observada na actividade respiratória é relativamente diminuta ainda que se torne mais pronunciada à medida que o tempo de contacto com o biocida aumenta (3 h e 7 h). Nos testes realizados a pH 5 (Figura 7.5a), a resposta das bactérias à adição de carbamato assume um carácter inesperado pois é notório que, com a aplicação de 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, a actividade respiratória da bactéria evoluiu para valores superiores aos registados no ensaio de controlo. Somente com a adição de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato é que se verifica diminuição, ainda que ligeira, da actividade respiratória das bactérias.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.5** Efeito do carbamato na actividade respiratória da bactéria *P. fluorescens* na presença de 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino, para pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (▲) 100 mg L<sup>-1</sup>, (■) 200 mg L<sup>-1</sup> e (●) 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato.

As considerações suscitadas pela observação da Figura 7.5 podem ser consolidadas pelos valores apresentados na Tabela 7.5. Estes traduzem em percentagem, quando possível, as diferenças na actividade respiratória causadas pela aplicação do carbamato. Para o seu cálculo utilizou-se como referência os valores de actividade respiratória obtidos nos ensaios de controlo efectuados na presença das partículas de caulino e sem a aplicação de biocidas. Pela observação da tabela também é possível constatar que a redução da actividade microbiana aumenta à medida que aumenta o tempo de exposição das bactérias ao carbamato. Contrariamente ao observado na ausência de caulino (Tabela 7.1), esta tendência é verificada para todos os pH ensaiados, sendo mais notória, no entanto, para pH 9. Estes resultados corroboram o facto, já anteriormente referido, de que o carbamato tem uma acção, em termos letais, relativamente pouco imediata.

**Tabela 7.5** Redução da actividade respiratória específica da bactéria *P. fluorescens* obtida com a aplicação de carbamato e na presença de 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino, de acordo com a Equação 7.1

Redução da actividade respiratória (%)									
Tempo (h)	100 mg L <sup>-1</sup>			200 mg L <sup>-1</sup>			300 mg L <sup>-1</sup>		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
0.1	-	2.1	68.0	-	3.1	66.8	22.4	2.7	49.8
1	-	-	78.8	-	4.5	79.4	22.6	23.3	60.1
3	-	37.2	81.1	-	37.0	85.4	37.9	38.4	82.9
7	-	38.0	81.7	23.7	35.2	85.8	53.3	59.1	72.1

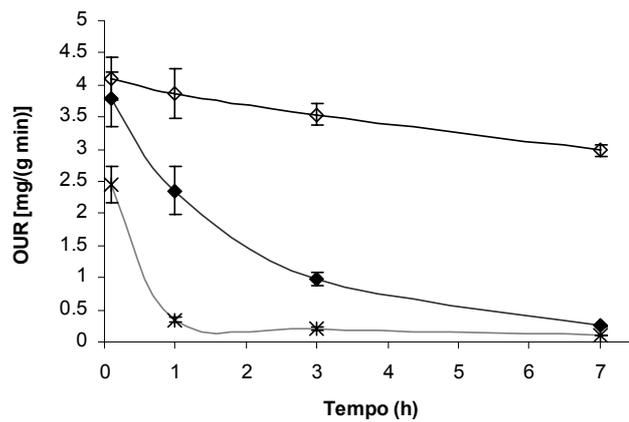
Se se confrontar os resultados obtidos na ausência de caulino (Tabela 7.1) com os obtidos na sua presença (Tabela 7.5), constata-se que, dependendo da concentração de carbamato aplicada e do valor de pH, existem diferenças substanciais nas percentagens de redução de actividade respiratória obtidas em ambas as situações (isto é, na ausência e na presença de caulino).

Nos ensaios realizados a pH 7, e para todas as concentrações de carbamato testadas, a presença das partículas de caulino diminui consideravelmente as percentagens de redução de actividade respiratória causada pela acção do biocida. A pH 5, o efeito do caulino fez-se sentir de maneira ainda mais significativa uma vez que, para além de minorar os valores de redução da actividade bacteriana (pela adição de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato), a presença de caulino parece inviabilizar a acção do carbamato pois não se registou diminuição da actividade das bactérias, principalmente para as menores concentrações (100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>), parecendo mesmo que essa actividade foi estimulada. Nos testes a pH 9, a presença de caulino, de modo geral, parece ter coadjuvado o carbamato na sua acção antibacteriana, já que os valores de redução da actividade respiratória da *P. fluorescens* aumentaram pela sua presença nas suspensões bacterianas.

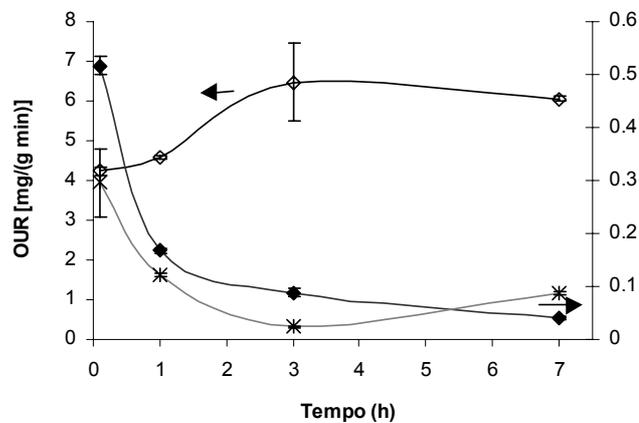
O efeito do caulino na actividade respiratória de culturas suspensas da bactéria *P. fluorescens*, quando sujeitas ao tratamento com o glutaraldeído, pode ser observado na Figura 7. 6 e na Tabela 7.6.

A presença de partículas de caulino parece não interferir com a redução da actividade respiratória das bactérias, pois, para a gama de valores de pH testados, a resposta das bactérias à adição de glutaraldeído na presença de caulino, parece ser similar à registada na ausência de caulino. De facto, tal como nos testes sem caulino, a adição de glutaraldeído provoca uma evidente diminuição da actividade respiratória das bactérias, diminuição esta que se acentua com o tempo de contacto das bactérias com o biocida e com a modificação do pH no sentido alcalino.

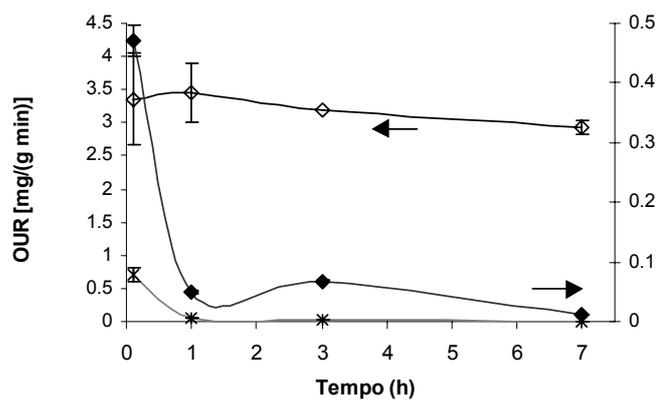
Mais uma vez, a duplicação da concentração de glutaraldeído aplicada às suspensões bacterianas não se traduziu por um aumento significativo dos valores de redução de actividade respiratória. Saliente-se, no entanto, que é com a aplicação de 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído que se manifestam as maiores reduções de actividade.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.6** Efeito do glutaraldeído na actividade respiratória da bactéria *P. fluorescens* na presença de 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino e para, respectivamente, pH 5 (a), pH 7 (b) e pH 9 (c); (◇) controlo, (◆) 50 mg L<sup>-1</sup> e (\*) 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído.

**Tabela 7.6** Redução de actividade respiratória específica da bactéria *P. fluorescens* obtida na presença de 300 mg L<sup>-1</sup> de caulino e com a aplicação de glutaraldeído, de acordo com a Equação 7.1

Tempo (h)	Redução na actividade respiratória (%)					
	50 mg L <sup>-1</sup>			100 mg L <sup>-1</sup>		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
0.1	7.6	87.8	85.9	40.1	93.0	97.6
1	38.8	96.4	98.6	91.1	97.3	99.9
3	72.3	98.6	97.9	94.2	99.6	99.9
7	91.6	99.3	99.6	96.4	98.5	100

Uma comparação mais atenta das Tabelas 7.2 e 7.6, demonstra que só com a menor concentração de glutaraldeído se verificam algumas diferenças nos valores de redução da actividade respiratória, ainda que bastante menos significativas que as obtidas nos testes com o carbamato. De facto, com a adição de 50 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído às suspensões bacterianas contendo as partículas de caulino, obtiveram-se valores de redução da actividade bacteriana inferiores aos conseguidos nos ensaios sem caulino, sendo esta redução mais pronunciada para pH 5. Com a adição de 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído, as diferenças não existem ou são muito pouco significativas.

Em sùmula, pode-se dizer que a presença de caulino nas suspensões bacterianas assume um papel preponderante quando estas são tratadas com carbamato, pois nesta situação as bactérias adoptam um comportamento substancialmente diferente em resposta à acção tóxica do biocida. Por conseguinte, a presença de partículas de caulino nas suspensões bacterianas, para certas condições de pH, reduz a eficácia do carbamato como biocida. O mesmo parece não acontecer, pelo menos de maneira clara, com a aplicação de glutaraldeído.

Este menor desempenho do carbamato, na presença das partículas de caulino, pode ser atribuído ao desaparecimento deste da solução, uma vez que certos autores (Huang e Yang, 1995; Amin *et al.*, 1996) referem que as argilas possuem potencialidades para remover certas substâncias orgânicas da água. Com o intuito de se inquirir acerca da possibilidade

das partículas de caulino poderem remover as moléculas de carbamato, várias soluções de carbamato, de concentração inicial compreendida entre  $1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , foram postas em contacto com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de caulino, tendo-se posteriormente determinado o conteúdo em carbamato ao longo do tempo, durante um período de tempo de 144 h. Os resultados (Tabela 7.7) demonstram que a concentração de carbamato presente em solução é consideravelmente reduzida ao longo do tempo. Para baixas concentrações de carbamato ( $<20 \text{ mg L}^{-1}$ ), é observada uma eliminação total do biocida em menos de 1 h de contacto da solução de biocida com as partículas de caulino. Para as concentrações mais elevadas ( $>20 \text{ mg L}^{-1}$ ), a concentração de carbamato é reduzida de forma gradual mas significativa com o tempo.

**Tabela 7.7** Redução na concentração de carbamato na presença de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de caulino ao longo do tempo. Valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ )

(\* ) concentração de carbamato antes da adição de caulino; (0 h) imediatamente após a adição

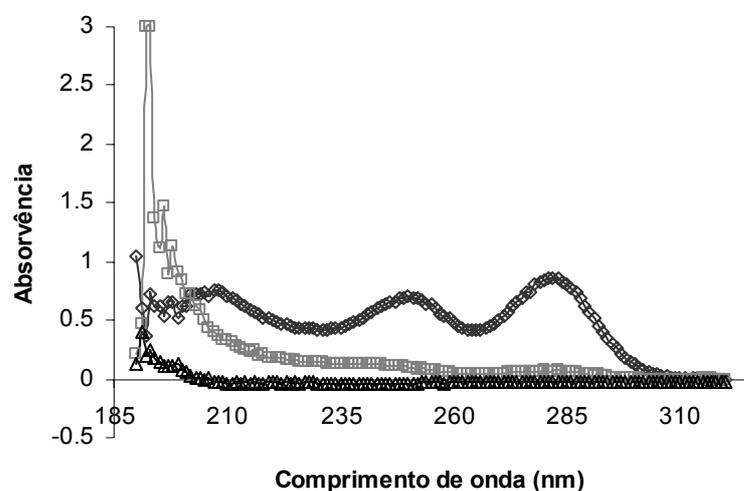
Tempo (h)	Concentração de carbamato ( $\text{mg L}^{-1}$ )									
	*	1	5.6	9.8	17.9	20.8	52.1	98.5	276	360
		( $\pm 7.2$ )	( $\pm 1.7$ )	( $\pm 0.2$ )	( $\pm 0.6$ )	( $\pm 0.5$ )	( $\pm 1.3$ )	( $\pm 1.1$ )	( $\pm 11.7$ )	( $\pm 18.2$ )
0	0	1.4	2.2	5.3	13.4	49.8	94.7	261.2	335.1	
		( $\pm 0.5$ )	( $\pm 0.8$ )	( $\pm 2.3$ )	( $\pm 4.8$ )	( $\pm 4.0$ )	( $\pm 1.6$ )	( $\pm 10.5$ )	( $\pm 15.8$ )	
1	0	0	0	0	7.2	43.6	94.6	257.6	329.7	
					( $\pm 1.4$ )	( $\pm 3.9$ )	( $\pm 2.0$ )	( $\pm 10.3$ )	( $\pm 15.3$ )	
3	0	0	0	0	0	42.0	93.5	257.9	323.7	
						( $\pm 5.8$ )	( $\pm 2.1$ )	( $\pm 10.3$ )	( $\pm 11.4$ )	
7	0	0	0	0	0	38.8	80.7	236.1	320.0	
						( $\pm 0.7$ )	( $\pm 3.0$ )	( $\pm 8.6$ )	( $\pm 15.0$ )	
24	0	0	0	0	0	20.6	56.6	222.7	287.8	
						( $\pm 1.8$ )	( $\pm 4.8$ )	( $\pm 7.6$ )	( $\pm 12.5$ )	
48	0	0	0	0	0	9.4	30.5	200.8	250.0	
						( $\pm 2.3$ )	( $\pm 1.1$ )	( $\pm 14.4$ )	( $\pm 11.2$ )	
96	0	0	0	0	0	4.6	23.3	129.4	196.2	
						( $\pm 0.1$ )	( $\pm 0.7$ )	( $\pm 0.4$ )	( $\pm 5.2$ )	
144	0	0	0	0	0	0	12.5	89.9	134.7	
							( $\pm 0.2$ )	( $\pm 2.6$ )	( $\pm 0.8$ )	

O desaparecimento do carbamato da suspensão caulino + carbamato indicia que alguma interacção se estabeleceu entre as partículas de argila e o biocida. Tendo por base o

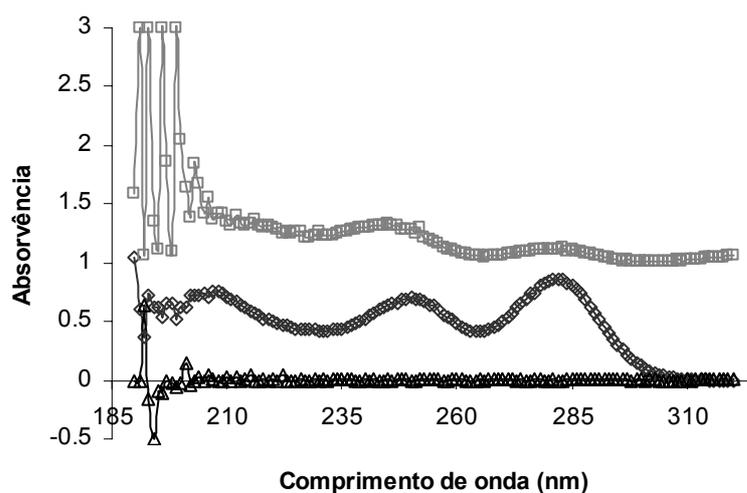
preconizado por Burns (1975), que referia que os pesticidas podiam adsorver nas argilas e consequentemente limitar a sua disponibilidade para os microrganismos do solo, pensou-se que o mesmo podia acontecer com o carbamato pois, para além de biocida, este também é referenciado como pesticida (Mateen *et al.*, 1994). Sendo assim, pode-se sugerir que as interacções estabelecidas entre as partículas de caulino e o carbamato se caracterizam essencialmente pela adsorção deste às partículas de argila, ficando pois em solução uma concentração menor do que a inicialmente implementada. Esta situação condiciona a concentração de carbamato disponível para actuação sobre as bactérias justificando-se, deste modo, a menor eficácia do biocida nos ensaios realizados na presença de partículas de caulino. Refira-se, no entanto, que este argumento só tem pleno fundamento se se presumir que o carbamato, uma vez adsorvido na argila, perde parcialmente ou totalmente a sua actividade tóxica.

No sentido de se inquirir do carácter físico ou químico da interacção entre as partículas de caulino e o carbamato, isto é, indagar se a adsorção era de natureza física ou química, foram realizados vários varrimentos na gama ultravioleta de amostras filtradas e não filtradas de uma solução de carbamato, de uma suspensão de caulino e de uma suspensão de caulino + carbamato. Os perfis de absorvência das amostras filtradas (Figura 7.7a) evidenciam que a curva correspondente à solução de carbamato é claramente maior do que a registada na suspensão mista de caulino + carbamato. Esta constatação demonstra, mais uma vez, que o carbamato desaparece da fase líquida da suspensão caulino + carbamato. Pela análise das curvas correspondentes aos varrimentos das amostras não filtradas (Figura 7.7b), facilmente se verifica que a curva da suspensão mista de carbamato + caulino exhibe absorvências nitidamente superiores às obtidas com a amostra filtrada. Este facto sugere que uma modificação química parece ocorrer, quando se põe em contacto as partículas de caulino com o carbamato, indiciando que um novo composto químico diferente do carbamato se forma em resultado da interacção argila-biocida. Uma observação mais atenta da Figura 7.7 revela também que a adsorção deste novo composto orgânico na argila parece apresentar um carácter firme e permanente, uma vez que a curva de absorvência correspondente à amostra não filtrada da suspensão mista caulino + carbamato (Figura 7.7b) é significativamente diferente (registaram-se maiores valores de absorvência para os mesmos comprimentos de onda) da obtida quando as partículas de caulino foram removidas

da mesma suspensão por filtração (Figura 7.7a). Este facto parece indicar que a adsorção do carbamato no caulino é de natureza química e não simplesmente de carácter físico.



(a)



(b)

**Figura 7.7** Curvas de absorvência, na gama ultravioleta, de uma solução de carbamato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) ( $\diamond$ ), de uma suspensão mista de caulino ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) + carbamato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) ( $\square$ ) e de uma suspensão de caulino ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) ( $\Delta$ ). (a) amostras filtradas (b) amostras não filtradas.

Para além da adsorção do carbamato nas partículas de caulino, outros factores podem ser sugeridos para fundamentar o menor desempenho dos biocidas, principalmente do carbamato, nos ensaios realizados na presença da argila. De facto, é quase universalmente aceite que as bactérias aderidas a partículas sólidas apresentam menor sensibilidade à acção antimicrobiana dos biocidas do que se estivessem em suspensão (Nichols, 1989;

LeChevallier *et al.*, 1990). Por conseguinte, a menor eficácia do carbamato na presença de caulino também pode ser atribuída, em parte, à adesão de *P. fluorescens* às partículas de caulino.

Em termos globais, a menor eficiência do carbamato, observada nos ensaios a pH 5 e 7, pode então ser o resultado da conjugação da adsorção química do biocida ao caulino, que diminui a sua concentração e, por consequência, a sua disponibilidade para as bactérias, com o efeito da adesão bacteriana nas partículas, que confere às bactérias alguma protecção contra o ambiente adverso externo. No caso específico dos ensaios realizados a pH 5, a configuração espacial do caulino a este valor de pH, conjuntamente com a interacção carbamato-caulino, pode explicar o comportamento observado, isto é, estimulação da actividade respiratória das bactérias com a aplicação de 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato às suspensões celulares. A área superficial proporcionada pela estrutura “castelo de cartas” parece ter, neste caso, um papel predominante na protecção e estimulação das bactérias, uma vez que o efeito antimicrobiano do carbamato não é perceptível. Somente com a maior concentração de biocida implementada, isto é, com 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, é possível verificar-se uma pequena redução da actividade respiratória específica, ainda que bastante inferior aos valores registados nos ensaios sem aplicação de caulino.

Em relação ao glutaraldeído, a presença de caulino nas suspensões celulares parece não ter interferido de forma explícita com a acção antimicrobiana do biocida. Esta constatação faz supor que nenhuma interacção glutaraldeído-caulino se desenvolveu a ponto de inviabilizar, no todo ou em parte, o efeito tóxico do glutaraldeído. A diminuição da redução de actividade, observada nos ensaios a pH 5 com a aplicação de 50 mg L<sup>-1</sup>, pode ser fundamentada recorrendo aos mesmos argumentos sugeridos para justificar o aumento de actividade bacteriana nos ensaios ao mesmo valor de pH, mas com a aplicação das menores concentrações de carbamato.

### 7.3 CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos é possível afirmar-se que a aplicação de ambos os biocidas às suspensões bacterianas reduz a actividade respiratória das bactérias *P. fluorescens*. No entanto, regra geral, a redução de actividade obtida com a adição de glutaraldeído é muito superior à obtida com a aplicação de carbamato. Este facto demonstra

que, em termos de efeito letal, e nas condições testadas, o glutaraldeído apresenta uma eficiência antimicrobiana bastante mais acentuada que o carbamato.

Os resultados também evidenciam que as partículas de caulino interferem com o desempenho dos biocidas, interferência essa pouco marcada ou mesmo insignificante no caso do glutaraldeído e mais declarada e significativa com a aplicação de carbamato, pois a eficiência do carbamato diminuiu nos ensaios com a argila.

Os resultados obtidos mostram igualmente que a presença de partículas de caulino nas suspensões celulares estimula claramente a actividade respiratória das bactérias *P. fluorescens*, mesmo quando as suspensões bacterianas estavam inicialmente tamponadas a diferentes valores de pH (5, 7 e 9). Esta acção estimuladora foi observada em todos os pH testados, sendo, todavia, mais significativa nos ensaios realizados a pH 5 e 9. Estes factos demonstram, indubitavelmente, que outros mecanismos, para além da manutenção do pH à volta de um valor propício ao crescimento microbiano, estão envolvidos no aumento da actividade respiratória das bactérias.

Testes paralelos demonstraram que o caulino possui a capacidade de remoção do carbamato do meio de cultura, diminuindo conseqüentemente a concentração em solução disponível para as bactérias. Este efeito de remoção parece estar associado ao fenómeno de adsorção química, resultando na formação de novas moléculas não tóxicas.

Esta possibilidade talvez fundamente que a menor acção antimicrobiana do carbamato, observada nos ensaios com partículas de caulino, possa ser atribuída à adsorção deste à argila.

As diferentes configurações espaciais adoptadas pelo caulino em função do valor de pH do meio, “castelo de cartas” e “baralho de cartas”, podem explicar, em parte, os resultados obtidos. A configuração “castelo de cartas” representa um sistema com uma área superficial bastante elevada, na qual podem ser estabelecidos microambientes favoráveis aos microrganismos. Contudo, os mecanismos detalhados envolvidos nestes fenómenos não são claros, pelo que será necessária investigação mais pormenorizada.

Os resultados, principalmente os referentes à perda de eficiência do carbamato sobre as bactérias *P. fluorescens* em consequência da presença de caulino, sugerem que nos sistemas industriais novas implicações práticas poderão emergir, uma vez que as argilas, muito

frequentes nos sistemas de água, podem interferir com o programa de controlo microbiano efectuado por biocidas, nomeadamente a sua dose e período de adição.

## 7.4 BIBLIOGRAFIA

- Amin, S. e Jayson, G. G. 1996. Humic substance uptake by hydrotalcites and pils. *Wat Res*, 2, 299-306.
- Burns, R. G. 1975. Factors affecting pesticide loss from soil. In: Paul E. A. e McLaren A. D. eds. *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 103-141.
- Burns, R. G. 1979. Interaction of microorganisms, their substrates and their products with soil surfaces. In: Ellwood, D. C., Melling, J. e Rutter, P. eds. *Microorganisms and Soil Surfaces*. New York, Academic, 109-138.
- Burns, R. G. 1989. Microbial and enzyme activities in soil biofilms. In: Characklis WG and Wilderer A, eds. *Structure and function of biofilms*. A Wiley-Interscience Publication, 333-349.
- Castellar, M. R., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S., Iborra, J. L. 1998. Effect of zeolite addition on ethanol production from glucose by *Saccharomyces bayanus*. *J Chem Technol Biotechnol* 73, 377-384.
- Cloete, T. E., Brözel, V. S., De Bruyn, E. E. e Pietersen, B. 1994. Optimisation of biofouling control in industrial water systems. Water Research Commission Report n° 318/1/94. South Africa.
- Dhir, V. K. e Dodd, C. E. R. 1995. Susceptibility of suspended and surface-attached Salmonella enteritidis to biocides and elevated temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1731-1738.
- Eagar, R. G., Leder, J. and Theis, A. B. 1986. Glutaraldehyde: factors important for microbiocidal efficacy. 3rd Conference on Progress in Chemical Disinfection, Binghamton, NY, 3-5 April
- Gaylarde, C. C. e Morton, L. H. G. 1999. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. *Biofouling*, 14(1), 59-74.
- Hattori, T. 1973. *Microbial Life in the Soil*. Marcel Dekker, INC. New York, USA.
- Heinzel, M. 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 225-234.
- Holah, J. T., Lavaud, A., Peters, W. e Dye, A. K. 1998. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 272-279.
- Huang, C. e Yang, Y-L. 1995. Adsorption characteristics of Cu(II) on humus-kaolin complexes. *Wat Res*, 11, 2455-2460.
- Janczuk, B., Chibowski, E., Hajnos, M., Bialopiotrowicz, T. e Stawinski, J. 1989. Influence of exchangeable cations on the surface free energy of kaolinite as determined from contact angles. *Clays and Clay Minerals*, 37, 269-272.
- LeChevallier, M. W., Lowry, C. D. e Lee, R. G. 1990. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *Research and Technology*. JAWWA, 87-99.
- Lutey, R. W. 1995. Process cooling water. In: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 51-82.
- Macura, J. e Stotzky, G. 1980. Effect of montmorillonite and kaolinite on nitrification in soil. *Folia Microbiol.* 25, 90-105.
- Mateen, A., Chapalamadugu, S., Kaskar, B., Bhatti, A. R. e Chaudhry, G. R. 1994. Microbial metabolism of carbamate and organophosphate pesticides. In: Chaudhry, G. R., ed. *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. Chapman & Hall, 198-233.

- McFeters, G. A., Yu, F. P., Pyle, B. H. e Stewart, P. S. 1995. Physiological methods to study biofilm disinfection. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 333-338.
- Michaels, A. e Bolger, J. C. 1962. Settling rates and sediments volumes of flocculated kaolin suspensions. *I&EC Fundamentals*, 1, 24-32.
- Nichols, W. W. 1989. Susceptibility of biofilms to toxic compounds. In: Characklis, W. G. e Wilderer, A. eds. *Structure and function of biofilms*. A Wiley-Interscience Publication, 321-331.
- Paulus, W. 1993. *Microbicides for the Protection of Materials - A Handbook*. Chapman and Hall, London.
- Srinivasan, R., Stewart, P. S., Griebe, T., Chen, C.-I. e Xu, X. 1995. Biofilm parameters influencing biocide efficacy. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 553-560.
- Stewart, P. S., Griebe, T., Srinivasan, R., Chen, C.I., Yu, F. P., deBeer, D. e McFeters, G. A. 1994. Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1690-1692.
- Stotzky, G. 1966. Influence of clay minerals on microorganisms, II effect of various clay species, homoionic clays, and other particles on bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 12, 831-848.
- Stotzky, G. 1986. Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses. In: Huang, P. M. e Schnitzer, M. eds. *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. SSSA Special Publication nº 17, USA, 305-428.
- Streng, K. e Sontag, H. 1987. *Coagulation kinetics and structure formation*, Plenum Press, New York, 137- 158.
- Walsh, S. E., Maillard, J.-Y., Simons, C. e Russel, A. D. 1999. Studies on the mechanisms of the antibacterial action of ortho-phthaldehyde. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 702-710.
- Walsh, S. E., Maillard, J.-Y. e Russel, A. D. 1999. Ortho-phthaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 1039-1046.
- Walter, A., J., Jassim, S. A. A., Holah, J. T., Denyer, S. P. e Stewart, G. S. A. B. 1992. Bioluminescent *Listeria monocytogenes* provide a rapid assay for measuring biocide efficacy., *FEMS Microbiol.*, 91, 251-256.
- Tashiro, H., Numakura, T., Nishikawa, S. e Miyaji, Y. 1991. Penetration of biocides into biofilm. *Wat Sci. Tech.*, 23, 1395-1403.
- Yu, F. P. e McFeters, G. A. 1994. Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2462-2466.

## 8. ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA DE *P. fluorescens* EM BIOFILMES: EFEITO DOS BIOCIDAS E DAS PARTÍCULAS DE CAULINO

---

### Sumário

Os microrganismos organizados em biofilme são mais resistentes à acção agressiva dos agentes antimicrobianos do que quando se desenvolvem de forma dispersa nos sistemas aquosos.

Neste capítulo investiga-se o efeito dos biocidas, carbamato e glutaraldeído, em biofilmes formados pela *P. fluorescens*. Simultaneamente, também se estuda se a presença de partículas de caulino durante o período de formação dos biofilmes afecta a sua formação e actividade respiratória específica. A possível interferência das mesmas partículas de argila, quando incorporadas nos biofilmes, no desempenho antibacteriano dos biocidas também é avaliado.

Também se inclui neste capítulo a comparação do efeito de ambos os biocidas na actividade respiratória das bactérias constituídas em biofilme com o observado quando as mesmas bactérias se desenvolveram em suspensão.

8.1 Introdução	152
8.2 Objectivos do trabalho	152
8.3 Efeito do caulino na formação e actividade de biofilmes de <i>P. fluorescens</i>	153
8.4 Efeito dos biocidas em biofilmes de <i>P. fluorescens</i> desenvolvidos na ausência e na presença de caulino	164
8.5 Conclusões	178
8.6 Bibliografia	179

---

## 8.1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas industriais, principalmente naqueles que necessitam de grandes volumes de água, é vulgar o aparecimento de uma grande variedade de partículas de origem abiótica (areias, argilas, gesso, sedimentos), uma vez que a água necessária para os seus processos produtivos é, usualmente, captada directamente de lagos e rios.

A existência de partículas de natureza abiótica nos sistemas de água dos processos produtivos pode conduzir ao desenvolvimento de depósitos de sujamento constituídos por um misto de material biológico e inorgânico (Vieira e Melo, 1995). De facto, durante o processo de formação de um biofilme, as partículas abióticas podem ser capturadas pelas EPS e passar a integrar a matriz dos biofilmes (Bouwer, 1987; Drury *et al.*, 1993; Schmitt e Flemming, 1999).

A presença de pequenas partículas inorgânicas nos depósitos pode conduzir a alterações na estrutura e actividade do biofilme (Bouwer, 1987) e, por conseguinte, interferir com a eficiência das substâncias químicas antimicrobianas frequentemente utilizadas no combate aos biofilmes. Srinivasan *et al.* (1995), por exemplo, referem que biofilmes desenvolvidos na presença de partículas abióticas (caulino e carbonato de cálcio) foram mais resistentes à acção da monocloramina do que os biofilmes formados na ausência das mesmas partículas.

As possíveis interferências das partículas abióticas com as substâncias antimicrobianas assumem particular importância, pois podem originar adicionais implicações de ordem prática, não consideradas na fase de planeamento do programa de controlo de biofilmes. Essas implicações podem obrigar a reformular a estratégia de controlo, nomeadamente no que concerne à dose de biocida a aplicar, ao modo de aplicação e à duração do tratamento.

## 8.2 OBJECTIVOS DO TRABALHO

Pretendeu-se, com estes ensaios, conhecer a acção de ambos os biocidas, carbamato e glutaraldeído, na viabilidade celular de biofilmes formados pelas bactérias *Pseudomonas fluorescens*. Simultaneamente, e no seguimento dos resultados obtidos com a mesma estirpe em suspensão (Capítulo 7), também se procurou determinar se a presença de partículas de

caulino durante o período de formação de biofilmes afectava a sua formação e actividade respiratória e verificar se essas mesmas partículas, quando incorporadas nos biofilmes, interferiam com o desempenho antibacteriano dos biocidas.

### **8.3 EFEITO DO CAULINO NA FORMAÇÃO E ACTIVIDADE DE BIOFILMES DE *P. fluorescens***

Para uma correcta avaliação da eficácia dos biocidas quando aplicados no controlo de biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos na presença e na ausência de caulino, julgou-se de primordial importância investigar, em primeira instância, a possibilidade das partículas de caulino, quando incorporadas num biofilme, poderem, só por si, interferir com a sua estrutura e actividade e, por consequência, afectar de algum modo o efeito dos biocidas sobre os biofilmes.

#### **8.3.1 Metodologia experimental**

O efeito dos biocidas no controlo de biofilmes desenvolvidos na ausência e na presença de partículas de caulino foi avaliado pela determinação da actividade respiratória específica das bactérias *P. fluorescens*, constituídas nesses biofilmes, antes e após a adição dos biocidas e para diferentes tempos de exposição. A actividade respiratória foi quantificada através da determinação da taxa de consumo de oxigénio necessário para degradar glicose em solução.

Os biofilmes foram desenvolvidos sobre placas de aço inox inseridas em células de fluxo de acordo com o descrito no Sub-capítulo 4.6.

##### *8.3.1.1 Formação de biofilmes*

Para avaliação do papel do caulino na formação e actividade respiratória de biofilmes, promoveu-se a formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* na ausência e na presença das partículas de caulino. Estes biofilmes foram conseguidos pela circulação em regime laminar ( $Re$  próximo de 1000 e velocidade igual a  $0.1 \text{ m s}^{-1}$ ) de suspensão celular (obtida de acordo com o descrito no Sub-capítulo 4.5.2) no interior de células de fluxo contendo várias placas de adesão (Sub-capítulo 4.6).

O desenvolvimento de biofilmes com incorporação de partículas de argila foi conseguido pela adição contínua de uma corrente de caulino ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) ao tanque de mistura, por forma a obter-se uma suspensão mista em bactérias e caulino. Pretendeu-se, deste modo, forçar o desenvolvimento de biofilmes com uma fracção inorgânica artificial. A suspensão de caulino foi previamente preparada e mantida em agitação constante durante todo o período de formação do biofilme.

Os biofilmes foram desenvolvidos durante aproximadamente doze dias, tendo-se, durante este período de tempo, procedido a amostragens periódicas de biofilme para subsequente avaliação da sua composição e actividade.

Para uma maior simplicidade de escrita, convencionou-se chamar *biofilmes mistos* aos biofilmes formados pela circulação da suspensão celular enriquecida com as partículas de argila e *biofilmes simples* aos biofilmes resultantes da circulação somente da suspensão bacteriana.

#### 8.3.1.2 Amostragem do sistema experimental

A amostragem de biofilme foi efectuada pela remoção de placas de adesão (no mínimo duas para cada intervalo de tempo) de cada uma das células de fluxo, ao longo do tempo, e consequente substituição por outras limpas. A remoção das placas de adesão fez-se sempre em sentido descendente, a partir do topo de cada célula de fluxo, sem interrupção da circulação da suspensão celular, pois esta, durante o período de amostragem, foi desviada para a porta de saída imediatamente abaixo da placa de adesão que se pretendeu remover. Com esta metodologia procurou-se reduzir ao mínimo as perturbações infligidas aos biofilmes depositados nas demais placas de adesão, acomodadas nas células de fluxo, em consequência da abertura do sistema experimental.

Imediatamente após as placas de adesão terem sido removidas das células de fluxo, o biofilme acumulado em cada uma das placas foi removido fisicamente (raspagem por recurso a uma espátula) ressuspendido em 10 mL de solução de tampão fosfato pH 7 (Sub-capítulo 4.1.3) e reservado para imediata avaliação da actividade respiratória.

### 8.3.1.3 *Determinação da actividade respiratória específica dos biofilmes*

As várias suspensões de biofilme, resultantes da remoção física do biofilme das placas de adesão, foram transferidas para as câmaras de reacção do respirómetro, devidamente termostalizadas a  $27\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , com o intuito de se avaliar a actividade respiratória das bactérias integrantes desses biofilmes, de acordo com o método referenciado no Sub-capítulo 4.7.4. Após a obtenção da curva correspondente à respiração endógena, foi injectado em cada uma das câmaras do respirómetro 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de glicose de concentração  $50\text{ mg L}^{-1}$ , para determinação da taxa de respiração total. A actividade respiratória específica dos biofilmes foi expressa em massa de  $\text{O}_2$  consumido por unidade de biomassa presente no biofilme (medida em termos de SVT) e por unidade de tempo. Findo o ensaio de respirometria, o conteúdo de cada câmara de reacção do respirómetro foi recolhido e reservado para posterior caracterização física dos biofilmes.

### 8.3.1.4 *Caracterização física dos biofilmes*

O peso seco de cada biofilme formado nas placas de adesão foi estimado determinando os sólidos totais das respectivas suspensões de biofilme, de acordo com o procedimento referido no Sub-capítulo 4.7.5.3.

A biomassa bacteriana presente em cada amostra de biofilme removido das células de fluxo foi quantificada pela determinação do seu teor em sólidos voláteis totais (Sub-capítulo 4.7.5.5).

O peso húmido de cada biofilme foi avaliado imediatamente após a sua remoção das células de fluxo, de acordo com o descrito no Sub-capítulo 4.7.5.1. Este parâmetro foi conseguido subtraindo o peso húmido do conjunto placa de adesão+biofilme, imediatamente após a sua remoção das células de fluxo, ao peso de cada placa de adesão (previamente determinado antes da sua colocação nas células de fluxo como sendo aproximadamente igual a  $631\text{ mg} \pm 18\text{ mg}$ ).

A fracção de água retida em cada uma das amostras de biofilme foi quantificada de acordo com o descrito no Sub-capítulo 4.7.5.4.

### 8.3.1.5 Construção das curvas de acumulação de biofilme

As curvas de acumulação de biofilme (massa húmida de biofilme *versus* tempo) foram obtidas pelo ajuste dos dados experimentais, *i.e.* os valores de massa húmida de biofilme ao longo do tempo, ao modelo global de desenvolvimento de biofilme proposto por Melo e Vieira (1999) através da seguinte equação:

$$m_f = m_f^\infty [1 - \exp(-\beta t)] \quad (8.1)$$

em que  $m_f$  representa a massa húmida de biofilme em cada instante de tempo;  $m_f^\infty$  define o valor máximo de massa húmida de biofilme acumulada, no estado pseudo-estacionário (isto é, o valor assintótico de  $m_f$  quando  $t \rightarrow \infty$ ) e o inverso de  $\beta$  representa uma medida indirecta da resistência mecânica do biofilme ao desprendimento.

Esta equação é análoga à tradicionalmente usada para descrever o desenvolvimento do sujamento inorgânico (Bott, 1995).

### 8.3.1.6 Avaliação do aumento da actividade respiratória

O efeito do caulino na actividade respiratória das bactérias *P. fluorescens* integrantes de cada biofilme foi avaliado quantitativamente em termos de aumento da actividade respiratória, tendo por referência a actividade respiratória obtida, para cada intervalo de tempo, nos biofilmes formados na ausência de caulino. Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados com base na seguinte equação:

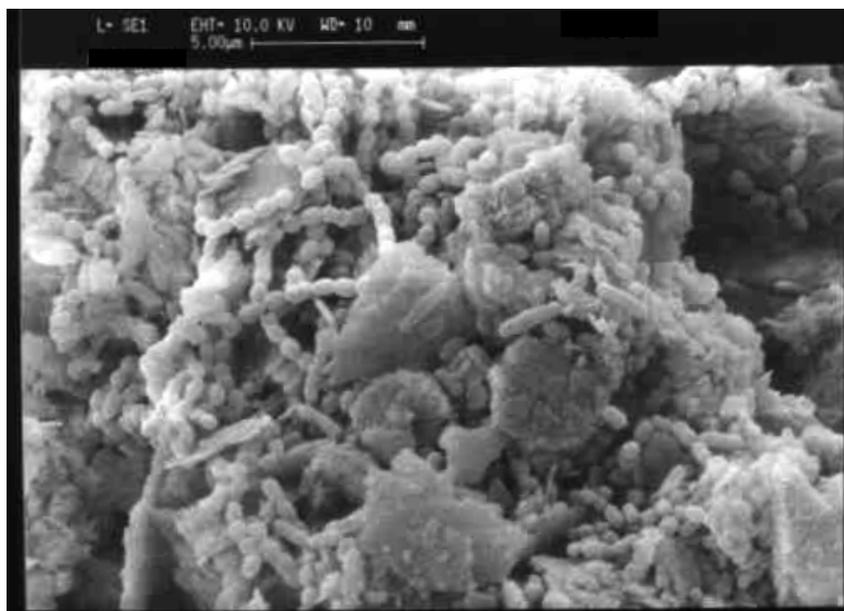
$$\% \text{ Aumento} = \frac{OUR_{\text{caulino}} - OUR_{\text{controlo}}}{OUR_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (8.2)$$

em que  $OUR_{\text{controlo}}$  representa a taxa específica de consumo de oxigénio necessário para oxidar a glicose nos ensaios de controlo, *i.e.*, nos ensaios conducentes à formação de biofilmes na ausência de caulino, e  $OUR_{\text{caulino}}$  representa a mesma taxa específica obtida com os biofilmes mistos, para os mesmos intervalos de tempo.

### 8.3.2 Resultados e Discussão

Com estes testes procurou-se investigar se, à semelhança do obtido nos ensaios em suspensão (Capítulo 7), o caulino interferia de algum modo com a formação e actividade de biofilmes de *P. fluorescens*. Para tal, promoveu-se o desenvolvimento de biofilmes ao longo do tempo em células de fluxo, através da circulação de suspensão celular, em ensaios preliminares, e pela circulação da suspensão celular enriquecida em caulino, em ensaios subsequentes.

Na Figura 8.1 apresenta-se um registo fotográfico, obtido por microscopia electrónica de varrimento (SEM), de um biofilme de *P. fluorescens* desenvolvido pela circulação de suspensão celular enriquecida com partículas de caulino.

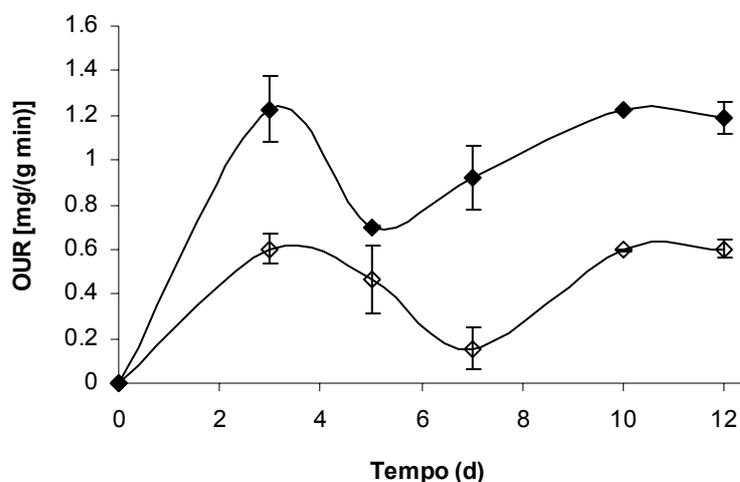


**Figura 8.1** Imagem digitalizada de uma fotografia de microscopia electrónica de varrimento de um biofilme misto desenvolvido durante cinco dias; (cortesia Filipa Lopes).

Esta imagem demonstra claramente que a circulação da suspensão celular enriquecida com caulino promove o desenvolvimento de biofilmes mistos, isto é, biofilmes constituídos por material orgânico, conjuntamente com partículas abióticas, uma vez que é evidente a existência de partículas de caulino incorporadas na estrutura do biofilme. Nesta fotografia não é possível observar-se claramente a matriz polimérica a envolver as células, pois o procedimento a que se submeteu esta amostra de biofilme para observação por SEM incluiu

a fixação com glutaraldeído. Consequentemente, a estrutura do biofilme foi alterada em resultado da interferência do glutaraldeído com a matriz polimérica (Azeredo *et al*, 1999).

Os resultados referentes à actividade respiratória (Figura 8.2) indicam que a presença de partículas de caulino altera substancialmente o comportamento das bactérias presentes nos biofilmes pois a actividade respiratória específica é, para todos os intervalos de tempo, significativamente superior nos biofilmes formados na presença da argila (98% de confiança para 4 graus de liberdade).



**Figura 8.2** Actividade respiratória específica de biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino.

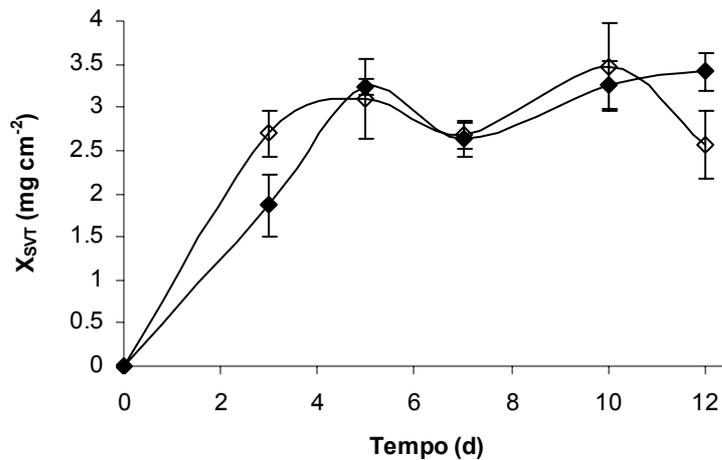
Esta constatação é reforçada pela Tabela 8.1 que, para cada intervalo de tempo, apresenta o aumento percentual de actividade respiratória observada nos biofilmes formados a partir da circulação da suspensão celular mista nas células de fluxo. Estas percentagens foram calculadas tendo como base a actividade respiratória específica obtida, para os mesmos instantes de tempo, com os biofilmes formados somente com a suspensão celular, isto é, na ausência de caulino, de acordo com a Equação 8.2.

**Tabela 8.1** Aumento da actividade respiratória dos biofilmes de *P. fluorescens* devido à presença de caulino, obtida de acordo com a Equação 8.2; valores médios  $\pm$  desvio padrão

Tempo (d)	Aumento da actividade respiratória (%)
3	50.9 ( $\pm$ 8.8)
5	34.0 ( $\pm$ 12.7)
7	83.4 ( $\pm$ 10.5)
10	51.3 ( $\pm$ 3.8)
12	49.4 ( $\pm$ 4.9)

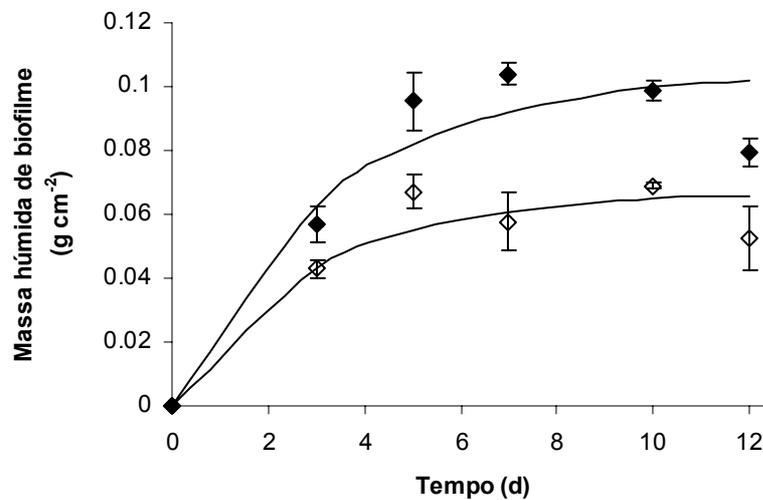
Estes resultados mostram inequivocamente que o efeito estimulador do caulino também se faz sentir quando as bactérias estão constituídas em biofilme. Refira-se até que este efeito parece ser mais significativo quando as bactérias formam biofilme do que quando se desenvolvem em suspensão, pois, para condições experimentais similares, as percentagens de aumento da actividade respiratória são, regra geral, maiores do que as obtidas nos ensaios em suspensão (Tabela 7.3).

As curvas de biomassa de cada biofilme ao longo do tempo (Figura 8.3) asseguram que o aumento acentuado da actividade respiratória dos biofilmes desenvolvidos na presença de caulino não se deve a uma maior acumulação de material biológico sobre as placas de suporte pois a biomassa é, de uma maneira geral, similar em ambos os biofilmes, isto é, nos biofilmes formados sem a circulação de caulino (biofilmes simples) e nos biofilmes desenvolvidos na presença do mesmo (biofilmes mistos).



**Figura 8.3** Biomassa ( $X_{SVT}$ ) presente nos biofilmes de *P. fluorescens*, desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino.

As curvas de massa húmida dos biofilmes, quer simples quer mistos, ao longo do tempo, estão patentes na Figura 8.4.



**Figura 8.4** Evolução da massa húmida ( $m_f$ ) dos biofilmes de *P. fluorescens*, desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino.

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo matemático de acumulação de biofilme desenvolvido por Melo e Vieira (1999), já que definiam uma tendência assintótica evidente. A análise desta figura revela que os perfis de massa de biofilme ao longo do tempo descrevem curvas típicas de acumulação de biofilme (Bott, 1995); as

flutuações observadas podem ser atribuídas a fenómenos naturais intrínsecos ao próprio processo de formação de biofilme.

Pela observação da Figura 8.4 também é possível verificar-se que os biofilmes desenvolvidos na presença de partículas de caulino possuem maiores teores de massa húmida, comparativamente com os biofilmes simples. Em termos estatísticos, pode-se assegurar com 99% de confiança (para 4 graus de liberdade) que a massa húmida dos biofilmes mistos é significativamente superior à massa húmida dos biofilmes simples.

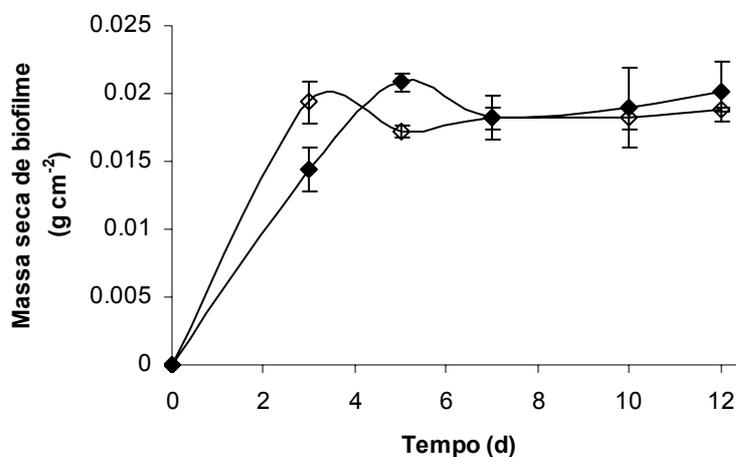
Em consequência do ajuste dos valores experimentais de massa húmida de biofilme *versus* tempo ao modelo matemático de acumulação de biofilme (Melo e Vieira, 1999), foi possível determinar-se, segundo a Equação 8.1, os valores máximos de massa húmida de biofilme acumulado sobre as placas de aço inox ( $m_f^\infty$ ), quando os biofilmes atingiram o estado pseudo-estacionário, bem como o factor proporcional à resistência mecânica dos biofilmes ao desprendimento ( $1/\beta$ ). Estes parâmetros, reunidos na Tabela 8.2, indicam que: i) no estado pseudo-estacionário, a quantidade máxima de massa húmida dos biofilmes mistos é indubitavelmente superior à observada nos biofilmes simples; ii) a incorporação de caulino nos biofilmes parece desenvolver nestes uma maior resistência ao seu desprendimento, uma vez que o parâmetro  $1/\beta$  é superior nos biofilmes mistos quando comparado com o obtido nos biofilmes simples.

**Tabela 8.2** Efeito da presença de caulino no valor máximo de massa de biofilme acumulado ( $m_f^\infty$ ) e no valor do factor de resistência do depósito ao desprendimento ( $1/\beta$ ), determinados de acordo com a Equação 8.1; valores médios  $\pm$  desvio padrão

Parâmetro	Biofilme	
	Ausência de caulino	Presença de caulino
$m_f^\infty$ (g cm <sup>-2</sup> )	0.067 ( $\pm$ 0.012)	0.105 ( $\pm$ 0.062)
$1/\beta$ (d)	2.94	3.33

Os perfis de massa seca de biofilme, quer simples quer misto, ao longo do tempo denunciam uma tendência diferente da observada com as curvas de biofilme construídas com base nos valores de massa húmida. Com efeito, se se comparar a curva de massa seca

de biofilme simples *versus* tempo com a correspondente curva de massa seca de biofilme misto (Figura 8.5) facilmente se conclui que estas não diferem significativamente.



**Figura 8.5** Evolução da massa seca dos biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos nas células de fluxo na ausência (◇) e na presença (◆) de partículas de caulino.

Uma análise comparativa das Figuras 8.3 e 8.5 permite constatar que os biofilmes desenvolvidos neste estudo possuem uma fracção inorgânica muito elevada, pois a massa seca dos biofilmes (avaliada em termos de ST) é, grosso modo, cerca de 10 vezes superior à respectiva biomassa (medida em SVT). Em biofilmes formados em condições laboratoriais é pouco frequente o desenvolvimento de biofilmes com fracções inorgânicas desta grandeza. Pensa-se que esta ocorrência possa ter sido devida ao facto da solução de nutrientes, para alimentação da suspensão celular, ter sido sistematicamente preparada com água da torneira não filtrada. À luz deste acontecimento, será conveniente referir que o termo *depósito*, em vez do termo *biofilme*, talvez fosse o mais adequado para definir o material acumulado nas várias placas de adesão. Para não gerar confusão vai-se, contudo, continuar a adoptar o termo *biofilme*.

Se se confrontar os dados da Figura 8.5 com os da Figura 8.4, isto é, se aliarmos a não existência de diferenças significativas ao nível da massa seca presente nos biofilmes mistos e nos biofilmes simples com as diferenças significativas observadas em termos de massa húmida, facilmente se pressupõe que os biofilmes mistos incorporam maior quantidade de água. Com efeito, a quantidade de água retida nos biofilmes mistos é superior (95% de confiança para 4 graus de liberdade) à registada nos biofilme simples (Tabela 8.3).

**Tabela 8.3** Percentagem de água retida nos biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos na presença e na ausência de caulino; valores médios  $\pm$  desvio padrão

Tempo (d)	% de água no biofilme	
	Sem caulino	Com caulino
3	54.9 ( $\pm$ 6.3)	74.7 ( $\pm$ 6.8)
5	74.3 ( $\pm$ 10.2)	78.2 ( $\pm$ 7.8)
7	68.3 ( $\pm$ 8.2)	82.5 ( $\pm$ 3.3)
10	73.6 ( $\pm$ 5.4)	80.8 ( $\pm$ 7.2)
12	64.2 ( $\pm$ 3.7)	74.7 ( $\pm$ 4.9)

Todavia, a fracção de água, quer dos biofilmes simples quer dos mistos, fica um tanto ou quanto aquém das percentagens normalmente referenciadas para biofilmes (Christensen e Characklis, 1990; Flemming, 1993; Azeredo e Oliveira, 2000). Este facto explica-se se tivermos em conta que os biofilmes mistos e simples possuem fracções inorgânicas significativas. Consequentemente, os poros e canais do biofilme onde a água podia estar retida estão parcialmente ocupados pelas partículas inorgânicas. Os biofilmes mistos, mesmo assim, possuem maior quantidade de água porque, para além do teor mineral proveniente da solução de nutrientes, incorporaram também partículas de caulino. Estas, devido à sua configuração espacial, podem ter contribuído para o aumento da formação de poros e canais no interior da matriz polimérica dos biofilmes, o que, comparativamente, conduziria a uma maior retenção de água.

A existência de quantidades apreciáveis de água nos biofilmes é crucial para os processos biológicos que acontecem no seu interior, pois é através da água que se difundem os nutrientes para o interior do filme biológico e se eliminam para o exterior da matriz polimérica os subprodutos resultantes do metabolismo bacteriano (Schmitt e Flemming, 1999). Consequentemente, a presença de maior quantidade de água nos biofilmes mistos pressupõe que haja uma facilidade acrescida de transporte dos nutrientes para as bactérias embebidas no interior da matriz polimérica, podendo-se, assim, justificar, em parte, os valores superiores da actividade respiratória observada nos biofilmes mistos, quando comparado com os obtidos nos biofilmes simples.

A incorporação da argila nos biofilmes pode também, adicionalmente, contribuir para o desenvolvimento de microambientes favoráveis no interior do biofilme, principalmente nas zonas mais próximas da superfície de adesão, já que, como sugerido no Capítulo 7, as argilas podem adsorver metabolitos tóxicos e trocar iões, exercer, por consequência, um efeito tampão local, beneficiando assim decisivamente o metabolismo bacteriano.

#### **8.4 EFEITO DOS BIOCIDAS EM BIOFILMES DE *P. fluorescens* FORMADOS COM E SEM CAULINO**

Para investigar o efeito dos biocidas em biofilmes, formados na ausência e na presença da argila, procedeu-se ao desenvolvimento de biofilmes durante cinco e dez dias, sem qualquer amostragem, findo os quais foram aplicados os biocidas.

##### **8.4.1 Metodologia experimental**

A metodologia experimental, no que corresponde à formação de biofilmes, determinação da actividade respiratória e caracterização física dos biofilmes, foi idêntica à descrita no sub-capítulo anterior (Sub-capítulo 8.3). Os biofilmes foram desenvolvidos simultaneamente em duas células de fluxo idênticas, operando exactamente nas mesmas condições, pela circulação de suspensão celular simples numa delas e pelo fluxo da mesma suspensão celular mas enriquecida com partículas de caulino na outra. Nestes ensaios procurou-se reproduzir, o mais fielmente possível, as mesmas condições operatórias implementadas nos ensaios de formação e avaliação de biofilmes formados na ausência e na presença de caulino, nomeadamente no que se refere à velocidade de circulação ( $u = 0.1 \text{ m s}^{-1}$ ), temperatura e pH da suspensão celular. Ao fim de 5 d e 10 d, e antes da aplicação dos biocidas, foram sempre retiradas algumas placas de adesão com o respectivo biofilme acumulado, que passaram a constituir o biofilme de controlo.

##### *8.4.1.1 Aplicação dos biocidas*

Os biocidas foram aplicados em circuito fechado, em choques de 30 min de 2 h em 2 h, num total de 3 choques, a um caudal idêntico ao de circulação da suspensão celular, tendo-se testado as concentrações de, respectivamente,  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de

glutaraldeído. Optou-se por estas concentrações partindo do pressuposto de que, face às expectáveis limitações difusionais oferecidas pelos biofilmes, só com as maiores concentrações de ambos os biocidas se obteriam resultados apreciáveis na viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes. Com a aplicação dos biocidas em choque procurou-se reproduzir o modo de aplicação de biocidas mais usual em termos industriais.

Durante o período de aplicação dos biocidas, a corrente de suspensão celular foi interrompida de maneira a garantir que, no interior das células de fluxo, só circulasse a solução de biocida sem bactérias suspensas e sem substrato. A circulação da suspensão celular foi retomada imediatamente após o término de cada choque de biocida.

#### 8.4.1.2 *Amostragem do sistema experimental*

Findo o período de desenvolvimento, durante o qual nenhuma amostra de biofilme foi removida, o biofilme acumulado sobre as várias placas de adesão foi sujeito à agressão dos biocidas pela aplicação de 3 choques sucessivos intervalados de 2 h. Imediatamente após cada um dos choques, de cada célula de fluxo foram cuidadosamente retiradas placas de adesão com o biofilme formado, a fim de se avaliar a actividade respiratória específica e de se proceder à caracterização física de tais biofilmes. Novamente, a amostragem foi conduzida no sentido descendente. Antes da aplicação dos biocidas, foram sempre retiradas algumas placas de adesão com biofilme que, após avaliação e caracterização da camada biológica acumulada, passaram a constituir o referencial de controlo.

#### 8.4.1.3 *Avaliação da redução da actividade*

O efeito dos biocidas na actividade respiratória específica das bactérias *P. fluorescens* foi avaliado em termos de redução da actividade respiratória específica, tendo por referência a actividade respiratória obtida, em cada ensaio, no biofilme das placas de controlo, isto é, no biofilme retirado antes da aplicação dos biocidas. Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{OUR_{\text{controlo}} - OUR_{\text{choque}}}{OUR_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (8.3)$$

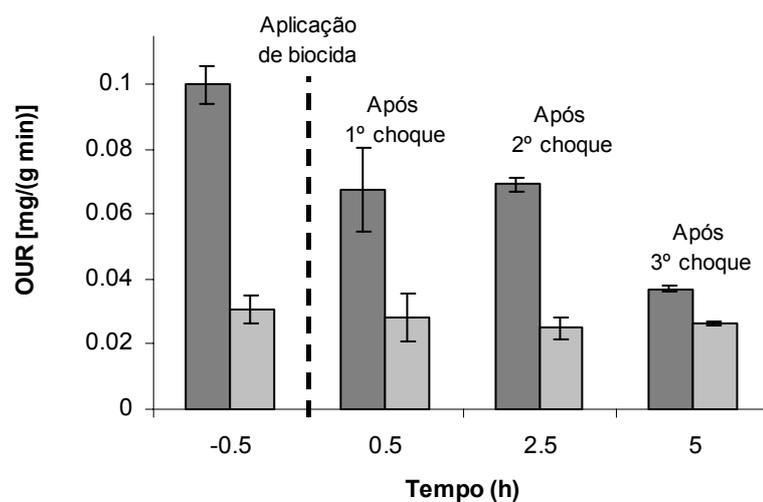
em que  $OUR_{\text{controlo}}$  representa a taxa específica de consumo de oxigénio necessário para oxidar a glicose nos biofilmes de controlo e  $OUR_{\text{choque}}$  representa a mesma taxa específica obtida com os biofilmes após a aplicação dos choques de biocida.

#### 8.4.2 Resultados e Discussão

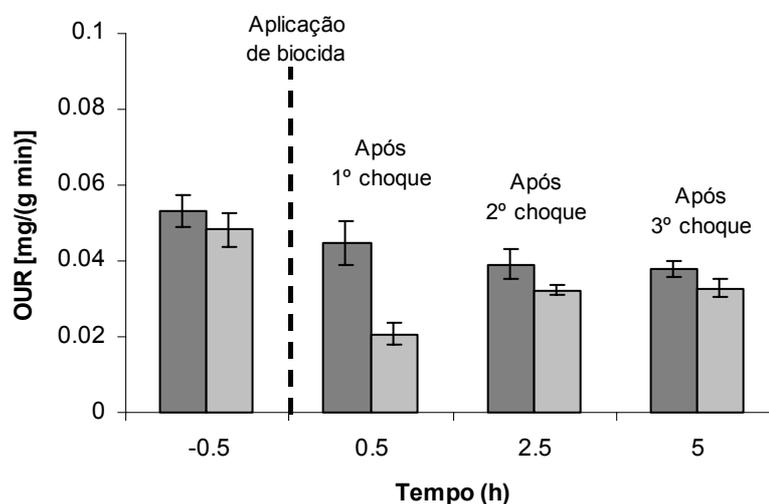
O efeito dos biocidas em biofilmes de *P. fluorescens* foi investigado promovendo, primeiramente, o desenvolvimento de biofilmes, com e sem a incorporação de partículas de caulino, durante diferentes períodos de tempo (5 d e 10 d), findo os quais se aplicaram os biocidas, respectivamente, 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato e 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído, em choques sucessivos de 30 min, intervalados de 2 h.

Os resultados referentes à actividade respiratória específica das bactérias embebidas nos biofilmes após a aplicação dos sucessivos choques de carbamato, e para os dois períodos de desenvolvimento dos biofilmes, são apresentados na Figura 8.6. Da análise da figura verifica-se que os biofilmes mistos, formados quer durante 5 d quer durante 10 d, apresentam actividade respiratória específica sempre superior à observada nos biofilmes simples, mesmo após a aplicação dos sucessivos choques de biocida. Esta constatação não é de todo surpreendente, pois esta tendência foi sempre observada nos testes de formação de biofilme ao longo do tempo, na presença e na ausência de caulino (Figura 8.2).

Tomando como referência a actividade observada nos biofilmes antes da aplicação do biocida ( $t = -0.5$  h), a Figura 8.6 mostra também, e de forma clara, que a aplicação em choque de carbamato se traduziu por uma diminuição da actividade respiratória específica das bactérias dos biofilmes, ainda que essa diminuição pareça ser, por vezes, pouco pronunciada.



(a)



(b)

**Figura 8.6** Actividade respiratória específica de biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (□) e na presença (■) de partículas de caulino, antes e após a aplicação em choque de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato.

Para uma mais efectiva avaliação da eficiência do carbamato, a redução da actividade bacteriana dos biofilmes, nas condições testadas, está expressa em percentagem na Tabela 8.4. Esta tabela foi construída com base na Equação 8.3, tomando-se como referência a actividade respiratória específica observada nos biofilmes antes destes serem sujeitos à acção do carbamato.

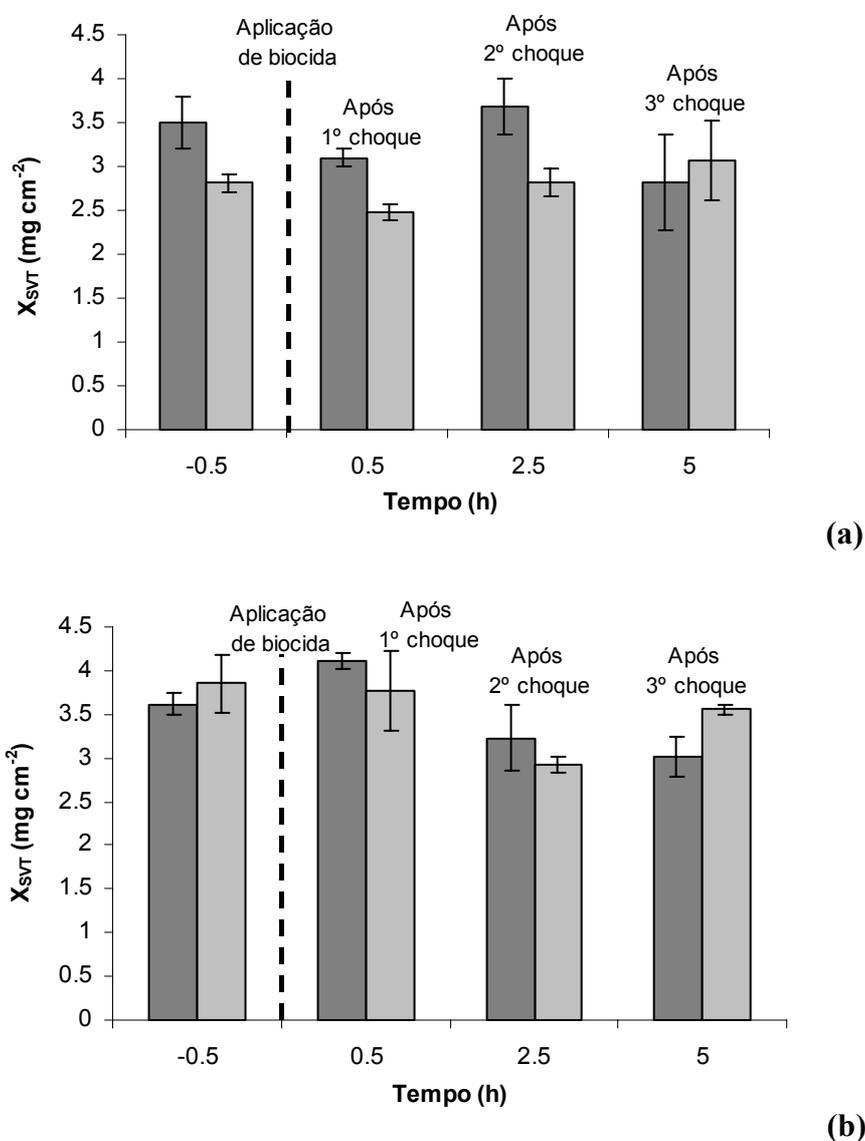
**Tabela 8.4** Redução da actividade respiratória específica dos biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos nas células de fluxo durante 5 d e 10 d, na ausência ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e na presença ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) de caulino, em consequência da aplicação de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato em choques sucessivos; valores médios  $\pm$  desvio padrão

	Redução da actividade respiratória (%)			
	Biofilme com 5 d		Biofilme com 10 d	
	Sem caulino	Com caulino	Sem caulino	Com caulino
1º choque	7.1 ( $\pm 19.2$ )	32.2 ( $\pm 5.9$ )	57.3 ( $\pm 7.2$ )	15.4 ( $\pm 10.9$ )
2º choque	18.2 ( $\pm 11.6$ )	30.7 ( $\pm 5.0$ )	32.9 ( $\pm 6.7$ )	26.1 ( $\pm 9.3$ )
3º choque	13.8 ( $\pm 12.3$ )	63.1 ( $\pm 2.4$ )	31.8 ( $\pm 8.3$ )	28.8 ( $\pm 4.2$ )

A observação desta tabela clarifica, de certo modo, as constatações anteriormente referidas pela análise da Figura 8.6. A actividade respiratória específica dos biofilmes é, de facto, sempre reduzida com a aplicação do biocida, ainda que essa redução seja por vezes pouco pronunciada, principalmente para os biofilmes simples desenvolvidos durante somente 5 d. O comportamento dos biofilmes mistos (isto é, formados na presença de caulino) face à agressão do carbamato é substancialmente diferente do comportamento observado nos biofilmes simples. Com efeito, com o aumento da idade do biofilme, o carbamato parece perder alguma eficiência contra os biofilmes mistos, pois a percentagem de redução da actividade respiratória diminui nos biofilmes de 10 d, relativamente à observada nos biofilmes desenvolvidos durante 5 d. A mesma tendência, contudo, não é observada nos biofilmes desenvolvidos na ausência de caulino, pois a acção do carbamato intensifica-se à medida que a idade do biofilme aumenta.

Sendo o carbamato um biocida de acção relativamente lenta (Lutey, 1995), esperar-se-ia que a eficácia do carbamato aumentasse com o número de aplicações. Este facto, contudo, não é claramente revelado pela Tabela 8.4, ainda que essa tendência seja observada nos biofilmes mistos, onde a redução de actividade aumenta, ainda que discretamente, com o número de choques. Nos biofilmes simples não se verifica, de todo, uma tendência crescente de eficácia com o aumento do tempo de contacto.

O efeito do carbamato na quantidade de biomassa presente nos biofilmes pode ser observado na Figura 8.7.



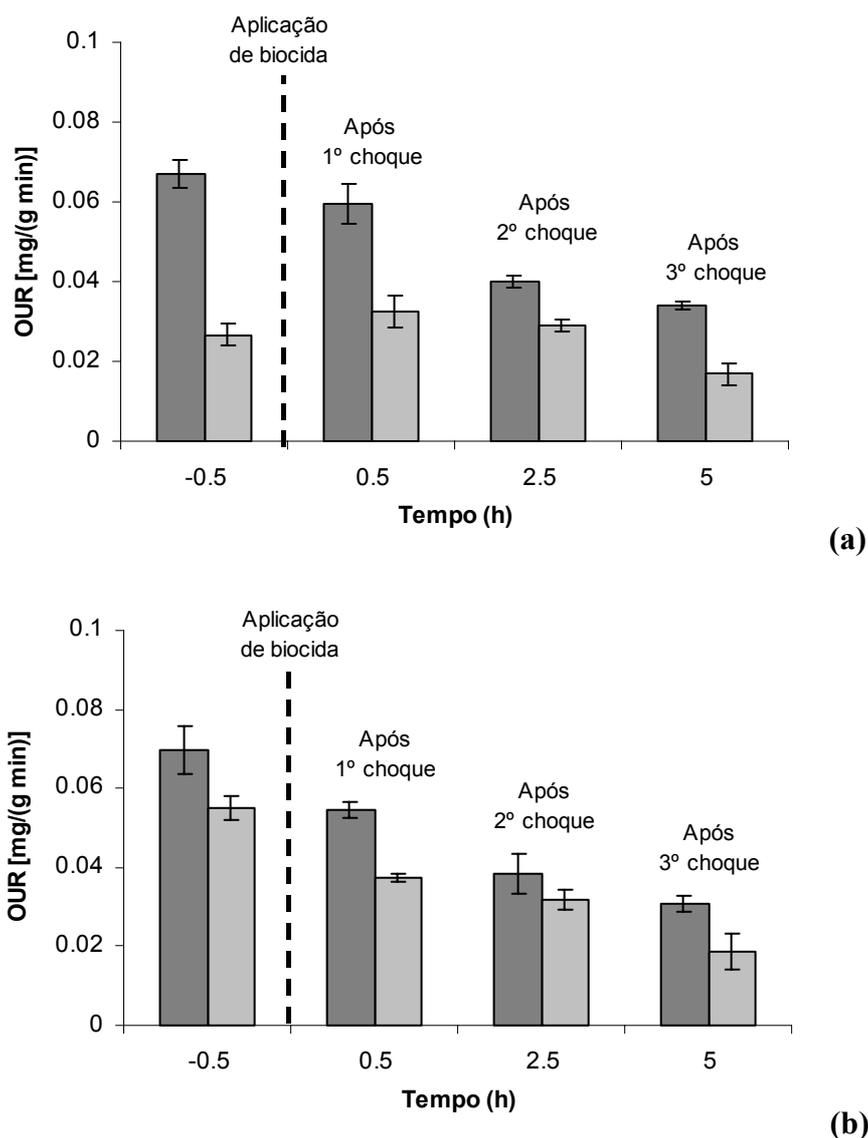
**Figura 8.7** Biomassa ( $X_{SVT}$ ) presente nos biofilmes de *P. fluorescens* desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d **(a)** e 10 d **(b)**, na ausência (□) e na presença (■) de partículas de caulino, antes e após a aplicação de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato em choques sucessivos.

Pela observação desta figura é possível verificar que a aplicação dos vários choques de carbamato não se traduziu em nenhuma redução significativa da biomassa presente nos biofilmes, quer nos biofilmes mistos quer nos simples, e para ambos os períodos de desenvolvimento. Em nenhuma das situações ensaiadas foi possível delinear-se claramente

uma tendência decrescente, em termos de biomassa, em consequência da aplicação do biocida, pelo que, à partida, se pode depreender que o carbamato não exerce nenhuma acção significativa na remoção de biofilme. As diferenças (oscilações) observadas serão mais resultado do próprio processo de desenvolvimento de biofilme, do que devido à acção agressiva do carbamato.

A evolução da actividade respiratória específica dos biofilmes, quer formados na ausência quer na presença de caulino, face à aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído em choques consecutivos, pode ser observada na Figura 8.8. Refira-se que, tal como nos testes realizados com a aplicação de carbamato, a actividade respiratória dos biofilmes mistos é sempre superior à observada nos biofilmes simples, ainda que estas diferenças sejam atenuadas à medida que o número de choques de biocida aumenta. Pela análise da Figura 8.8 é ainda possível constatar-se que a aplicação de glutaraldeído provoca a redução da actividade respiratória dos biofilmes, quer se tenham desenvolvido na presença ou na ausência de caulino, e para os dois períodos de desenvolvimento (5 d e 10 d). Esta redução, contrariamente ao observado com o carbamato, apresenta um carácter progressivo, isto é, aumenta, regra geral, com o número de aplicações de glutaraldeído.

Novamente, para uma melhor avaliação do desempenho deste biocida, quando aplicado a biofilmes, a redução da actividade respiratória foi expressa em termos de percentagem relativamente à actividade respiratória determinada nos biofilmes de controlo, isto é, nos biofilmes removidos e caracterizados antes da aplicação de glutaraldeído. Os valores, obtidos de acordo com a Equação 8.3, estão reunidos na Tabela 8.5.



**Figura 8.8** Actividade respiratória específica de biofilmes de *P. fluorescens*, desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (□) e na presença (■) de de partículas de caulino, antes e após a aplicação em choques sucessivos de 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído.

Os valores apresentados na Tabela 8.5 reforçam o anteriormente referido, isto é, a actividade respiratória dos biofilmes após o tratamento com o glutaraldeído é, de maneira geral, inferior à observada antes da aplicação do biocida, sendo esta diminuição da actividade incrementada com o aumento do número de choques. A excepção ocorre nos biofilmes desenvolvidos durante 5 d na ausência de caulino, pois nestes a actividade respiratória não diminuiu com a aplicação do 1º e 2º choque de glutaraldeído. Somente com o 3º choque se detectou uma redução acentuada da actividade respiratória.

**Tabela 8.5** Redução da actividade respiratória dos biofilmes de *P. fluorescens*, desenvolvidos nas células de fluxo durante 5 d e 10 d, na ausência ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e na presença ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) de caulino, em consequência da aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído em choques sucessivos; valores médios  $\pm$  desvio padrão

	Redução da actividade respiratória (%)			
	Biofilme com 5 d		Biofilme com 10 d	
	Sem caulino	Com caulino	Sem caulino	Com caulino
1º choque	–	11.6 ( $\pm 8.8$ )	31.9 ( $\pm 4.0$ )	21.8 ( $\pm 7.4$ )
2º choque	–	40.5 ( $\pm 4.0$ )	42.3 ( $\pm 5.5$ )	44.9 ( $\pm 8.5$ )
3º choque	37.1 ( $\pm 12.4$ )	49.4 ( $\pm 3.1$ )	66.0 ( $\pm 8.4$ )	56.6 ( $\pm 4.9$ )

O aumento da eficiência do glutaraldeído com o número de aplicações é um facto que se reveste de alguma surpresa, pois o glutaraldeído é um biocida de acção imediata (Paulus, 1993), pelo que, à partida, se esperaria um comportamento, em termos de redução de actividade, globalmente diferente, isto é, com uma acção já bastante significativa logo após os primeiros choques.

A eficácia do glutaraldeído aumenta com a idade do biofilme, isto é, com o período de tempo durante o qual se desenvolveram os biofilmes. Com efeito, a redução da actividade respiratória é superior nos biofilmes com 10 d, quer nos biofilmes simples quer nos mistos. Com a aplicação de carbamato esta tendência também foi verificada com os biofilmes desenvolvidos na ausência de caulino.

Este facto contraria, de certa maneira, a ideia quase generalizada de que biofilmes mais velhos seriam menos susceptíveis à acção antimicrobiana dos biocidas. Anwar e Strapp (1992), por exemplo, relatam várias situações em que biofilmes mais velhos de *P. aeruginosa*, comparativamente com biofilmes mais novos (desenvolvidos durante 1 d ou 2 d), apresentaram uma resistência considerável à acção bactericida de antibióticos.

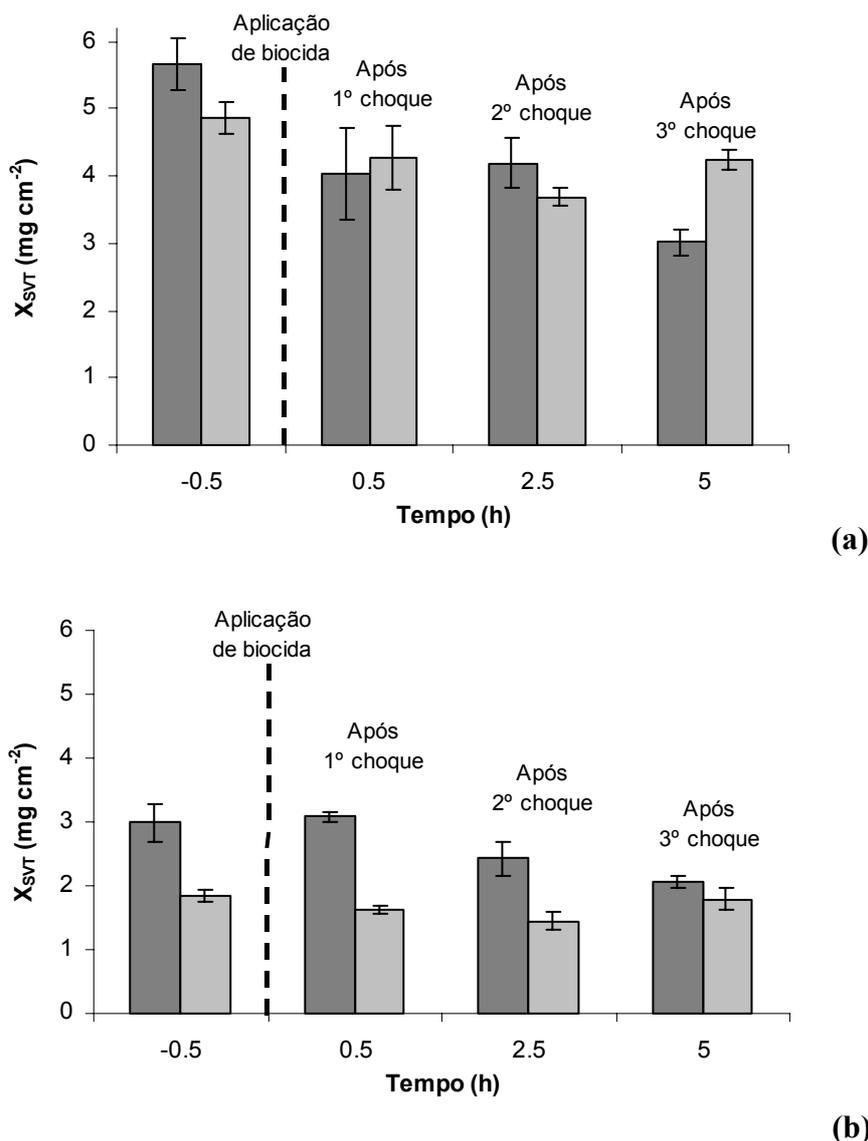
O desenvolvimento de uma matriz polimérica densa é a razão mais frequentemente evocada para fundamentar essa constatação. Com efeito, as bactérias mais profundamente embebidas numa matriz espessa têm menor acesso aos nutrientes e ao oxigénio, sendo,

consequentemente, metabolicamente menos activas e menos susceptíveis a agentes externos agressivos (Patel e Bott, 1991; Zhang e Bishop, 1994; Mittelman, 1998).

Em relação aos resultados obtidos, algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar a maior sensibilidade dos biocidas por parte dos biofilmes mais velhos. A idade dos biofilmes estudados, ainda que consideravelmente diferente (5 d e 10 d), pode já definir biofilmes considerados velhos, portanto, já com uma matriz polimérica bem definida, consequentemente, as diferenças deixariam de ser importantes. Os resultados também poderiam ser justificados se se considerasse, por analogia, que os biofilmes, quer de 5 d quer de 10 d, eram pouco espessos, uma vez que biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*, formados em condições experimentais similares, revelaram ser pouco espessos (Pereira *et al.*, 2001). Deste modo, a massa dos vários biofilmes não constituiria uma barreira efectiva à difusão do biocida no interior do depósito biológico

Os perfis de biomassa dos vários biofilmes, quer simples quer mistos, em função do número de choques de glutaraldeído (Figura 8.9), demonstram que a quantidade de biomassa dos biofilmes, de uma maneira geral, foi reduzida quando estes foram sujeitos à acção do biocida. Esta redução, contudo, é mais evidente e consistente nos biofilmes desenvolvidos na presença de caulino, quer durante 5 d quer durante 10 d, e mais ligeira nos biofilmes simples.

A diminuição de biomassa em consequência da aplicação do glutaraldeído, contrariamente ao observado com a adição de carbamato, pode-se explicar se se atender ao facto de que o glutaraldeído reage com a matriz extracelular dos biofilmes (Azeredo *et al.*, 1999) contribuindo para a sua remoção e, por consequência, para a diminuição da massa de biofilme acumulado sobre as placas de adesão.



**Figura 8.9** Biomassa presente ( $X_{SVT}$ ) nos biofilmes de *P. fluorescens*, desenvolvidos nas células de fluxo, durante 5 d (a) e 10 d (b), na ausência (□) e na presença (■) de partículas de caulino, antes e após a aplicação de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de glutaraldeído em choques sucessivos.

Em sùmula, pode-se dizer que, nas condições testadas, a acção agressiva do glutaraldeído se manifesta quer na desinfecção dos biofilmes quer na sua remoção das superfícies metálicas. Acrescente-se, contudo, que essa acção parece ser mais pronunciada na redução da actividade bacteriana dos biofilmes do que na redução da biomassa acumulada. Em relação ao carbamato, pode-se dizer que a sua acção só é evidente na desinfecção dos biofilmes. Saliente-se que, mesmo na redução da actividade respiratória das bactérias constituídas nos biofilmes, a eficácia deste biocida é relativamente pouco significativa. Conclui-se, portanto, que, para ambos os biocidas, a desinfecção do biofilme

predomina sobre a remoção de biomassa. Nestas circunstâncias, e para assegurar um efectivo controlo da formação de biofilme, seria necessário complementar a acção dos biocidas com um processo adicional de remoção física dos biofilmes. Esta sugestão é reforçada tendo presente que, a desinfecção e a remoção são processos independentes (Srinivasan *et al.*, 1995), e que a remoção pode ser mais importante do que a desinfecção, pois biofilmes mortos podem permanecer aderidos às superfícies e constituir substrato e superfície de suporte para o desenvolvimento de biofilmes subsequentes, (Flemming *et al.*, 1996).

Esta constatação realça o facto de que, cada vez mais, um programa de controlo da formação de biofilmes não se pode confinar à aplicação exclusiva de biocidas.

Se se comparar o efeito dos biocidas, carbamato e glutaraldeído, na actividade respiratória das bactérias em suspensão (Capítulo 7) com a actividade observada quando as mesmas bactérias estão constituídas em biofilme, constata-se que, para condições similares de pH (pH 7) e de concentração de caulino e de biocida, os valores de redução de actividade causadas pelos biocidas em estudo são superiores quando as bactérias se desenvolvem em culturas em suspensão. Esta tendência é particularmente evidente nos ensaios realizados sem o caulino e com a aplicação de glutaraldeído.

Com efeito, nos testes realizados a pH 7, a aplicação de 300 mg L<sup>-1</sup> de carbamato a culturas suspensas de *P. fluorescens* causou reduções de actividade na ordem de 37 % a 81 %, na ausência de caulino (Tabela 7.1), e de 3 % a 59 % na sua presença (Tabela 7.6); a aplicação da mesma concentração de carbamato aos biofilmes formados pela mesma bactéria causou reduções de actividade compreendidas entre 32 % e 63 % e entre 35 % e 57 % nos biofilmes mistos desenvolvidos, respectivamente, durante 5 d e 10 d; para os biofilmes simples, a redução de actividade devido à aplicação de carbamato quedou-se pelos 7 % a 14 % e 15 % a 29 %, respectivamente, nos biofilmes desenvolvidos durante 5 d e 10 d (Tabela 8.4).

Nos testes realizados com a aplicação de glutaraldeído, quer nas culturas bacterianas em suspensão quer nos biofilmes, as reduções de actividade respiratória voltam novamente a distanciar-se. De facto, com a aplicação de 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído às culturas suspensas de *P. fluorescens*, registaram-se reduções de actividade da bactéria na ordem de 93 % a 99 %, quer na ausência (Tabela 7.2) quer na presença (Tabela 7.7) de caulino. A

aplicação do mesmo biocida aos biofilmes de *P. fluorescens* produziu reduções de actividade respiratória consideravelmente inferiores, isto é, na gama de 0 % a 37 % e na gama de 32 % a 66 %, nos biofilmes simples desenvolvidos durante, respectivamente, 5 d e 10 d; e na gama de 12 % a 49 % e de 22 % a 57 %, para os biofilmes mistos de, respectivamente, 5 d e 10 d (Tabela 8.5).

O facto da redução da actividade respiratória dos biofilmes de *P. fluorescens* ficar aquém da obtida com a aplicação dos mesmos biocidas, nas suspensões bacterianas da mesma estirpe, não surpreende pois é quase universalmente aceite que as bactérias constituídas em biofilme são mais resistentes à agressão dos biocidas do que quando estão dispersas numa suspensão aquosa (Costerton, 1984; LeChevallier, 1991; Heinzl, 1998; Morton *et al.*, 1998).

A evidente perda de eficiência do glutaraldeído, quando aplicado no controlo dos biofilmes bacterianos, realçado por estes ensaios, corroboram trabalhos anteriores. A título de exemplo, refira-se o trabalho de Gaylarde e Gaylarde (1996), que evidencia que o glutaraldeído, entre outros biocidas, foi bastante efectivo quando aplicado a culturas suspensas do género *Pseudomonas* como a espécie *Pseudomonas fluorescens*, tendo no entanto a sua acção antimicrobiana sido marcadamente reduzida quando aplicado a biofilmes das mesmas bactérias, nas mesmas condições experimentais; este facto também foi denotado por Cheung e Beech (1996) que observaram uma perda de eficiência do glutaraldeído contra biofilmes de bactérias sulfato-redutoras de cerca de 1 a 3 vezes quando comparada com a detectada contra as populações em suspensão.

A perda de eficiência do glutaraldeído quando aplicado a biofilmes pode ser justificada partindo do princípio de que, como já anteriormente referido, parte do glutaraldeído é consumido na remoção da matriz polimérica dos biofilmes, ficando, conseqüentemente, menos quantidade disponível para o ataque às bactérias.

Claro que as comparações efectuadas entre o modo de vida sésil e o planctónico, face à agressão dos biocidas, só terão real fundamento se o número de bactérias presente nos vários biofilmes estudados for similar ao número de bactérias presente nas várias suspensões celulares, de modo a ser possível garantir que a razão volume de biocida/número de bactérias seja igual em ambas as situações. As suspensões bacterianas usadas para avaliação da eficácia dos biocidas em culturas suspensas de *P. fluorescens* (Capítulo 7)

apresentavam, aproximadamente, concentrações de bactérias de  $3.0 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$  mL<sup>-1</sup>. Os biofilmes da mesma bactéria, desenvolvidos nas células de fluxo, base do estudo apresentado neste capítulo, englobam, de uma maneira geral,  $6.3 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^8$  bactérias por grama de biofilme húmido. Após a correspondente normalização, o número de bactérias presente, quer nas suspensões celulares quer nos biofilmes desenvolvidos durante 5 d e 10 d, pode ser observado na Tabela 8.6.

**Tabela 8.6** Número de bactérias de *P. fluorescens* presente nas suspensões bacterianas e nos biofilmes desenvolvidos durante 5 e 10 dias; valores médios  $\pm$  desvio padrão

		Número de bactérias
Suspensão bacteriana		$3.0 \times 10^{10} \pm 1.1 \times 10^8$
Biofilme	5 d	$6.2 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6$
	10 d	$8.1 \times 10^7 \pm 9.1 \times 10^6$

Recorrendo aos valores reunidos nesta tabela pode-se dizer que, para as mesmas concentrações de biocida, a razão biocida/bactéria foi menor nas suspensões bacterianas do que nos biofilmes. Em termos comparativos, pode-se então depreender que a disponibilidade do agente biocida para cada bactéria foi superior quando estas se desenvolveram em biofilme e inferior quando estas se desenvolveram de forma suspensa e dispersa. Esta constatação, por si só, levaria a crer que, com a aplicação dos biocidas, a actividade respiratória das bactérias embebidas no biofilme seria mais prejudicada do que a actividade das mesmas bactérias crescidas em suspensão. Os resultados obtidos, contudo, não confirmaram esta suposição, pelo que se pode concluir que a razão biocida/bactéria não define exclusivamente a eficácia dos biocidas no controlo de biofilmes. Por conseguinte, a inviabilização da acção antimicrobiana dos biocidas quando aplicados a biofilmes terá de ser atribuída a outros factores, intrínsecos ao próprio biofilme ou ao meio circundante, que geralmente estão associados ao desenvolvimento de formas de resistência por parte das bactérias constituídas nos biofilmes.

O desenvolvimento de resistência de microrganismos a agentes antimicrobianos não é um fenómeno novo ou surpreendente. Aliás, o desenvolvimento de resistência por parte de bactérias do género *Pseudomonas*, entre outras bactérias Gram-negativas, aos biocidas em estudo, carbamato e glutaraldeído, já é referida por Chapman (1998). Este autor apresenta

uma lista parcial de preservantes e biocidas aos quais foi detectada resistência microbiana na literatura científica desde 1942.

A caracterização da resistência desenvolvida por *P. fluorescens*, face à acção destes biocidas, está para além dos objectivos deste trabalho. No entanto, em termos meramente especulativos, pode-se adiantar que a resistência pode ser devida à existência da matriz polimérica, pois esta pode actuar como uma barreira à difusão do biocida (Costerton *et al.*, 1987; Christensen e Characklis, 1990; Heinzl, 1998) e/ou então inactivar a quantidade de biocida disponível pela reacção do biocida com os constituintes da matriz (Anwar e Strap, 1992; Pereira e Vieira, 2001). Outras propriedades da matriz polimérica, que a caracterizam como sendo similar a um crivo molecular e/ou a um adsorvente, são também geralmente invocadas para justificar o aumento da resistência por parte das bactérias aos agentes antimicrobianos (Lawrence *et al.*, 1994).

## 8.5 CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos é possível concluir que os biofilmes mistos de *Pseudomonas fluorescens*, isto é, formados na presença de partículas de caulino, apresentam um comportamento distinto dos biofilmes simples. De facto, a actividade respiratória específica das bactérias constituídas nos biofilmes mistos é significativamente superior à observada nas bactérias dos biofilmes simples. Acrescente-se até que este aumento de actividade, para condições experimentais similares, é superior ao determinado com as mesmas bactérias em suspensão.

A caracterização dos biofilmes revelou que não existem diferenças ao nível de massa seca e de biomassa entre os biofilmes mistos e simples. Somente em termos de massa húmida se registam diferenças consideráveis. Estas observações indicam que os biofilmes mistos apresentam maiores fracções de água que os simples mas, mesmo assim, inferiores aos valores usualmente referidos para biofilmes. Consequentemente, não parece ser o teor em água o factor mais relevante para explicar o aumento da actividade respiratória. A acção estimuladora do caulino parece estar mais associada à capacidade das argilas, quando incorporadas num biofilme, de modificar as características físico-químicas do meio (por adsorção de metabolitos tóxicos e troca de iões), criando, no seio do biofilme misto, microambientes favoráveis ao metabolismo bacteriano.

Os resultados obtidos, na segunda parte deste trabalho, indicam que a actividade respiratória das bactéria integradas nos biofilmes mistos, e para os dois períodos de formação, continua a ser superior à observada nos biofilmes simples, mesmo após a aplicação dos biocidas em choques consecutivos. Os resultados mostram igualmente que os choques, quer de carbamato, quer de glutaraldeído, reduziram a actividade respiratória das bactérias dos biofilmes. Esta redução foi particularmente marcada com a aplicação sucessiva de glutaraldeído e menos pronunciada com o carbamato. A aplicação de glutaraldeído causou também, contrariamente ao carbamato, redução da biomassa dos vários biofilmes, quer simples quer mistos, sendo no entanto mais notória nos biofilmes formados na presença de caulino. Pode-se então concluir que, a acção de ambos os biocidas é mais pronunciada na desinfecção dos biofilmes do que na remoção da sua biomassa, alertando para a necessidade de complementar o uso de biocidas com um processo adicional de remoção física de biofilmes.

Ambos os biocidas, carbamato e glutaraldeído, demonstraram ser mais eficazes na redução da actividade respiratória das *P. fluorescens* em suspensão do que quando estas mesmas bactérias estavam constituídas em biofilme. Como a razão biocida/bactéria foi menor nas suspensões bacterianas do que nos biofilmes, pode-se então concluir que a diminuição da acção antimicrobiana dos biocidas, quando aplicados a biofilmes, se deve a factores intrínsecos ao próprio biofilme ou ao meio circundante. Estes factores estão, de um modo geral, associados ao desenvolvimento de formas de resistência por parte das bactérias englobadas no biofilme

## 8.6 BIBLIOGRAFIA

- Azeredo, J., Lazarova, V. e Oliveira, R. 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Wat. Sci. Technol*, 39(7), 243-250.
- Azeredo, J. e Oliveira, R. 2000. The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. *Biofouling*, 16(1), 17-27.
- Anwar, H. e Strap, J. L. 1992. Changing characteristics of aging biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 30, 177-186.
- APHA, AWWA, WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition, Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. e Trussel, R. R. eds. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Azeredo, J., Lazarova, V. e Oliveira, R. 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Wat. Sci. Technol*, 39(7), 243-250.

- Bott, T. R. 1995. *Fouling of Heat Exchangers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B. V..
- Bouwer, E. J. 1987. Theoretical investigation of particle deposition in biofilm systems. *Wat Res.*, 21, 1489-1498.
- Chapman, J. S. 1998. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 241-245.
- Cheung, C. W. S. e Beech, I. B. 1996. The use of biocides to control sulphate-reducing bacteria in biofilms on mild steel surfaces. *Biofouling*, 9(3), 231-249.
- Christensen, B. E., Characklis, W. G. 1990. Physical and Chemical Properties of Biofilms. In: Characklis, W. G, Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 93-130.
- Costerton, J. W., Cheng, K. G., Geesey, G. G. Ladd, T. I., Nicckel, J. C., Dasgupta, M. e Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 453-464.
- Drury, W. J., Characklis, W. G. e Stewart, P. S. 1993. Interactions of 1 µm latex particles with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Wat. Res.*, 27, 1119-1126.
- Flemming, H-C., 1993. Biofilms and environmental protection. *Wat. Sci. Tech*, 27(7-8), 1-10.
- Flemming, H-C., Griebe, T. e Schaule, G. 1996. Antifouling strategies in technical systems – a short review. *Wat. Sci. Tech.*, 34(5-6), 517-524.
- Gaylarde, P. M. e Gaylarde, C. C. 1996. A theoretical model describing the influence of diffusion on microbiocidal actions in biofilms. *Revista de Microbiologica*, 27, 223-227.
- Heinzel, M. 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 225-234.
- Lawrence, J. R., Wolfaardt, G. M. e Korber, D. R. 1994. Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1166-1173.
- Melo, L. F. e Vieira, M. J. 1999. Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. *Bioprocess Engineering*, 20, 363-368.
- Mittelman, M. W. 1998. Symposium: Biofilms: development and control. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2760-2764.
- Morton, L. H. G., Greenway, D. L. A, Gaylarde, C. C. e Surman, S. B. 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 247-259.
- Patel, T. D. e Bott, T. R. 1991. Oxygen diffusion through a developing biofilm of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 52, 187-199.
- Paulus, W. 1993. *Microbicides for the Protection of Materials - A Handbook*. Chapman and Hall, London.
- Pereira, M. O. e Vieira, M. J. 2001. Effects of the interactions glutaraldehyde - polymeric matrix on the efficacy of the biocide on *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling* (em impressão).
- Pereira, M. O., Kuehn, M., Wuertz, S., Neu, T. e Melo, L. 2001. Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm, *Biotechnology and Bioengineering*, submetido.
- Schmitt, J. e Flemming, H-C. 1999. Water binding biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 39(7), 77-82.
- Srinivasan, R., Stewart, P. S., Griebe, T., Chen, C.-I. e Xu, X. 1995. Biofilm parameters influencing biocide efficacy. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 553-560.
- Vieira, M. J. e Melo, L. F. 1995. Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*. *Wat. Sci. Tech.*, 32(8), 42-52.
- Zhang, T. C. e Bishop, P. L. 1994. Structure, activity and composition of biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 29(7), 335-344.

## 9. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS BIOCIDAS NUM CIRCUITO DE ÁGUAS BRANCAS DE UMA INDÚSTRIA DE PASTA E PAPEL

---

### Sumário

Neste capítulo estuda-se o efeito da adição contínua de biocidas, carbamato e glutaraldeído, na formação de biofilmes no circuito de águas brancas de uma empresa produtora de pasta e papel. Para tal, foram desenvolvidos biofilmes sobre placas de aço inox, colocadas no interior de células de fluxo, por onde circulava um caudal de água real proveniente do circuito de águas brancas da máquina de papel.

A acção dos mesmos biocidas no controlo das populações microbianas em suspensão no referido circuito de águas brancas também se apresenta neste capítulo.

Paralelamente, também se testa a possibilidade do carbamato poder ser utilizado como um agente de agregação neste sector industrial, assumindo então um papel idêntico aos convencionais agentes de retenção.

9.1 Introdução	184
9.2 Objectivos do trabalho	185
9.3 Metodologia experimental	186
9.4 Resultados e discussão	193
9.5 Conclusões	206
9.6 Bibliografia	207

---

## 9.1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de água das indústrias produtoras de pasta e de papel constituem ambientes altamente favoráveis para o desenvolvimento e proliferação de uma extensa gama de microrganismos (Eagon, 1995). Conseqüentemente, a formação de biofilmes indesejáveis, vulgarmente designados de *limo* nesta área industrial, nas paredes de vários equipamentos e tubagens é quase impossível de evitar. Esta situação é geralmente associada ao aparecimento frequente de um vasto rol de problemas sérios, nos quais se incluem: quebras de produção, bio-corrosão dos materiais de construção das máquinas e tubagens, redução da qualidade do produto final (papel), formação de odores desagradáveis, problemas de saúde para os operários envolvidos no processo de fabrico, degradação das fibras de celulose e de aditivos, etc. (Mattila-Sandholm e Wirtanen, 1992; Gudlauski, 1996; Klahre *et al.*, 1997). Estes problemas quase sempre se traduzem por perdas económicas substanciais. As quebras de produção estão geralmente relacionadas com a ocorrência de quebras da folha de papel, buracos, manchas e descolorações no produto final, devido à incorporação de porções de biofilme que se desprendem das paredes das tubagens e dos tanques.

Nos últimos anos, os problemas causados pela presença de microrganismos nos circuitos de produção têm aumentado em frequência e gravidade, em parte devido à instalação de máquinas de papel maiores, mais complexas e mais rápidas; ao aumento da reutilização da água; ao aumento do uso de aditivos químicos e de fibras secundárias; às elevadas temperaturas de água de produção, à presença de colóides e substâncias dissolvidas e ao indevido uso esporádico de agentes antimicrobianos (Cantrell e Lefevre, 1989; Eagon, 1995; Robertson, 1995; Dexter, 1996; Salzburger, 1996).

A prática mais comum para lidar com estes biofilmes indesejáveis inclui a aplicação de substâncias químicas antimicrobianas, universalmente denominadas de biocidas. O uso de biocidas, contudo, deve ser cuidadosamente considerado, pois estes, quando descarregados para o exterior, constituem uma potencial fonte de poluição, que geralmente requer tratamentos adicionais.

Devido às leis ambientais cada vez mais restritivas, o uso de métodos alternativos pouco tóxicos, ou mesmo não tóxicos, para o controlo do desenvolvimento do biofilmes,

tem vindo a ser encorajado (Gould, 1999). Estes métodos alternativos devem sempre reger-se por uma estratégia combinada entre “good housekeeping” (Flemming e Schaule, 1996), baseada numa filosofia que visa exaustivamente manter os sistemas limpos, e a optimização de outras medidas tais como o emprego de biocidas “amigos” do ambiente, enzimas e bacteriófagos.

O uso de enzimas como método alternativo ao uso de biocidas, no controlo da formação de biofilmes na indústria de produção de papel tem, até ao momento, granjeado pouco sucesso. Para tal muito tem contribuído a complexa e heterogénea matriz polimérica que envolve o biofilme (Claus e Muller, 1996). A heterogeneidade dos polímeros e a falta de enzimas específicas aplicáveis sugerem que devem ser realizadas mais tentativas para descobrir a enzima, ou mistura de enzimas, capaz de degradar a estrutura polimérica da matriz dos biofilmes industriais.

A aplicação de bacteriófagos, vírus que infectam e destroem as bactérias, no controlo do sujamento biológico nos circuitos de água branca das empresas produtoras de papel tem vindo a ser desenvolvida nos anos mais recentes. O principal conceito é tentar isolar as bactérias formadoras de biofilme e seguidamente pesquisar o bacteriófago lítico capaz de destruir essas bactérias. Até ao momento, este método não está suficientemente bem desenvolvido a fim de constituir uma verdadeira alternativa aos métodos convencionais baseados em biocidas (Johnsrud, 1997).

## 9.2 OBJECTIVOS DO TRABALHO

Com este trabalho pretendeu-se conhecer o desempenho de ambos os biocidas num ambiente real de uma indústria produtora de pasta e papel. Para tal, averiguou-se a eficácia de ambos os biocidas, carbamato e glutaraldeído, no controlo da formação de biofilmes bem como no controlo microbiano em suspensão do circuito de *águas brancas*, ou *águas coladas*, da máquina de papel da indústria de pasta e papel. Simultaneamente, também foi aferida a dupla capacidade do carbamato poder ser usado, para além de biocida, como agente de retenção na indústria da pasta e do papel, tal como sugerido no Capítulo 5 e corroborado no Capítulo 6.

### 9.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foi implementado um sistema experimental numa indústria produtora de pasta e papel (Portucel Viana, SA) a fim de ser possível avaliar, em condições reais, o efeito dos biocidas, quer na formação de depósitos de sujamento nos equipamentos e tubagens, quer nos microrganismos em suspensão no circuito de águas brancas da máquina de papel. As águas brancas ou coladas resultam do espalhamento da suspensão fibrosa na mesa de formação da máquina de papel.

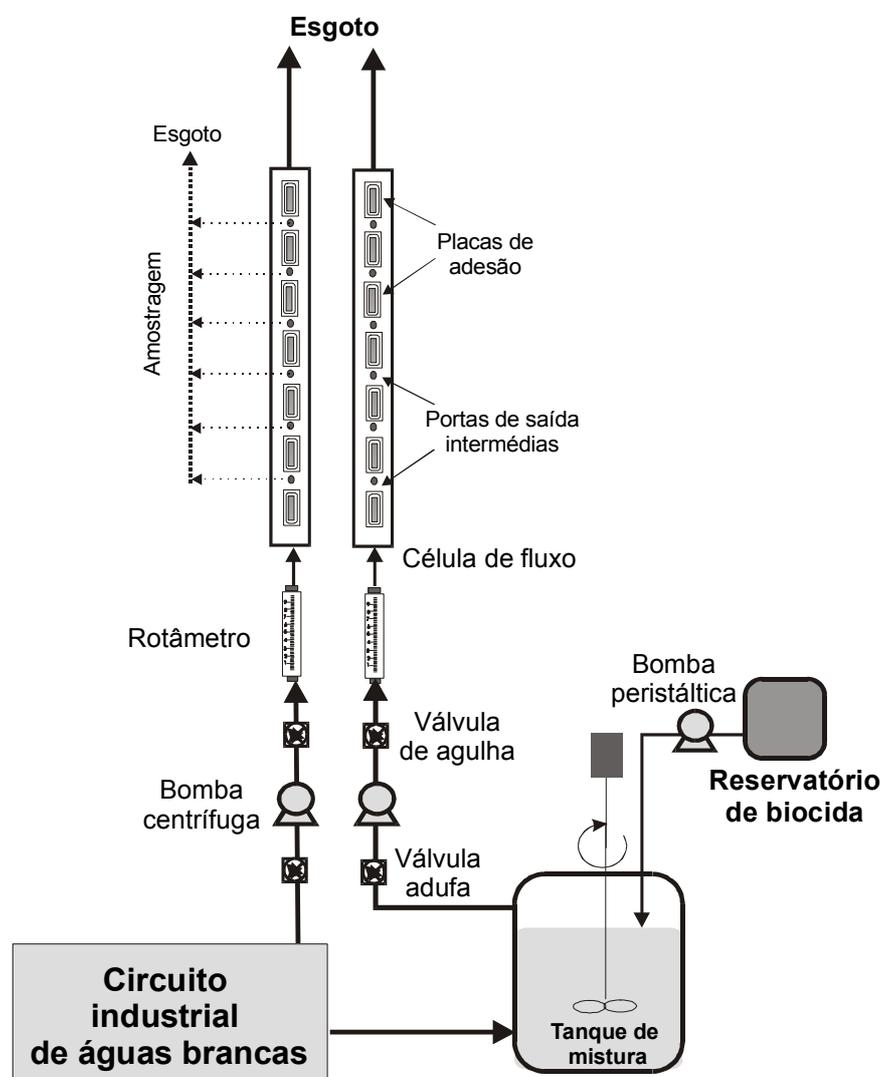
A instalação experimental, basicamente constituída por duas células de fluxo semelhantes, foi montada ao lado do circuito da máquina de papel, nas imediações de uma das condutas de água branca, de modo a ser possível ligar as células directamente à corrente de água. Este trabalho experimental funcionou durante quase um ano, tendo cada ensaio demorado, em média, quinze dias.

Ressalve-se que, ao longo do trabalho apresentado neste capítulo, se optou por designar o material acumulado nas superfícies de adesão por *depósito de sujamento*, uma vez que, neste tipo de indústria, o desenvolvimento de sujamento biológico é geralmente acompanhado de outros tipos de sujamento decorrentes da deposição de partículas inorgânicas, precipitados cristalinos, produtos de corrosão, etc. Nestas circunstâncias, os termos “sujamento biológico” e/ou “biofilme” não eram, portanto, os mais adequados.

#### 9.3.1 Operação das células de fluxo

Os depósitos de sujamento foram desenvolvidos em placas de adesão devidamente acondicionadas em duas células de fluxo idênticas (Sub-capítulo 4.6), através da circulação, em regime turbulento (Número de Reynolds compreendido entre 5000 e 6000 e velocidade entre  $0.51 \text{ m s}^{-1}$  e  $0.614 \text{ m s}^{-1}$ ), de água directamente proveniente do circuito de águas brancas da máquina de papel da referida empresa. A circulação contínua de água branca foi assegurada por bombas centrífugas (Grundfoss). Os caudais de água, iguais nas duas células de fluxo, foram regulados manualmente através de rotâmetros (Fischer & Porter), instalados a montante das células de fluxo. A ligação das células de fluxo à conduta principal de água foi feita por tubagem em aço inox. Na Figura 9.1 é apresentado um esquema do sistema experimental utilizado no decurso destes ensaios.

Uma das células de fluxo foi utilizada no desenvolvimento de depósitos sem aplicação de biocidas (ensaios de controlo). A outra foi usada para estudar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de ambos os biocidas na formação de depósitos. Periodicamente, foram retiradas algumas das placas de adesão de cada uma das células de fluxo, que foram reservadas para posterior análise, e substituídas por outras limpas. A retirada das placas de adesão fez-se sempre em sentido descendente, a partir do topo da célula de fluxo. A remoção destas placas e a sua consequente substituição por outras, ocorreu sem a paragem da circulação da água branca, pois esta, durante o período de remoção, foi desviada para a porta de saída imediatamente abaixo da placa de adesão removida. Pretendeu-se com este artifício não perturbar a acumulação de depósito nas restantes placas de adesão inseridas nas células de fluxo.



**Figura 9.1** Representação esquemática do sistema experimental.

### 9.3.2 Condições de operação da máquina de papel

A máquina de papel da empresa Portucel Viana, aquando da realização dos ensaios, operava em condições ácidas com temperaturas entre 43 °C e 50 °C. A matéria prima utilizada era basicamente constituída por cerca de 80 % de fibra de madeira original (pinheiro e eucalipto) e aproximadamente 20 % de fibra secundária (papel reciclado). Esta empresa tem implementado um único processo produtivo, que visa exclusivamente a produção de papel kraft, não possuindo nenhum programa de controlo de material inorgânico. Consequentemente, a influência do material inorgânico no processo produtivo é praticamente constante em todas as partidas da máquina. No momento, um composto à base de glutaraldeído era o biocida usado no controlo da formação de biofilme (20 g de produto efectivo por tonelada de papel produzido) e era aplicado ao circuito de águas brancas, em choques intermitentes, cada oito horas. Um exemplo ilustrativo das características da água branca encontra-se na Tabela 9.1.

**Tabela 9.1** Caracterização físico-química das águas brancas (exemplo ilustrativo)

<b>Parâmetro</b>	
pH, escala de Sorenson a 25 °C	4.6 a 5.8
Temperatura, °C	43 a 50
Sólidos suspensos totais, mg L <sup>-1</sup>	135
Carência química de oxigénio, mg L <sup>-1</sup>	1487
Azoto de Kjeldahl, mg L <sup>-1</sup>	0.16
Nitrato, mg L <sup>-1</sup>	<2.0
Ferro total, mg L <sup>-1</sup>	0.45
Fósforo total, mg L <sup>-1</sup>	0.45
Sulfato, g L <sup>-1</sup>	1.20
Cálcio, mg L <sup>-1</sup>	229

### 9.3.3 Aplicação dos biocidas

As concentrações de biocidas ensaiadas foram, respectivamente, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato e 50 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído. Os biocidas foram continuamente adicionados à tubagem de alimentação de uma das células de fluxo, de modo a que cada biocida, antes de entrar nessa célula, estivesse em contacto com as águas brancas durante cerca de 30 min.

### 9.3.4 Monitorização do sistema experimental

O pH e a temperatura do circuito de água brancas foram periodicamente monitorizados. Os caudais de alimentação de água branca às células de fluxo, bem como o caudal de biocida aplicado ao sistema, foram constantemente medidos e ajustados caso necessário. No decurso dos vários ensaios, e de dois em dois dias, foram removidas várias placas de adesão de cada uma das células de fluxo, a fim de ser avaliada a quantidade de depósito acumulada. Também foram recolhidas amostras das águas brancas (com e sem adição de biocida), para posterior determinação do número total de microrganismos em suspensão. Estas amostras foram recolhidas à saída das duas células de fluxo.

### 9.3.5 Avaliação da massa de depósito acumulado

O efeito de cada biocida na formação de depósito nas células de fluxo foi avaliado pela quantificação da massa de depósito ( $m_f$ ) acumulada nas placa de adesão. No início de cada ensaio, todas as placas de adesão foram identificadas e pesadas (peso médio de 631 mg cm<sup>-2</sup> ± 18 mg cm<sup>-2</sup>) antes de serem colocadas nas células de fluxo. À medida que foram sendo removidas de cada uma das células de fluxo (cada dois dias), a massa do conjunto placa de adesão + depósito acumulado foi novamente determinada após secagem ao ar em condições similares. A massa de depósito acumulada nas várias placas de adesão foi então avaliada pela diferença entre o peso das placas antes de serem colocadas nas células de fluxo e logo após serem retiradas, e expressa em unidades de massa por unidade de área de adesão. Os resultados apresentados são a média de pelo menos três medições. A massa de depósito foi posteriormente recolhida por remoção física (raspagem por recurso a uma espátula) e guardada para posterior análise.

### 9.3.6 Caracterização dos depósitos

#### 9.3.6.1 Análise química

A caracterização química dos depósitos acumulados sobre as placas de aço inox envolveu a determinação do teor em proteínas e polissacarídeos totais, de acordo com os procedimentos descritos no Capítulo 4. Com esta caracterização procurou-se conhecer a fracção biológica (células + matriz polimérica) dos referidos depósitos.

#### 9.3.6.2 Determinação da fracção inorgânica

A fracção inorgânica de alguns depósitos acumulados nas várias placas de adesão foi estimada determinando-se o seu teor em cinzas. Estes sólidos não voláteis equivalem ao resíduo mineral obtido após ignição da massa total de depósito a  $500\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguindo-se o método descrito no *Standard Methods of Analysis* (1989).

### 9.3.7 Quantificação da população microbiana em suspensão

Durante cada ensaio, de dois em dois dias, foram recolhidas amostras de água branca à saída de cada célula de fluxo (com e sem adição de biocida), para posterior contagem das células viáveis em suspensão, segundo o método tradicional de contagem em placa. Antes da inoculação das várias amostras, estas foram vigorosamente homogeneizadas com o auxílio de um vórtex regulado na potência máxima. Posteriormente, cada uma das amostras foi sujeita a diluições sucessivas, numa gama previamente estimada, tendo-se inoculado 100  $\mu\text{L}$  de algumas das diluições efectuadas (três no mínimo) em placas de Petri com nutriente agar (Merck), previamente preparadas. Todas as inoculações foram efectuadas em triplicado. As várias placas foram incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tendo o número de colónias sido contado após 48 h de incubação. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro de amostra e apresentados em formato logarítmico na base 10 ( $\log_{10}$ ).

Nos ensaios realizados com aplicação de 200  $\text{mg L}^{-1}$  de carbamato e 50  $\text{mg L}^{-1}$  de glutaraldeído, foram também determinadas as células viáveis após as amostras terem sido filtradas com um filtro-tela de 200 mesh. A concentração celular das amostras filtradas foi determinada de acordo com o método referido anteriormente, mas sem homogeneização no

vórtex. Nestas circunstâncias, UFC pode representar bactérias isoladas, colónias ou agregados celulares.

As condições do método atrás referido foram baseadas no procedimento para análise microbiológica da água de processo das indústrias de pasta e de papel recomendado pela TAPPI (“Technical Association of the Pulp and Paper Industries”) e reproduzido por Rossmore (1995).

### 9.3.8 Construção das curvas de sujamento biológico

As curvas de sujamento biológico (massa de biofilme *versus* tempo) foram obtidas pelo ajuste dos dados experimentais (massa de depósito acumulado ao longo do tempo) ao modelo global de desenvolvimento de biofilme proposto por Melo e Vieira (1999) através da seguinte equação:

$$m_f = m_f^\infty [1 - \exp(-\beta t)] \quad (9.1)$$

onde:  $m_f$  representa a massa de depósito em cada intervalo de tempo;  $m_f^\infty$  representa a massa máxima de depósito acumulada, no estado pseudo-estacionário (isto é, o valor assintótico de  $m_f$  quando  $t \rightarrow \infty$ ). O recíproco de  $\beta$  é uma medida indirecta da resistência mecânica do depósito ao desprendimento.

### 9.3.9 Avaliação do desempenho dos biocidas

#### 9.3.9.1 Redução da massa de depósito acumulado nas placas de adesão

O efeito dos biocidas na massa de depósito acumulado nas placas de adesão foi avaliado em termos de redução da massa máxima aderida ( $m_f^\infty$ ), que corresponde ao patamar final de estado pseudo-estacionário da curva de sujamento, tendo por referência a massa máxima de depósito obtida no respectivo ensaio de controlo. Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{MD_{\text{controlo}} - MD_{\text{ensaio}}}{MD_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (9.2)$$

em que  $MD_{\text{controlo}}$  representa a massa máxima de depósito determinada no ensaio de controlo, e  $MD_{\text{ensaio}}$  representa a mesma grandeza relativa aos testes de aplicação de cada concentração de biocida.

### 9.3.9.2 Redução do teor em proteínas e polissacarídeos de cada depósito

O efeito dos biocidas na fracção biológica de cada depósito (aqui caracterizada em termos de proteínas e polissacarídeos) foi avaliado em termos de redução da concentração máxima de proteínas e polissacarídeos constituintes do depósito, tendo por referência as quantidades máximas obtidas nos respectivos ensaios de controlo. Os teores máximos de proteínas e polissacarídeos foram determinados quando cada curva de sujamento atingiu o estado pseudo-estacionário (Equação 9.1). Os resultados, expressos em percentagem, foram determinados com base numa equação idêntica à Equação 9.2, substituindo os valores de  $MD$  pelos respectivos valores de concentração em proteínas e polissacarídeos.

### 9.3.9.3 Redução da população microbiana em suspensão nas águas brancas

A eficácia dos biocidas no número de microrganismos em suspensão nas águas brancas foi estimada pela determinação da redução de células viáveis em suspensão no circuito. Este parâmetro, tal como os demais, foi definido com base na população microbiana determinada nos respectivos ensaios de controlo (ensaios sem aplicação de biocida). Os resultados, expressos em  $\Delta \log$ , foram obtidos de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta \log = CV_{\text{controlo}} - CV_{\text{ensaio}} \quad (9.3)$$

em que  $CV_{\text{controlo}}$  representa o número de células viáveis determinado no ensaio de controlo, e  $CV_{\text{ensaio}}$  representa o mesmo parâmetro correspondente aos testes de aplicação de cada concentração de biocida.

#### 9.3.9.4 Retenção celular

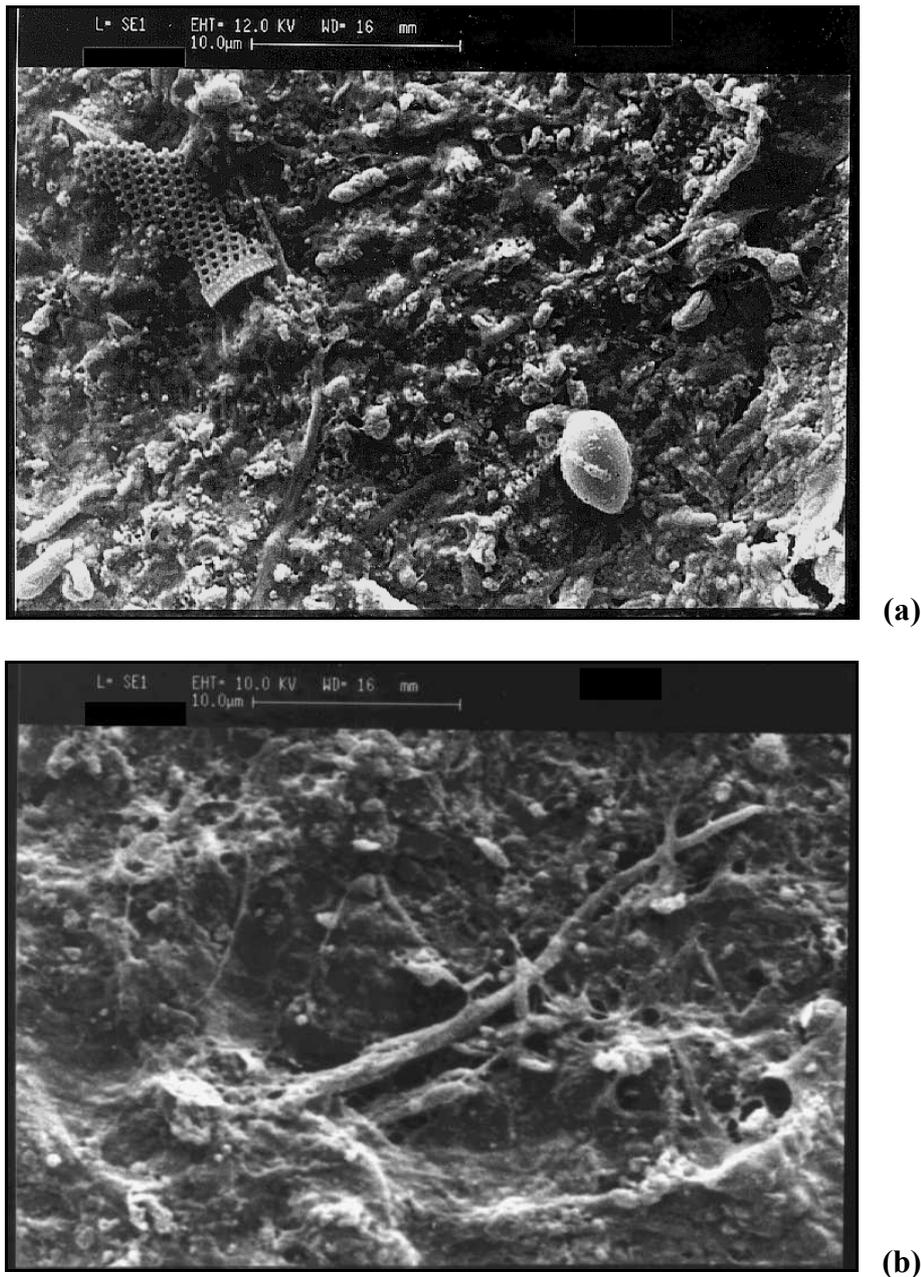
Nos ensaios de aplicação de 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato e 50 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído, a retenção celular foi determinada quantificando as células viáveis antes e após as amostras de águas brancas, com e sem a adição dos biocidas, terem sido sujeitas a filtração através de uma tela-filtrante de 200 mesh (abertura de malha similar à da teia filtrante das máquinas de papel). Os valores de retenção foram expressos em percentagem, tendo sido calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Retenção celular} = \frac{CV_{amostra} - CV_{filtrado}}{CV_{amostra}} \times 100 \quad (9.4)$$

em que  $CV_{amostra}$  representa o número de células viáveis determinado nas amostras de água branca sujeitas à aplicação de biocidas, para cada intervalo de tempo, e  $CV_{filtrado}$  corresponde às células viáveis após as mesmas amostras terem sido filtradas através do filtro-tela, para os mesmos intervalos de tempo. Sublinhe-se que, para este cálculo, a quantidade de células viáveis foi expressa em UFC mL<sup>-1</sup> e não na base logarítmica.

## 9.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a realização destes ensaios em condições industriais pretendeu-se conhecer o efeito dos dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, na prevenção da formação inicial de depósitos de sujamento no ambiente real de uma máquina de papel. A Figura 9.2 apresenta alguns registos fotográficos obtidos por observação ao microscópio electrónico de varrimento (SEM) de depósitos acumulados sobre várias placas de aço inox, como resultado da circulação de água branca pelas células de fluxo.



**Figura 9.2** Imagens digitalizadas de fotografias de microscopia electrónica de varrimento de depósitos acumulados nas placas de adesão, em resultado da circulação de água branca: **(a)** durante 5 d, ampliação 7000x; **(b)** durante 10 d, ampliação 3000x.

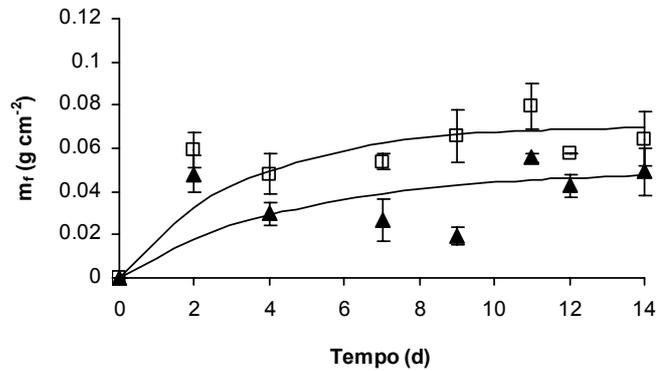
Estas imagens mostram que os depósitos de sujamento acumulados nas placas de aço inox apresentam uma estrutura bastante heterogénea, sendo até claramente visível uma grande variedade de materiais na sua composição. Também pode ser observada uma variedade apreciável de microrganismos de diferentes morfologias, em contacto directo com material extracelular de aspecto gelatinoso. Este tipo de estrutura e composição dos

depósitos era de certo modo esperado pois a formação e natureza destes estão directamente relacionada com as características do sistema aquoso onde estão a ser desenvolvidos. No caso de uma indústria produtora de pasta e papel, os depósitos são formados devido à acumulação de diversos microrganismos, conjuntamente com fibras celulósicas, compostos aniónicos, partículas diversas, etc. (Klahre *et al.*, 1997; Pellegrin *et al.*, 1999). Consequentemente, os depósitos de sujamento neste tipo de indústrias envolvem geralmente uma fracção não biológica aderida conjuntamente com a matriz biológica. Este facto indicia então que a informação facultada pela quantidade de material acumulado nas várias placas de adesão pode não ser, só por si, um indicador adequado da eficácia dos biocidas na fracção biológica dos vários depósitos. É sabido que a acção dos biocidas se caracteriza por causar danos irreversíveis numa estrutura ou função vital das células. Deste modo, a actividade microbiana pode ser reduzida (desinfecção), mas não necessariamente as camadas de sujamento (desprendimento). Por isso, neste trabalho, para além da determinação da massa de depósito de sujamento acumulado nas placas de adesão, também se determinou o conteúdo em proteínas e polissacarídeos dos referidos depósitos (como uma maneira indirecta de estimar a biomassa do depósito), uma vez que estes dois parâmetros representam os componentes principais de um biofilme (Lazarova e Manem, 1995).

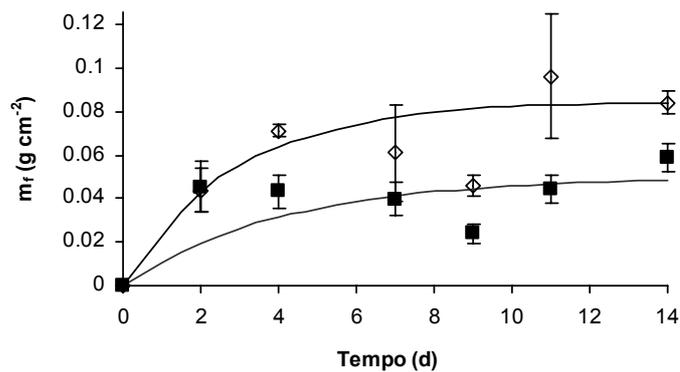
O efeito dos biocidas, carbamato e glutaraldeído, na massa total de depósito acumulado nas várias placas de adesão pode ser observado, respectivamente, nas Figuras 9.3 e 9.4.

Com o intuito de consolidar os resultados obtidos, estes foram testados estatisticamente no sentido de verificar se as diferenças, entre as massas dos depósitos obtidos com a aplicação dos biocidas e aquelas quantificadas nos ensaios de controlo, podiam ser consideradas estatisticamente significativas. Para tal, recorreu-se à distribuição *t* de Student para comparação de médias obtidas em dois conjuntos de determinações em que os resultados de um conjunto podem ser emparelhados com os resultados de outro conjunto (Daniel, 1989). Os resultados obtidos demonstram que as diferenças entre os pares de valores são estatisticamente significantes uma vez que os níveis de confiança determinados foram sempre superiores a 95 % (99 % e 98 % de confiança, para 7 graus de liberdade, quando, respectivamente, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato foram adicionados ao sistema experimental; 95 % de confiança, para 6 graus de liberdade, e 99 % de confiança, para 5 graus de liberdade, quando, respectivamente, 50 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído foram aplicados). Estes valores significam que, em todos os ensaios realizados, a aplicação

de biocidas ao circuito de águas brancas afectou a massa de depósito acumulado sobre as placas de adesão.

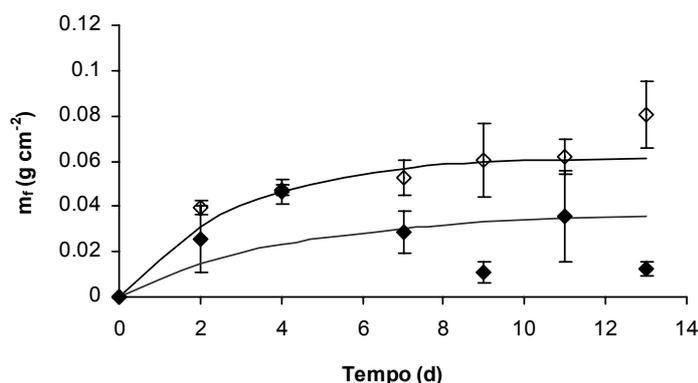


(a)

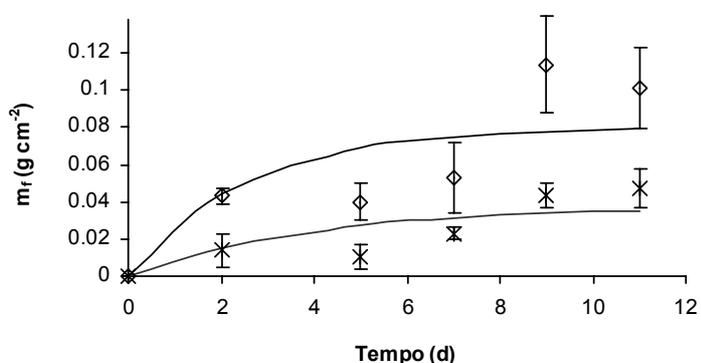


(b)

**Figura 9.3** Efeito da aplicação de carbamato na massa de depósito ( $m_f$ ) acumulado nas placas de adesão, respectivamente,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (a) e  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (b). ( $\diamond$ ) controlo, ( $\blacktriangle$ )  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e ( $\blacksquare$ )  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato.



(a)



(b)

**Figura 9.4** Efeito da aplicação de glutaraldeído na massa de depósito ( $m_f$ ) acumulado nas células de adesão, respectivamente, 50 mg L<sup>-1</sup> (a) e 100 mg L<sup>-1</sup> (b). (◇) controle, (◆) 50 mg L<sup>-1</sup> e (✱) 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído.

Tal como pode ser observado nas Figuras 9.3 e 9.4, os dados experimentais descrevem curvas típicas de acumulação de biofilme (Bott, 1995), quer nos ensaios de controlo quer nos ensaios com aplicação dos biocidas. Convém salientar que todos os testes foram realizados sob condições operacionais industriais que não podiam ser exaustivamente controladas, principalmente as decorrentes das flutuações de caudal, muito comuns neste tipo de processo industrial (Gould, 1999). Este factor talvez explique os desvios significativos do modelo global de sujamento descrito pela Equação 9.1, embora algumas das flutuações possam ser atribuídas a fenómenos naturais intrínsecos ao próprio processo de desenvolvimento de biofilme, tais como erosão e desprendimento súbito de porções de depósito. No entanto, uma vez que a tendência assintótica é consistentemente evidenciada em todas as curvas representadas nas Figura 9.3 e 9.4, foi decidido ajustar os dados

experimentais ao modelo matemático de acumulação de biofilme desenvolvido por Melo e Vieira (1999), estando as curvas de ajuste desenhadas em cada figura.

Os valores máximos da massa depositada nas placas em estado pseudo-estacionário ( $m_f^\infty$ ), bem como o factor proporcional à resistência mecânica dos depósitos ao desprendimento ( $1/\beta$ ), determinados segundo a Equação 9.1, estão sumariados na Tabela 9.2. A redução da massa máxima de depósito em consequência da aplicação dos biocidas também é apresentada na mesma tabela.

**Tabela 9.2** Efeito dos biocidas no valor máximo de massa de depósito acumulado ( $m_f^\infty$ ) e no valor do factor de resistência do depósito ao desprendimento ( $1/\beta$ ), determinados de acordo com a Equação 9.1; os valores de redução foram determinados de acordo com a Equação 9.2; 0 mg L<sup>-1</sup> representa o ensaio de controlo; valores médios ± desvio padrão

Biocida	Concentração de biocida (mg L <sup>-1</sup> )	Massa máxima $m_f^\infty$	Resistência ao desprendimento ( $1/\beta$ )	Redução na $m_f^\infty$
		(g cm <sup>-2</sup> )	(d)	(%)
Carbamato	0	0.071 (±0.008)	3.33	29.6 (±11.3)
	100	0.050 (±0.006)	4.55	
	0	0.085 (±0.016)	2.86	41.2 (±16.2)
	200	0.050 (±0.010)	4.00	
Glutaraldeído	0	0.063 (±0.011)	2.86	41.3 (±17.6)
	50	0.037 (±0.009)	4.00	
	0	0.080 (±0.022)	2.50	53.8 (±18.7)
	100	0.037 (±0.011)	3.70	

Da observação das Figuras 9.3 e 9.4 e da Tabela 9.2 é possível constatar-se que a quantidade máxima de massa de depósito acumulado nas placas metálicas das células de fluxo diminui sempre que os biocidas são aplicados à corrente de águas brancas, sendo a redução obtida com a aplicação de glutaraldeído superior à alcançada com a adição de carbamato. Estes fenómenos eram, de certa maneira, esperados, pois a redução da massa depositada deve-se, em parte, ao carácter tóxico dos biocidas sobre os microrganismos; a redução mais acentuada obtida com a adição de glutaraldeído não surpreende pois este biocida, quer nos ensaios em suspensão (Capítulo 7), quer no ensaios de formação de biofilme (Capítulo 8), provou ser significativamente mais agressivo que o carbamato. Estes

factos dão uma indicação clara da contribuição da fracção biológica para a estrutura dos depósitos mistos, tais como os formados neste tipo de indústrias. As células microbianas e a matriz polimérica que segregam têm um papel decisivo na estabilidade dos depósitos. A análise da Tabela 9.2 também indicia que a acção dos biocidas parece desenvolver nos depósitos uma resistência ao seu desprendimento ( $1/\beta$  aumenta quando se aplicam os biocidas).

Na Tabela 9.3 também pode ser observado o efeito de cada biocida no teor máximo (valor final) em proteínas e polissacarídeos de cada depósito. Pela observação desta tabela é possível reconhecer-se que a quantidade de proteínas e polissacarídeos de cada depósito foi, de facto, também reduzida quando se introduziram os biocidas no sistema, tendo, no entanto, o glutaraldeído revelado ser mais efectivo na redução do conteúdo orgânico de cada depósito do que o carbamato. Novamente, a duplicação da concentração de cada biocida não provocou nenhum aumento significativo na redução do conteúdo biológico de cada depósito.

**Tabela 9.3** Efeito dos biocidas no conteúdo máximo (valor final) de proteínas e polissacarídeos de cada depósito, determinado de acordo com a Equação 9.1; os valores de redução foram determinados de acordo com a Equação 9.2; 0 mg L<sup>-1</sup> representa o ensaio de controlo; valores médios  $\pm$  desvio padrão

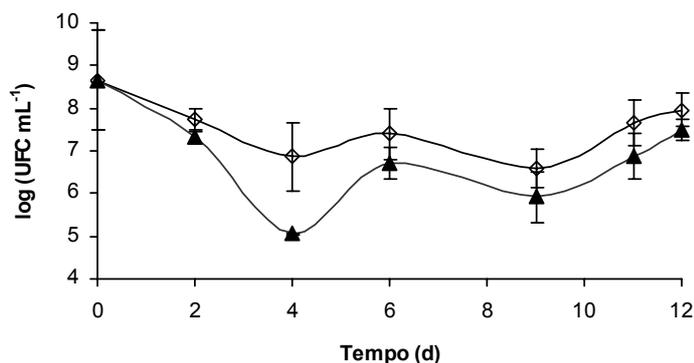
<b>Biocida</b>	<b>Concentração de biocida (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conteúdo máximo em proteínas (mg cm<sup>-2</sup>)</b>	<b>Redução no conteúdo de proteínas (%)</b>	<b>Conteúdo máximo em polissacarídeos (mg cm<sup>-2</sup>)</b>	<b>Redução no conteúdo de polissacarídeos (%)</b>
Carbamato	0	0.25 ( $\pm 0.05$ )		0.35 ( $\pm 0.09$ )	
	100	0.14 ( $\pm 0.02$ )	44.0 ( $\pm 13.8$ )	0.23 ( $\pm 0.02$ )	37.1 ( $\pm 17.8$ )
	0	0.27 ( $\pm 0.07$ )		0.37 ( $\pm 0.11$ )	
	200	0.13 ( $\pm 0.004$ )	51.9 ( $\pm 12.6$ )	0.21 ( $\pm 0.01$ )	43.2 ( $\pm 17.1$ )
Glutaraldeído	0	0.56 ( $\pm 0.12$ )		0.58 ( $\pm 0.04$ )	
	50	0.20 ( $\pm 0.04$ )	64.3 ( $\pm 10.5$ )	0.34 ( $\pm 0.03$ )	41.4 ( $\pm 6.6$ )
	0	0.75 ( $\pm 0.12$ )		0.70 ( $\pm 0.21$ )	
	100	0.25 ( $\pm 0.02$ )	66.7 ( $\pm 6.0$ )	0.25 ( $\pm 0.03$ )	64.3 ( $\pm 11.5$ )

Estes resultados reforçam a ideia de que as células microbianas, bem como a matriz polimérica que excretam (constituintes fundamentais dos depósitos, para além da parte não

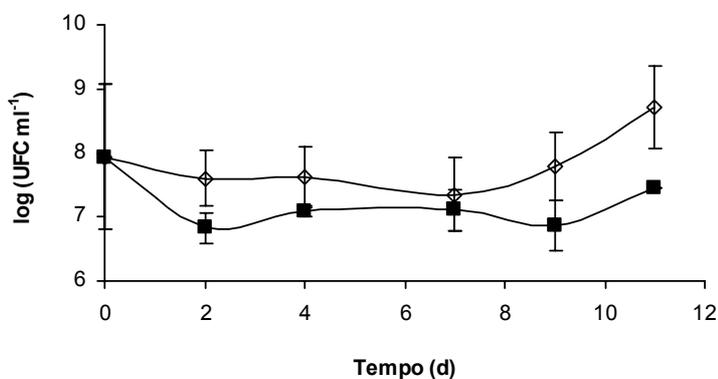
biológica), desempenham um papel fundamental, quer na quantidade de massa de depósito acumulada, quer na sua estabilidade. Nestes depósitos mistos, a parte orgânica dos depósitos terá sido removida pela acção dos biocidas, levando à formação de depósitos estáveis predominantemente constituídos por matéria não orgânica (até 30 % da massa de depósito), de certa maneira insensível ao poder tóxico dos biocidas. Esta insensibilidade à acção tóxica dos biocidas confere aos depósitos uma resistência mecânica ao seu desprendimento, que poderá constituir uma dificuldade acrescida na limpeza mecânica dos circuitos da máquina de papel.

Deve ser, contudo, reiterado que os teores em proteínas e polissacarídeos apresentados na Tabela 9.3 podem também incluir outros compostos não celulares que contenham açúcares e/ou proteínas (como, por exemplo, os hidratos de carbono das fibras celulósicas). No entanto, parece razoável assumir que os biocidas exerceram a sua acção antimicrobiana essencialmente na fracção de biofilme do depósito e, portanto, as alterações causadas pelos biocidas no conteúdo proteico-polissacarídeo do depósito são essencialmente devidas à sua acção sobre a biomassa.

Os resultados obtidos sugerem que as estratégias de combate ao sujamento biológico não devem centrar-se somente na remoção dos depósitos dos equipamentos, quer por aplicação de biocidas quer por limpeza mecânica, mas também incluir medidas de controlo dos microrganismos em suspensão nos circuitos de água, pois estes são, por eleição, precursores determinantes do aparecimento de biofilmes. Na sequência destas constatações, a eficiência dos biocidas na redução da população celular viável em suspensão do circuito de águas brancas foi também monitorizada. As Figuras 9.5 e 9.6 apresentam os perfis de concentração microbiana em suspensão obtida com a adição dos biocidas, respectivamente, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato e 50 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído, ao longo do tempo.



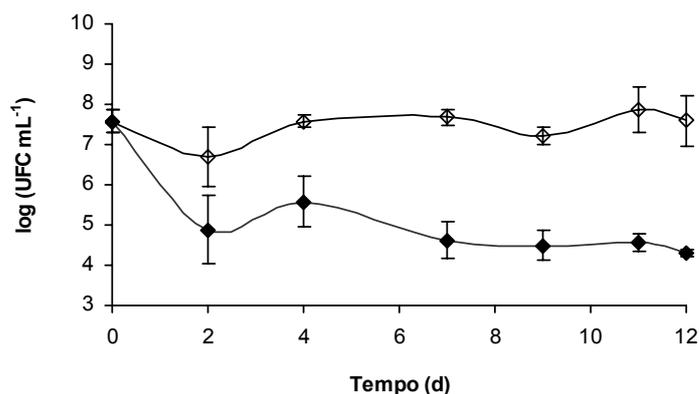
(a)



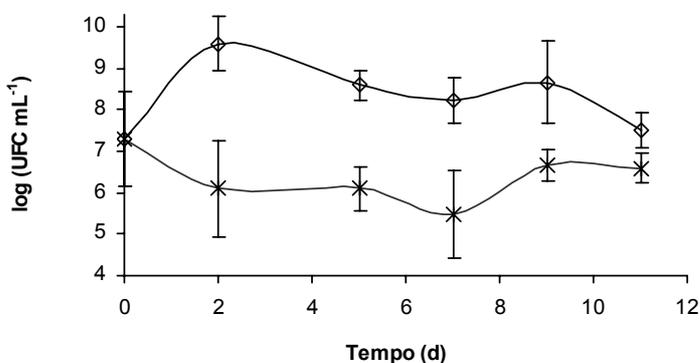
(b)

**Figura 9.5** Efeito do carbamato na concentração celular em suspensão, respectivamente, 100 mg L<sup>-1</sup> (a) e 200 mg L<sup>-1</sup> (b). (◇) controle, (▲) 100 mg L<sup>-1</sup> e (■) 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato.

Os perfis de controlo correspondentes a cada ensaio, isto é, os microrganismos viáveis existentes nas águas brancas na ausência de biocida durante o período de cada teste, são também apresentados nas mesmas figuras. A Tabela 9.4 sumaria a redução nas células viáveis em suspensão nas águas brancas, em termos de  $\Delta\log$ , devida à acção do carbamato e do glutaraldeído.



(a)



(b)

**Figura 9.6** Efeito do glutaraldeído na concentração celular em suspensão, respectivamente, 50 mg L<sup>-1</sup> (a) e 100 mg L<sup>-1</sup> (b). (◇) controlo, (◆) 50 mg L<sup>-1</sup> e (\*) 100 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído.

Conforme pode ser observado nas Figuras 9.5 e 9.6, a população microbiana em suspensão no circuito de águas brancas sem adição de biocidas é bastante elevada, variando com o tempo numa gama compreendida entre 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Valores da mesma ordem de grandeza são referidos por Raaska *et al.* (1999). Estes valores apesar de muito elevados, não são de todo surpreendentes pois as máquinas de papel são sistemas abertos onde é impossível operar em condições estéreis. A este facto acresce o uso crescente de fibras secundárias (papel reciclado) e a reutilização da água de processo por fecho do circuito de águas, que contribuem para o aumento da disseminação de microrganismos.

As Figuras 9.5 e 9.6 mostram também que a população microbiana em suspensão nas águas brancas decresceu sempre que se aplicaram os biocidas ao sistema. O decréscimo

obtido pela adição de glutaraldeído foi significativamente maior que o obtido com a aplicação de carbamato (Tabela 9.4). Novamente, o facto de se ter duplicado a concentração de cada biocida não se traduziu por uma maior redução das células viáveis em suspensão no circuito. Regra geral, a presença de glutaraldeído no circuito de águas brancas reduziu as células viáveis em suspensão em cerca de 3 ordens de grandeza, enquanto que a aplicação de carbamato só causou uma redução à volta de 1 ordem de grandeza.

**Tabela 9.4** Redução da população celular em suspensão causada pela aplicação de carbamato e glutaraldeído ao circuito de águas brancas, determinada de acordo com a Equação 9.3; valores médios  $\pm$  desvio padrão; (\*) não determinado

Tempo (d)	Redução da população celular em suspensão ( $\Delta\log_{10}$ )			
	100 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato	50 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído	100 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído
2	0.4 ( $\pm$ 0.3)	0.8 ( $\pm$ 0.6)	1.8 ( $\pm$ 1.1)	3.5 ( $\pm$ 1.3)
4	1.8 ( $\pm$ 0.8)	0.5 ( $\pm$ 0.4)	2.0 ( $\pm$ 0.6)	2.5 ( $\pm$ 0.6)
7	0.7 ( $\pm$ 0.6)	0.2 ( $\pm$ 0.7)	3.1 ( $\pm$ 0.5)	2.8 ( $\pm$ 1.2)
9	0.7 ( $\pm$ 0.8)	0.9 ( $\pm$ 0.8)	2.7 ( $\pm$ 0.4)	2.0 ( $\pm$ 1.1)
11	0.8 ( $\pm$ 0.3)	1.2 ( $\pm$ 0.8)	3.3 ( $\pm$ 0.6)	0.9 ( $\pm$ 0.5)
12	0.4 ( $\pm$ 0.4)	*	3.3 ( $\pm$ 0.6)	*

Se compararmos estes valores com os obtidos na redução da massa de depósito acumulado, verificamos que ambos os biocidas são mais eficientes em reduzir a população celular em suspensão do que a controlar a formação dos depósitos nas placas de aço inox. De facto, com a aplicação de carbamato, a massa de depósito acumulada nas placas metálicas foi reduzida cerca de 30 % a 40 % ao passo que foi observada uma redução de 0.2  $\log_{10}$  a 1.8  $\log_{10}$  nas populações microbianas em suspensão (cerca de 70 % a 95 %). A presença de glutaraldeído no sistema reduziu as células viáveis em suspensão numa gama compreendida entre 80 % e 99 % (uma redução de 0.9 a 3.5 na base  $\log_{10}$ ), enquanto que a massa de depósito aderida às placas de adesão foi reduzida somente 40 % a 55 %. Estes factos indicam inequivocamente que a acção tóxica de ambos os biocidas é marcadamente mais intensa na desinfecção do circuito das águas brancas do que a remover as camadas dos depósitos de sujamento.

A capacidade do carbamato e do glutaraldeído poderem funcionar como agentes de agregação, neste ambiente industrial, foi investigada filtrando amostras de água branca com uma tela filtrante de 200 mesh, com e sem aplicação dos referidos biocidas. Como se pode ver na Tabela 9.5, a presença de 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato induz uma evidente melhoria na redução da população microbiana em suspensão do circuito de águas brancas, após a filtração. O mesmo não se passa com a aplicação de glutaraldeído (Tabela 9.6).

**Tabela 9.5** Redução da população microbiana em suspensão, obtida por filtração da água branca tratada com 200 mg L<sup>-1</sup> de carbamato, através de uma tela filtrante de 200 mesh, determinada segundo a Equação 9.4; valores médios ± desvio padrão; (\*) não determinado

Tempo (d)	Controlo (sem biocida)			200 mg L <sup>-1</sup> de carbamato		
	Concentração celular UFC mL <sup>-1</sup>		Retenção (%)	Concentração celular UFC mL <sup>-1</sup>		Retenção (%)
	Amostra	Amostra filtrada		Amostra	Amostra filtrada	
2	7.6 (±0.4)	*	-	6.8 (±0.5)	6.6 (±0.5)	61.0
4	7.6 (±0.5)	7.5 (±0.2)	19.7	7.1 (±0.1)	6.7(±0.03)	61.5
7	7.4 (±0.6)	7.3 (±0.4)	12.5	7.1 (±0.3)	6.8 (±0.2)	44.2
9	7.8 (±0.6)	8.1 (±0.8)	-	6.9 (±0.6)	6.7 (±0.2)	-
11	8.7 (±0.8)	8.7 (±1.0)	-	7.5 (±0.1)	6.9 (±0.8)	37.9

**Tabela 9.6** Redução da concentração celular em suspensão obtida por filtração da água branca tratada com 50 mg L<sup>-1</sup> de glutaraldeído, através de uma tela filtrante de 200 mesh, determinada segundo a Equação 9.4; valores médios ± desvio padrão; (\*) não determinado

Tempo (d)	Controlo (sem biocida)			50 mg L <sup>-1</sup> de glutaraldeído		
	Concentração celular UFC mL <sup>-1</sup>		Retenção (%)	Concentração celular UFC mL <sup>-1</sup>		Retenção (%)
	Amostra	Amostra filtrada		Amostra	Amostra filtrada	
2	6.7 (±0.7)	6.6 (±0.3)	24.6	4.9 (±0.8)	5.4 (±0.4)	-
4	7.6 (±0.2)	7.8 (±0.7)	-	5.6 (±0.6)	5.5 (±0.9)	33.5
7	7.7 (±0.2)	*	-	4.6 (±0.5)	*	-
9	7.2 (±0.2)	7.4 (±0.1)	-	4.5 (±0.4)	4.6 (±0.4)	-
11	7.9 (±0.6)	6.2 (±1.0)	44.6	4.6 (±0.2)	4.7 (±0.3)	-
12	7.6 (±0.6)	6.7 (±1.2)	8.2	4.3 (±0.1)	4.2 (±0.2)	14.0

Ainda que utilizando métodos diferentes na avaliação da biomassa viável, as percentagens de retenção obtidas com a filtração das amostras, após terem sido tratadas com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de carbamato, são bastante parecidas com as obtidas nos ensaios laboratoriais de retenção, com a aplicação da mesma concentração de carbamato a uma cultura de *P. fluorescens* (Capítulo 6). Estes resultados são, de certa forma, surpreendentes pois sabe-se que neste tipo de ambiente industrial pode ser encontrada uma enorme variedade de microrganismos (Purkiss, 1973; Eagon, 1995). Esta coincidência de resultados levanta a possibilidade do carbamato alterar a carga superficial eléctrica de outros microrganismos, que não somente as bactérias *P. fluorescens*. Esta hipótese, contudo, não foi testada no âmbito deste trabalho.

Com base nos valores de retenção obtidos, facilmente se depreende que a retenção das células microbianas como aglomerados discretos na tela filtrante, devido à acção do carbamato, adquire crescente interesse uma vez que é conseguida através de um simples processo físico – filtração. O carbamato, para além da acção biocida, assume, assim, um papel similar ao dos tradicionais agentes de retenção. Desta forma, consegue-se uma maior percentagem global de redução dos microrganismos em suspensão, sem se aumentarem os custos económicos.

Estes resultados sugerem que outras substâncias com propriedades coagulantes e/ou floculantes, tais como os agentes de retenção vulgarmente usados nas indústrias de pasta e papel, possam vir a revelar-se eficientes no controlo das populações microbianas e da formação de biofilmes, e por consequência constituir uma alternativa plausível ao uso de biocidas. Esta sugestão é reforçada por Robertson (1995) que afirma que os problemas de “fouling” das indústrias de pasta e papel podiam ser minimizados promovendo a retenção das substâncias indesejáveis (nas quais os microrganismos se incluem) nas fibras celulósicas e na teia filtrante pelo uso de coagulantes e floculantes.

Na linha da sugestão apresentada, refira-se o trabalho de Gould (1999) que demonstrou que é possível substituir os biocidas utilizados na mesa de formação por outros produtos não biocidas e seguros do ponto de vista ambiental. Estes produtos, denominados de inibidores de biofilme, controlaram os biofilmes e a deposição na parte húmida da máquina de papel interferindo com a formação da matriz polimérica numa fase inicial de formação do biofilme.

## 9.5 CONCLUSÕES

Com este trabalho pretendeu-se conhecer o desempenho de dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, na redução da concentração celular em suspensão no circuito de águas brancas, bem como na prevenção da formação de depósitos, em condições operacionais reais de uma indústria de pasta e papel. Simultaneamente também se testou a hipótese do carbamato poder ser utilizado como um agente de agregação microbiana, neste género de indústria, assumindo então um papel idêntico aos convencionais agentes de retenção.

Ambos os biocidas provaram ser mais eficientes em reduzir a população microbiana em suspensão nas águas brancas do que em reduzir a massa de depósito acumulada nas células de fluxo. Se compararmos os desempenhos de ambos os biocidas, o glutaraldeído mostrou ser mais eficiente na redução dos parâmetros avaliados do que o carbamato.

O carbamato, contudo, confirmou possuir capacidade de aglomeração celular uma vez que, a carga microbiana em suspensão diminuiu consideravelmente quando a água branca, tratada com carbamato, foi filtrada através de um filtro-tela. Esta capacidade, não detectada com o glutaraldeído, em induzir a formação de agregados microbianos, que podem ser separados das águas brancas por filtração, aproximam-no dos convencionais agentes de retenção.

Se associarmos o potencial de agregação do carbamato com um processo de filtração, o uso do carbamato provoca uma acrescida redução dos microrganismos em suspensão, que não pode ser menosprezada. Este facto caracteriza, decididamente, o carbamato como um ajudante de agregação e levanta a hipótese deste poder ser incluído no grupo dos tradicionais ajudantes de retenção usados na indústria da pasta e do papel.

A implementação de metodologias similares à descrita, isto é, a associação do uso de agentes de retenção convencionais com um processo de filtração, poderá contribuir para a redução da população microbiana em suspensão e, por consequência, da acumulação de biofilme nos equipamentos, sem introduzir compostos tóxicos no circuito de água.

## 9.6 BIBLIOGRAFIA

- APHA, AWWA, WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> edition, Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. e Trussel, R. R. eds. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Bott, T. R. 1995. *Fouling of Heat Exchangers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B. V..
- Dexter, R. J. 1996. Industry's efforts at effluent closure must focus on competitive innovation. *Pulp & Paper*, 70(2), 55-61.
- Cantrell, J. A., Lefevre, G. 1989. Control of detrimental substances. *Western Section CPPA Conference*, Vancouver, Canada, April 1989.
- Claus, G. e Muller, R. 1996. Biofilms in a paper mill process water system. In: Heitz, E., Flemming, H-C. e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer-Verlag, 429-437.
- Daniel, W. W. 1987. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. Wiley and Sons, New York.
- Eagon, R. G. 1995. Paper, pulp and food grade paper. In: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of biocide and preservative use*. Glasgow, UK, Blackie Academic and Professional, 83-95.
- Flemming, H-C. e Schaule, G. 1996. Measures against biofouling. In: Heitz, E., Flemming, H-C. e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer-Verlag, 121-139.
- Gould, I. 1999. Métodos no biocidas de control de biofilm. *El Papel*, Novembro 1999, 56-60.
- Gudlauskis, D. 1996. Whitewater system closure means managing microbiological buildup. *Pulp and Paper Magazine*, March 1996.
- Johnsrud, S. C. 1997. Biotechnology for solving slime problems in the pulp and paper industry. In: Scheper, T. ed. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry - Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 311-328.
- Klahre, J., Lustenberger, M. e Flemming, H-C. 1997. The achilles heel of paper production: microbial problems. In: *Wet and Chemistry Conference & COST Workshop*, Gatwick, 28-29 May, Pira International.
- Lazarova, V. e Manem, J. 1995. Biofilm characterisation and activity analyses in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29, 2227-2245.
- Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*, 8(4), 573-603.
- Melo, L. F. e Vieira, M. J. 1999. Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. *Bioprocess Engineering*, 20, 363-368.
- Pellegrin, V., Juretschko, S., Wagner, M. e Cottenceau, G. 1999. Morphological and biochemical properties of *Sphaerotilus* sp. isolated from paper mill slimes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 156-162.
- Purkiss, B. E. 1973. Control of slime in the paper industry. *Papeterie*, 1, 26-39.
- Raaska, L., Alakomi, H-L., Salkinoja-Salonen, M. e Mattila-Sandholm T. 1999. Antagonistic activity of *Staphylococcus siderophores* and chemical biocides against *Bacillus subtilis* in a paper-machine environment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 22, 27-32.
- Robertson, L. R. 1995. Impact of water reuse on microbial colonization of paper machines. *TAPPI Papermakers Conference*, Abril 23-26, Chicago, Illinois.
- Rossmore, H. W: 1995. Introduction to biocide use. In: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Glasgow, UK, Blackie Academic & Professional, 1-18.

Salzburger, W. 1996. Paper and Additives. *In*: Flemming, H.-C., Sand, W. e Heitz, E. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Germany, Springer-Verlag, 415-427.

## **10. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO**

A presente dissertação centrou-se no estudo da eficácia de dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, em sistemas de biofilme. O trabalho experimental compreendeu, essencialmente, a investigação da acção dos dois biocidas na adesão inicial de *P. fluorescens* a suportes de aço inox, e a determinação da acção antimicrobiana dos biocidas na actividade respiratória de culturas suspensas e de biofilmes. Neste trabalho, também se caracterizou o efeito do caulino na actividade respiratória das bactérias, desenvolvidas em suspensão e em biofilme, bem como no desempenho antimicrobiano dos biocidas. Os trabalhos laboratoriais foram complementados com ensaios “on-line” realizados numa indústria de pasta e papel.

Em resumo, as principais conclusões, resultantes do trabalho experimental realizado no domínio desta dissertação, são as seguintes:

- O carbamato, sob determinadas condições de temperatura e de pH, alterou a carga superficial eléctrica de *Pseudomonas fluorescens* para valores nulos ou positivos. Desta forma, o fenómeno de adesão inicial desta bactéria a superfícies carregadas negativamente, como o aço inox, foi favorecido. O glutaraldeído interferiu com a adesão inicial de modo distinto, isto é, este pareceu aumentar a repulsão entre as bactérias e o aço inox, uma vez que o número de bactérias aderidas ao aço inox diminuiu com a sua aplicação.

- Como consequência da alteração da carga superficial eléctrica das bactérias, o carbamato promoveu também a formação de agregados bacterianos. Esta característica indicou o carbamato como um agente de agregação microbiana, e fez despontar a possibilidade deste poder ser usado como um agente de retenção. A utilização de agentes de retenção é uma prática corrente em alguns sectores industriais, nomeadamente, na indústria de pasta e papel. O processo de retenção corresponde a formar agregados microbianos (sem produção de exopolímeros) que podem incorporar na pasta de papel sem risco para a qualidade do papel.

- O carbamato provou poder ser comparado a um agente de agregação tradicional, e por consequência poder ser considerado como um ajudante de retenção na indústria da pasta e papel, uma vez que, quer nos ensaios laboratoriais quer nos ensaios realizados em condições industriais, causou índices de retenção celular bastante elevados (45 % a 75 % em menos de 5 min de contacto com o biocida). Estas constatações sugeriram que outras substâncias com

propriedades coagulantes e/ou floculantes, tais como os tradicionais agentes de retenção usados nas indústrias de pasta e papel, possam vir a revelar-se eficientes no controlo das populações microbianas e da formação de biofilme e, por consequência, constituir uma alternativa consistente e aceitável, do ponto de vista ambiental, ao uso de biocidas.

. A presença de partículas de caulino nas suspensões bacterianas estimulou claramente a actividade respiratória específica de *P. fluorescens*, mesmo quando as suspensões bacterianas estavam inicialmente tamponadas a diferentes valores de pH. Esta acção estimuladora foi particularmente mais significativa nos ensaios realizados a pH diferente do valor óptimo. As diferentes configurações espaciais adoptadas pelo caulino, em função do pH, pode explicar, em parte, o efeito estimulador do caulino. Todavia, os mecanismos envolvidos neste fenómeno não são claros, pelo que deverão ser objecto de mais investigação em trabalhos futuros.

■ O efeito estimulador do caulino também se manifestou quando as bactérias *P. fluorescens* estavam constituídas em biofilmes mistos, isto é, em biofilmes formados na presença de partículas de caulino. O aumento da actividade respiratória das bactérias dos biofilmes, em consequência da incorporação de caulino, pode ser devido ao estabelecimento de microambientes favoráveis no interior do biofilme, pois as argilas podem adsorver metabolitos tóxicos, trocar iões e exercer um efeito tampão local, beneficiando assim o metabolismo bacteriano.

■ A aplicação de ambos os biocidas reduziu a actividade respiratória das bactérias *P. fluorescens*, quer quando estas cresceram em suspensão quer quando se constituíram em biofilme. No entanto, a redução causada pela adição de glutaraldeído é nitidamente superior à obtida com a aplicação de carbamato. Estes resultados permitem concluir que, em termos de efeito letal, e nas condições testadas, a eficiência do glutaraldeído é bastante superior à registada com o carbamato.

■ Os dois biocidas, carbamato e glutaraldeído, demonstraram ser mais eficazes na redução da actividade respiratória de *P. fluorescens* em suspensão do que quando estas mesmas bactérias estavam constituídas em biofilme. Como a razão biocida/bactéria foi menor nas suspensões bacterianas do que nos biofilmes, pode-se então concluir que a diminuição da acção antimicrobiana dos biocidas, quando aplicados a biofilmes, se deve a factores intrínsecos ao próprio biofilme ou ao meio circundante. Estes factores estão, de um

modo geral, implicados no desenvolvimento de formas de resistência por parte das bactérias englobadas nos biofilmes.

- As partículas de caulino interferem com o desempenho dos biocidas, interferência essa pouco marcada ou mesmo insignificante no caso do glutaraldeído e mais declarada e significativa com a aplicação de carbamato, pois a eficiência do carbamato diminuiu nos ensaios com a argila. A menor eficiência do carbamato, na presença de caulino, pode ser resultado da diminuição da quantidade de carbamato em solução disponível para as bactérias, pois testes paralelos demonstraram que o caulino possui a capacidade de remoção do carbamato do meio de cultura. Este efeito de remoção do carbamato parece estar associado à adsorção química deste às partículas de caulino, resultando na formação de novas moléculas não tóxicas.

- Nos ensaios realizados em ambiente industrial, ambos os biocidas revelaram, novamente, ser mais eficientes na redução da população microbiana em suspensão nas águas brancas do que na diminuição da massa dos depósitos. O glutaraldeído voltou a ser o biocida mais eficiente na redução dos parâmetros avaliados. Os resultados obtidos sugerem que as estratégias de controlo do sujamento biológico não devem confinar-se à remoção dos depósitos dos equipamentos por aplicação de biocidas, mas também devem incluir procedimentos de limpeza mecânica. A implementação de medidas de controlo dos microrganismos em suspensão nos circuitos de água também deve ser considerada, pois estes são os percursos determinantes do aparecimento de biofilmes.

Ainda que os principais objectivos deste trabalho tenham sido, na sua maioria, alcançados, há questões que não ficaram totalmente esclarecidas, pelo que seria interessante obter mais algumas informações complementares. Assim, sugere-se, a curto prazo:

- Avaliar o efeito dos biocidas e das partículas de caulino em biofilmes desenvolvidos em regime turbulento, de modo a ser possível conhecer o efeito do regime de fluxo no desempenho dos biocidas.

- Desenvolver e caracterizar biofilmes simples e mistos com a adição contínua dos biocidas.

---

- Determinar, mais pormenorizadamente, quais os mecanismos envolvidos na acção estimuladora do caulino, principalmente quando este é incluído nas suspensões bacterianas.

De seguida, são apresentadas mais algumas sugestões, cuja concretização exigiria bastante mais trabalho, pelo que poderão constituir, na sua essência, possíveis tópicos para futuros trabalhos de investigação, a concretizar mais a longo prazo.

- Testar novas estratégias de aplicação destes biocidas a biofilmes, nomeadamente, no que refere ao número de choques, tempo de duração de cada choque e tempo de intervalo entre os choques.

- Alargar o estudo a outros biocidas, devendo-se incidir, preferencialmente, em biocidas aceitáveis do ponto de vista ambiental. A aplicação de outras substâncias com carácter antimicrobiano, tais como, enzimas, bacteriófagos e biodispersantes, também deve ser objecto preferencial de investigação.

- Desenvolver e testar novas estratégias de controlo de biofilmes baseadas na combinação de mais que um agente antimicrobiano, como por exemplo: enzimas-biocidas; biodispersantes-biocida, etc.

- Investigar e caracterizar as formas de resistência adoptadas pelos microrganismos quando constituídos em biofilme, face à aplicação dos biocidas.