

Lúcia da Conceição Diogo Chaves

# Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Tecnologia do Ambiente pela  
Universidade do Minho

Tese realizada sob a orientação de  
Doutora Maria João Vieira  
Professora Associada



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia Biológica

2004

*“Preferi a ciência ao fino ouro,  
pois a Sabedoria vale mais que  
as pérolas e jóia alguma pode igualá-la”.*

(Prov 8, 10-11)

Aos meus Pais,  
à Sofia, ao Filipe e ao Ni.

## Agradecimentos

Quero expressar os meus melhores agradecimentos e o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, directa ou indirectamente, para a concretização deste trabalho:

À **Doutora Maria João Vieira** agradeço a orientação científica, o incentivo, a confiança depositada, a disponibilidade e o apoio ao longo de todo o trabalho em especial durante a escrita da tese e revisão final;

À **Universidade do Minho** e em particular ao **Director do Departamento de Engenharia Biológica** e à **Comissão Directiva do Mestrado em Tecnologia do Ambiente**, agradeço a oportunidade que me concederam de participar neste Mestrado, bem como a disponibilização das instalações e de todos os recursos postos à disposição, durante a execução prática deste trabalho;

Ao Director do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **Professor Doutor João Carlos Sousa**, agradeço por ter disponibilizado meios humanos e materiais para a realização da identificação das bactérias isoladas da água potável;

À **Dr.ª Susana** do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço todo o trabalho e tempo dispendido na realização da identificação das bactérias da água potável e a amabilidade com que sempre nos recebeu;

Ao **Doutor Pierre Morin** agradeço a orientação técnica e científica disponibilizada no arranque deste trabalho, que muito contribuiu para a sua boa execução;

À **Doutora Joana Azeredo** e à **Doutora Pilar Teixeira** agradeço os esclarecimentos prestados sobre a adesão de microrganismos a superfícies, assim como a revisão final desta matéria na tese;

À **Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Pacheco** o meu sincero agradecimento pelo apoio, ajuda prática no isolamento e identificação das bactérias da água e sua caracterização e amizade demonstrada ao longo de todo o trabalho;

Ao **Engenheiro Nuno Azevedo** desejo expressar o meu sincero agradecimento pelo apoio, as sugestões feitas durante a escrita da tese e toda a amizade partilhada ao longo deste trabalho;

Aos **Amigos e Colegas de Laboratório** e desculpem aqui não particularizar, mas assim não esqueço ninguém, tenho a agradecer o companheirismo nos bons e maus momentos, o agradável convívio, o óptimo ambiente de trabalho que me proporcionaram, a amizade partilhada e toda a ajuda dispensada;

Aos técnicos de Departamento de Engenharia Biológica, nomeadamente o **Sr. Manuel Santos** e a **D. Maria dos Anjos**, agradeço toda a colaboração técnica e laboratorial prestada;

A todos os meus amigos, tenho a agradecer a amizade, carinho, apoio, incentivo e coragem que sempre me deram em todos os momentos;

Finalmente, agradeço à minha família, em especial aos meus **Pais, Irmãos** e ao **Ni**, pela presença sempre atenta, amor, carinho dedicado, compreensão, ajuda, apoio, incentivo e encorajamento que sempre me deram ao longo da minha vida. A eles Muito Obrigada!

## Resumo

Um dos principais objectivos das Companhias de Água em todo o Mundo é distribuir às populações água potável de qualidade. No entanto, a crescente incidência de infecções relacionadas com a ingestão de água tornou o controlo da qualidade da água para consumo humano uma preocupação dominante para as entidades gestoras de sistemas de abastecimento de água, para garantir que a água potável que chega aos consumidores não constitui um risco para a saúde pública. A água que circula nas redes de distribuição está longe de constituir um produto puro e estável, uma vez que a densidade dos microrganismos presentes aumenta com o tempo de residência e a distância entre a estação de tratamento e o utilizador. O crescimento microbiano nas condutas da rede de distribuição sob a forma de biofilmes é a principal causa de deterioração da qualidade da água distribuída, pois estes permitem a manutenção dos microrganismos em condições viáveis e são um local privilegiado para a sobrevivência de muitos microrganismos patogénicos. No entanto, o controlo da formação de biofilmes em sistemas de distribuição de água potável não é uma tarefa fácil, porque são muitos os factores que influenciam a sua formação e estrutura.

Com o objectivo de estudar a cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com a água potável, o presente trabalho foi subdividido nas seguintes tarefas:

- Estudo da influência de diferentes factores na formação de biofilme pela quantificação do número de bactérias totais e cultiváveis. Os factores estudados foram o tipo de material da superfície em contacto com a água potável, o regime de escoamento hidráulico e a concentração de matéria orgânica biodegradável (nutrientes) presente na água. Para tal, foram realizados diversos ensaios de formação de biofilme num sistema de células de fluxo testando simultaneamente duas superfícies de adesão, aço inoxidável 316 e PVC, em regime de escoamento turbulento e laminar e com e sem a adição de nutrientes à água. A quantificação das bactérias cultiváveis foi efectuada em dois meios de cultura diferentes, R<sub>2</sub>A e TSA, com o intuito de estudar o efeito do meio de cultura na contagem de bactérias heterotróficas em placa. Foram também utilizadas várias técnicas microscópicas com o objectivo de estudar a influência dos diferentes factores na arquitectura de biofilmes “maduros”.

- Identificação das bactérias presentes na água que alimenta o sistema de células de fluxo, responsáveis pela formação de biofilme, pelo sistema de identificação Programa API (ID32GN), assim como caracterização das bactérias e das superfícies de adesão usadas para o crescimento do biofilme, no que respeita às propriedades superficiais, nomeadamente as tensões superficiais e a hidrofobicidade, através da técnica de medição de ângulos de contacto. Efectuou-se ainda uma previsão teórica da adesão bacteriana das várias espécies encontradas na água às superfícies de adesão em estudo neste trabalho por aplicação da teoria termodinâmica da adesão.

Da realização do trabalho proposto para esta dissertação pode-se concluir que:

- A acumulação de biofilme na superfície das condutas da rede de distribuição de água potável é influenciada pelos vários factores em estudo neste trabalho e pela variação da qualidade da água que entra no sistema. Contudo, embora a variabilidade das características da água potável à entrada do sistema, tal como o perfil microbiológico, influencie as cinéticas de formação de biofilme, o impacto sobre o potencial de crescimento do biofilme é muito limitado permitindo obter conclusões sobre a importância relativa de cada um dos outros factores em estudo neste trabalho. Assim, do factor mais importante para o menos importante, a acumulação de biofilme nas superfícies aumenta devido à adição de nutrientes à água, ao uso de condições turbulentas em vez de laminares e ao uso de PVC em vez de aço inoxidável como material suporte. O tipo do meio de cultura usado para a quantificação de bactérias cultiváveis influenciou os valores obtidos, concluindo-se que, de entre os estudados, o R<sub>2</sub>A é o melhor meio para a quantificação de bactérias em água potável. A utilização de várias técnicas microscópicas para a visualização do biofilme “maduro” permitiu verificar que as bactérias não são os únicos constituintes dos biofilmes, pois também se podem encontrar fungos, leveduras e protozoários. No entanto, devido ao número limitado de observações que foi possível realizar, não se podem tirar conclusões sobre a influência dos vários factores em estudo na arquitectura do biofilme.

- Foi possível identificar 14 diferentes espécies bacterianas na água potável que alimenta o sistema de células de fluxo. Da caracterização das diferentes espécies bacterianas isoladas da água segundo as propriedades superficiais pode-se concluir que a única espécie bacteriana considerada hidrofóbica foi a *Brevundimonas diminuta* SP1, sendo todas as restantes espécies identificadas hidrofílicas. No entanto, destas, as consideradas como mais hidrofílicas são a *Comamonas acidovorans* SP1 e SP3 e como menos hidrofílicas a *Acinetobacter lwoffii* SP1 e *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* SP1. As superfícies de adesão usadas neste trabalho, aço 316 e PVC, foram caracterizadas de acordo com as suas propriedades superficiais como hidrofóbicas, sendo, no entanto, o aço 316 ligeiramente mais hidrofóbico que o PVC. Do estudo da previsão teórica da adesão bacteriana a superfícies por aplicação da teoria termodinâmica da adesão pode-se concluir que, para qualquer das espécies bacterianas isoladas da água potável, a adesão é termodinamicamente mais favorável para o aço do que para o PVC; a espécie *Brevundimonas diminuta* SP1 considerada como mais hidrofóbica é aquela que possui uma adesão mais favorável de acordo com as leis da termodinâmica, para qualquer das superfícies de adesão. Pelo contrário, a *Comamonas acidovorans* SP1, considerada como a espécie mais hidrofílica, apresenta uma adesão termodinamicamente desfavorável.

## Abstract

One of the main goals for water companies, all over the world, is to supply to the consumer drinking water with quality. Nevertheless, the increase in the diagnostic of infections related with water consumption, in order to ensure that the consumers have potable water that does not constitute a public health risk, the control of water quality became a dominant concern for the entities that run the systems of water supply.

The water that runs in the distribution networks is far from constitute a pure and stable product since, the existent microorganism density increases with residence time and with the distance from the water station to the consumer. The microbial growth in the distribution system as biofilms is the main cause for quality deterioration of the supplied water since, it allows the maintenance of microorganisms in viable conditions and are a privileged environment for the survival of pathogenic microorganisms. However, the control of biofilm formation in drinking water distribution systems is not an easy task because, there are multiple factors that influence biofilm formation and structure.

With the perspective to study the biofilm formation kinetics in drinking water distribution systems, the present work had the following objectives:

- To study the influence of different factors in biofilm formation by quantifying the number of total and culturable bacteria. The factors studied were the type of material that was in contact with the drinking water, the hydrodynamic conditions and the concentration of biodegradable organic matter (nutrients) presented in water. For that, several biofilm formation assays were made in a flow cell system by testing two different adhesion surfaces, stainless steel 316 (SS) and PVC, under turbulent and laminar flow and with and without nutrient addition to the water. The quantification of culturable bacteria was assessed with two different culture media, R<sub>2</sub>A and TSA, with the aim to investigate the effect of the culture media in the number of heterotrophic bacteria with the ability to growth in solid media. Several microscopic techniques were also used with the objective to investigate the influence of different factors in the architecture of mature biofilms.

- The identification of bacteria presente in the water that feed the flow cells system, responsible for biofilm formation, was performed by the identification system API (ID32GN). To characterize the bacteria and the adhesion surfaces used for biofilm growth, concerning surface properties, namely surface tension and hidrophobicity, by the contact angles measurement. To achieve a theoretical prevision for bacteria adhesion, of the several species found in the water, to the surfaces under study by the application of the thermodynamic adhesion theory.

From the results of the work carried out for this dissertation, the following conclusions can be drawn:

- The biofilm accumulation on the surface pipes of the drinking water distribution network is affected by the several factors studied in this work and by the variation in the concentration of bacteria in the water that feed the system. Nevertheless, albeit the variability in the drinking water characteristics that feed the system, as the microbiological profile, had influence in the biofilm kinetics, the impact for biofilm growth potential is limited allowing to obtain other conclusions about the relative importance of each one of the factors studied in this work. From the most relevant to the least relevant factor, the biofilm accumulation on the surfaces increased due to the addition of nutrients to water, the use of turbulent instead of laminar flow conditions and the use of PVC instead of SS as support material. The type of culture media used to quantify the culturable bacteria affected the number obtained, allowing to conclude that R<sub>2</sub>A is the best media to quantify the bacteria in drinking water. The utilization of several microscopic techniques for the visualization of mature biofilms allowed to verify that bacteria are not the sole constituents of biofilms: fungi, yeasts and protozoa can also be found in the biofilm. However, due to the limited number of microscopic observations, no conclusions can be drawn concerning the influence of the several factors under study in the biofilm architecture.

- It was possible to identify 14 different bacterial species in the drinking water that feed the flow cell system. From the different species characterization, according to the surface properties, it was concluded that the only bacteria specie considered hydrophobic was *Brevundimonas diminuta* SP1, being all the other species hydrophilic. Nevertheless, the ones considered as more hydrophilic were *Comomonas acidovorans* SP1 and SP3 and as less hydrophylic *Acinetobacter lwoffii* SP1 and *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* SP1. The adhesion surfaces, used in this work, SS and PVC, were characterized in accordance with their surface properties as hydrophobic, being SS more hydrophilic than PVC. From the theory prevision for bacteria adhesion to surfaces, by the application of the thermodynamic adhesion theory, it was possible to conclude that for every bacterial species isolated from drinking water, the adhesion is thermodynamically more favourable for SS than for PVC; *Brevundimonas diminuta* SP1, considered as the most hydrophobic, is the one that had a more favourable adhesion according to the thermodynamic theory, for both adhesion surfaces. Conversely, *Comomonas acidovorans* SP1, considered as the most hydrophilic, had a thermodynamically unfavourable adhesion.

## Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SIMBOLOS.....	xv
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 - Controlo da Qualidade da Água Potável de Abastecimento Público .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 - Microbiologia dos Sistemas de Distribuição de Água Potável .....	2
1.1.2 - Causas de Contaminação da Água nos Sistemas de Distribuição .....	3
<b>1.2 - Definição de Biofilme .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 - Composição dos Biofilmes .....	5
<b>1.3 - Importância do Estudo dos Biofilmes .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 - Formação de Biofilmes .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 - Factores que Influenciam a Formação de Biofilme.....</b>	<b>11</b>
1.5.1 - pH.....	12
1.5.2 - Temperatura .....	12
1.5.3 - Velocidade de Escoamento/Regime de Escoamento .....	13
1.5.4 - Concentração de Nutrientes .....	14
1.5.5 - Tipo de Material da Superfície e o Seu Estado de Conservação.....	15
1.5.6 - Concentração de Agentes Anti-Microbianos (Concentração de Cloro).....	16
<b>1.6 - Reactores de Biofilme.....</b>	<b>17</b>
1.6.1 - Reactores para a Monitorização de Biofilmes.....	18
1.6.1.1 - Células de Fluxo.....	19
1.6.1.2 - Reactores Anulares Rotativos .....	21
<b>1.7 - Mecanismo de Adesão Bacteriana e Colonização de Superfícies.....</b>	<b>21</b>

---

1.7.1 - Processo de Adesão .....	22
<b>1.8 - Teorias Explicativas da Adesão entre Microrganismos e Superfícies Sólidas.....</b>	<b>24</b>
1.8.1. - Teoria DLVO .....	24
1.8.1.1 - Forças de Curto Alcance .....	25
1.8.1.1.1 - Interações Hidrofóbicas / Hidrofobicidade .....	26
1.8.2 - Teoria Termodinâmica da Adesão .....	27
1.8.3 - Teoria XDLVO .....	28
1.8.3.1 - Interações de Lifshitz-van der Waals .....	28
1.8.3.2 - Interações Ácido-Base de Lewis .....	29
<b>1.9 - Aspectos Microbiológicos da Adesão.....</b>	<b>30</b>
<b>1.10 - Técnicas para Estudar a Adesão.....</b>	<b>31</b>
1.10.1 - Técnicas de Determinação da Tensão Superficial de Sólidos.....	32
1.10.1.1 - Determinação da Tensão Superficial por Medição de Ângulos de Contacto	32
1.10.2 - Técnicas de Determinação da Hidrofobicidade de Superfícies.....	33
1.10.2.1 - Determinação da Hidrofobicidade por Medição de Ângulos de Contacto...	33
<b>CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo .....</b>	<b>37</b>
2.1.1 - Condições Experimentais .....	37
<b>2.2 - Instalação Experimental.....</b>	<b>38</b>
2.2.1 - Sistema de Preparação da Água .....	39
2.2.2 - Sistema de Células de Fluxo .....	40
2.2.3 - Meios de Cultura Líquidos.....	42
2.2.4 - Desinfecção e Lavagem .....	43
2.2.5 - Operação e Monitorização .....	43
2.2.5.1 - Amostragem do Biofilme .....	44
<b>2.3 - Identificação e Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão.....</b>	<b>45</b>
2.3.1 - Identificação das Bactérias Colonizadoras.....	45
2.3.2 - Determinação das Propriedades Superficiais das Bactérias e das Superfícies de Adesão .....	46
2.3.2.1 - Preparação das Células para a Medição de Ângulos de Contacto.....	46
2.3.2.2 - Preparação das Superfícies de Adesão para a Medição de Ângulos de Contacto.....	47
2.3.2.3 - Medição de Ângulos de Contacto de Células Bacterianas.....	48



---

<b>2.4 - Métodos Analíticos .....</b>	<b>48</b>
2.4.1 - Determinação da Temperatura e pH.....	48
2.4.2 - Determinação da Concentração de Cloro Livre .....	49
2.4.3 - Contagem de Heterotróficos em Placa (Bactérias Cultiváveis) .....	49
2.4.4 - Bactérias Totais (Contagem Directa Microbiana Total- Método do Microscópio de Epifluorescência com DAPI).....	51
2.4.5 - Microscopia de Epifluorescência .....	53
2.4.6 - Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	54
2.4.7 - Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC).....	55
2.4.8 - Coloração de Gram .....	55
<b>2.5 - Métodos de Cálculo .....</b>	<b>57</b>
2.5.1 - Contagem de Heterotróficos em Placa (Bactérias Cultiváveis) .....	57
2.5.2 - Contagem de Bactérias Totais.....	57
2.5.3 - Determinação da Tensão Superficial e da Hidrofobicidade das Células e Superfícies de Adesão a partir da Técnica de Medição de Ângulos de Contacto .....	58
2.5.3.1 - Determinação da Tensão Superficial.....	58
2.5.3.2 - Determinação da Hidrofobicidade .....	59
2.5.4 - Determinação da Energia Livre Total de Adesão ( $\Delta G_{adesão}$ ).....	60
2.5.5 - Tratamento Estatístico dos Resultados.....	61
<b>CAPÍTULO 3 – CINÉTICAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SISTEMAS DE FLUXO .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 - Ensaio de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo .....</b>	<b>63</b>
3.1.1 - Qualidade da Água Potável da Rede Pública e da Água do Tanque de Mistura...	64
3.1.2 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Células de Fluxo .....	68
<b>3.2 - Comparação de Diferentes Parâmetros na Formação de Biofilme .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 - Acumulação de Biofilme em Células de Fluxo.....	74
3.2.2 - Influência da Variação da Qualidade da Água do Tanque de Mistura.....	77
3.2.3 - Influência do Tipo de Material .....	78
3.2.4 - Influência do Regime de Escoamento Hidráulico.....	81
3.2.5 - Influência da Concentração de Nutrientes .....	82
<b>3.3 - Efeito do Meio de Cultura na Quantificação das Bactérias Cultiváveis .....</b>	<b>83</b>
3.3.1 - Qualidade da Água Potável da Rede Pública e da Água do Tanque de Mistura...	84
3.3.2 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Células de Fluxo .....	86

<b>3.4 - Visualizações Microscópicas de Biofilme de Água Potável .....</b>	<b>89</b>
<b>3.5 - Conclusões.....</b>	<b>99</b>
<b>CAPÍTULO 4 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS COLONIZADORAS E CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE ADESÃO ....</b>	<b>102</b>
<b>4.1 - Identificação das Bactérias Colonizadoras .....</b>	<b>103</b>
4.1.1 - Isolamento das Bactérias da Água .....	103
4.1.2 - Identificação das Bactérias da Água .....	111
4.1.3 - Estudo do Crescimento das Bactérias da Água nos Dois Meios de Cultura de Isolamento .....	118
<b>4.2 - Caracterização das Bactérias e Caracterização das Superfícies de Adesão .....</b>	<b>119</b>
4.2.1 - Propriedades Superficiais das Bactérias Colonizadoras.....	121
4.2.1.1 - Quantificação Bacteriana das Suspensões Celulares .....	121
4.2.1.2 - Tensão Superficial das Células .....	122
4.2.1.3 - Hidrofobicidade das Células .....	124
4.2.2 - Propriedades Superficiais das Superfícies de Adesão.....	127
4.2.2.1 - Tensão Superficial.....	127
4.2.2.2 - Hidrofobicidade.....	128
<b>4.3 - Estudo Teórico de Previsão da Adesão Bacteriana a Superfícies.....</b>	<b>129</b>
4.3.1 - Capacidade de Adesão .....	129
4.3.2 - Teoria Termodinâmica da Adesão .....	130
<b>4.4 - Conclusões.....</b>	<b>133</b>
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>135</b>
<b>5.1 - Conclusões.....</b>	<b>136</b>
5.1.1 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo .....	136
5.1.2 - Identificação e Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão .....	137
<b>5.2 - Sugestões para Trabalho Futuro .....</b>	<b>138</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>139</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>A1</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>A7</b>
<b>Apêndice I – Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão.....</b>	<b>A1</b>
<b>Anexo A – Composição e Modo de Preparação dos Meios de Cultura.....</b>	<b>A7</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Principais processos envolvidos na formação de um biofilme (Pereira, 2001).....	9
<b>Figura 1.2</b> - Acumulação de biofilme ao longo do tempo (Pereira, 2001).....	9
<b>Figura 1.3</b> - Segmentos de tubagens da rede de distribuição de água potável com visível deterioração. ....	16
<b>Figura 2.1</b> - Representação esquemática da instalação experimental.....	38
<b>Figura 2.2</b> - Fotografia da instalação experimental usada nos ensaios de formação de biofilme.....	39
<b>Figura 2.3</b> - Representação esquemática de uma célula de fluxo.....	41
<b>Figura 2.4</b> - Pormenor de uma placa de adesão.....	41
<b>Figura 2.5</b> - Esquema do equipamento utilizado para a medição de ângulos de contacto (Azeredo, 1998).....	48
<b>Figura 3.1</b> - Variação da concentração de bactérias totais e cultiváveis, expressa em BT/mL e UFC/mL, respectivas concentrações médias, do pH e da temperatura da água do tanque de mistura durante o tempo em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme. .	65
<b>Figura 3.2</b> - Variação da percentagem média de bactérias cultiváveis (em $R_2A$ ), expressa em (UFC/mL)/(BT/mL) (%), na água do tanque de mistura para os ensaios de formação de biofilme realizados. ....	67
<b>Figura 3.3</b> - Variação da temperatura ( $^{\circ}C$ ) nos sistemas de células de fluxo ao longo do tempo, para os vários ensaios de formação de biofilme. (a) Ensaio Tipo $A_1$ e Tipo $B_1$ ; (b) Ensaio Tipo C e Tipo D.....	69
<b>Figura 3.4</b> - Variação do pH nos sistemas de células de fluxo ao longo do tempo para os diferentes ensaios de formação de biofilme. (a) Ensaio Tipo $A_1$ e Tipo $B_1$ ; (b) Ensaio Tipo C e Tipo D.....	70
<b>Figura 3.5</b> - Relação entre o número de bactérias presente no biofilme e no efluente dos sistemas de células de fluxo, onde cresce o biofilme sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para todos os ensaios realizados. (a) Bactérias Totais; (b) Bactérias cultiváveis em $R_2A$ . ....	72

<b>Figura 3.6</b> - Variação da concentração de bactérias, expressa em termos de bactérias totais (BT/cm <sup>2</sup> ) e bactérias cultiváveis em R <sub>2</sub> A (UFC/cm <sup>2</sup> ), para a acumulação de biofilme ao longo do tempo sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para os diferentes tipos ensaios de formação de biofilme realizados, (a) Tipo A <sub>1</sub> ; (b) Tipo B <sub>1</sub> ; (c) Tipo C; (d) Tipo D e (e) Tipo A <sub>0</sub> .....	75
<b>Figura 3.7</b> - Médias da concentração de bactérias totais (BT/cm <sup>2</sup> ) e cultiváveis (UFC/cm <sup>2</sup> ) obtidas através dos pontos das cinéticas de formação de biofilme, depois deste atingir o estado quase estacionário.....	77
<b>Figura 3.8</b> - Variação da concentração de bactérias cultiváveis nos meios de cultura R <sub>2</sub> A e TSA, expressa em termos de UFC/mL e respectivas concentrações médias, da água do tanque de mistura durante o tempo em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme.....	85
<b>Figura 3.9</b> - Variação da percentagem média de bactérias cultiváveis (em R <sub>2</sub> A e TSA), expressa em (UFC/mL)/(BT/mL) (%), na água do tanque de mistura para os ensaios de formação de biofilme realizados.....	86
<b>Figura 3.10</b> - Variação da concentração de bactérias cultiváveis nos meios de cultura R <sub>2</sub> A e TSA, expressa em termos de UFC/cm <sup>2</sup> , para a acumulação de biofilme ao longo do tempo sobre as superfícies de adesão de aço e PVC para os ensaios de formação de biofilme realizados. (a) Tipo A <sub>1</sub> ; (b) Tipo B <sub>1</sub> ; (c) Tipo C e (d) Tipo D.....	87
<b>Figura 3.11</b> - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água em regime turbulento com nutrientes (Tipo A), por microscopia de epifluorescência com CTC+DAPI. (a)-(d) aço e (e) –(f) PVC; ampliação 1000×.....	91
<b>Figura 3.12</b> - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água em regime turbulento com nutrientes (Tipo A), por microscopia de epifluorescência com L/D; ampliação 1000×.....	92
<b>Figura 3.13</b> - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água em regime laminar com nutrientes (Tipo C), por microscopia de epifluorescência com DAPI; ampliação 1000×.....	93
<b>Figura 3.14</b> - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água, por microscopia electrónica de varrimento (SEM). (a) Turbulento sem nutrientes (Tipo B), aço (extremidade da placa); (b) – (h) Laminar sem nutrientes (Tipo D): (b) e (c) aço (extremidade da placa), (d) e (e) aço (centro da placa), (f)-(h) PVC (extremidade da placa).....	95

---

<b>Figura 3.15</b> - Visualização de biofilme formado em superfícies em contacto com a água em regime turbulento sem nutrientes (Tipo B) com diferentes idades (2 e 28 d), por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC); as ampliações encontram-se assinaladas junto de cada figura e a barra corresponde a 10 µm.....	98
<b>Figura 4.1</b> - Placas com diferentes tipos de colónias provenientes da água do tanque de mistura. a) a g), colónias crescidas em meio de cultura R <sub>2</sub> A; h) a p), colónias crescidas em meio de cultura TSA.....	104

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Principais agentes infecciosos da água para consumo .....	3
<b>Tabela 2.1</b> - Condições experimentais dos ensaios de formação de biofilme .....	37
<b>Tabela 2.2</b> - Composição das soluções stock de nutrientes .....	43
<b>Tabela 2.3</b> - Valores das componentes da tensão superficial dos líquidos a 20 °C .....	59
<b>Tabela 3.1</b> - Condições experimentais dos ensaios de formação de biofilme realizados .....	63
<b>Tabela 3.2</b> - Valores médios de BT/mL, UFC/mL (R <sub>2</sub> A), pH e temperatura (°C) na água do tanque de mistura para os vários ensaios de formação de biofilme realizados .....	66
<b>Tabela 3.3</b> - Valores médios da temperatura (°C) no sistema de células de fluxo, para os vários ensaios de formação de biofilme .....	69
<b>Tabela 3.4</b> - Valores médios do pH no sistema de células de fluxo, para os vários ensaios de formação de biofilme .....	70
<b>Tabela 3.5</b> - Valores médios de BT/mL e UFC/mL (R <sub>2</sub> A) no efluente das células de fluxo de aço e PVC, para alguns dos ensaios de formação de biofilme realizados .....	73
<b>Tabela 3.6</b> - Valores da análise estatística obtidos na comparação das curvas de acumulação de biofilme ao longo do tempo, sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para os vários tipos de ensaios realizados, em termos do número de bactérias totais (BT/cm <sup>2</sup> ) e cultiváveis (UFC/cm <sup>2</sup> ) .....	79
<b>Tabela 3.7</b> - Comparação entre os meios de cultura R <sub>2</sub> A e TSA, na capacidade de recuperação de bactérias heterotróficas de amostras de biofilme, água do tanque de mistura (TM) e dos efluentes dos tanques de recirculação (TR), para os vários ensaios de formação de biofilme .....	88
<b>Tabela 4.1</b> - Caracterização de alguns dos isolados bacterianos quanto ao meio de isolamento, à morfologia das colónias e fotografias do crescimento em placa e da observação de colónias isoladas à lupa .....	105
<b>Tabela 4.2</b> - Resultados do crescimento de alguns dos isolados bacterianos nos meios selectivos TBX, PIA e MMM e da coloração de Gram .....	112
<b>Tabela 4.3</b> - Resultados da identificação de alguns dos isolados bacterianos da água do tanque de mistura pelo sistema de identificação Programa API (ID 32 GN) .....	114

<b>Tabela 4.4</b> - Nova designação para as bactérias isoladas e identificadas que é posteriormente usada na caracterização das bactérias no ponto 4.2.1 .....	115
<b>Tabela 4.5</b> - Valores médios dos ângulos de contacto ( $\theta$ ) determinados à temperatura ambiente sobre os filmes celulares das bactérias colonizadoras, com água ( $\theta_W$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ).....	122
<b>Tabela 4.6</b> - Valores das componentes apolar ( $\gamma_b^{LW}$ ), polar ( $\gamma_b^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma_b^+$ e $\gamma_b^-$ ) da tensão superficial ( $\gamma_b^{TOT}$ ) das bactérias colonizadoras.....	124
<b>Tabela 4.7</b> - Valores das componentes apolar ( $\Delta G_{bwb}^{LW}$ ) e polar ( $\Delta G_{bwb}^{AB}$ ) da energia livre de atracção hidrofóbica das bactérias colonizadoras ( $\Delta G_{bwb}^{TOT}$ ).....	126
<b>Tabela 4.8</b> - Valores médios dos ângulos de contacto ( $\theta$ ) determinados à temperatura ambiente sobre as superfícies de adesão, com água ( $\theta_W$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ) .....	127
<b>Tabela 4.9</b> - Valores das componentes apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ), polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma_s^+$ e $\gamma_s^-$ ) da tensão superficial das superfícies de adesão ( $\gamma_s^{TOT}$ ) .....	128
<b>Tabela 4.10</b> - Valores das componentes apolar ( $\Delta G_{sws}^{LW}$ ) e polar ( $\Delta G_{sws}^{AB}$ ) da energia livre de atracção hidrofóbica das superfícies de adesão ( $\Delta G_{sws}^{TOT}$ ) .....	128
<b>Tabela 4.11</b> - Valores da energia livre total de interacção ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre as células bacterianas (b) e a superfície de adesão de <b>aço 316</b> (s) em meio aquoso (l) e as suas componentes apolares ( $\Delta G_{bls}^{LW}$ ) e polares ( $\Delta G_{bls}^{AB}$ ) .....	131
<b>Tabela 4.12</b> - Valores da energia livres total de interacção ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre as células bacterianas (b) e a superfície de adesão de <b>PVC</b> (s) em meio aquoso (l) e as suas componentes apolares ( $\Delta G_{bls}^{LW}$ ) e polares ( $\Delta G_{bls}^{AB}$ ) .....	132
<b>Tabela I.1</b> - Valores da concentração celular dos filmes de bactérias usados para a determinação dos ângulos de contacto, expressa em termos da densidade óptica (DO) e da contagem de bactérias cultiváveis (UFC/mL) .....	A2
<b>Tabela I.2</b> - Valores das componentes apolar ( $\gamma_{bs}^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_{bs}^{AB}$ ) da tensão interfacial bactéria/superfície de adesão ( $\gamma_{bs}$ ), para as duas superfícies de adesão em estudo neste trabalho .....	A4

---

<b>Tabela I.3</b> - Valores das componentes apolar ( $\gamma_{bw}^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_{bw}^{AB}$ ) da tensão interfacial bactéria/líquido ( $\gamma_{bw}$ ), sendo o líquido a água.....	A5
<b>Tabela I.4</b> - Valores das componentes apolar ( $\gamma_{sw}^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_{sw}^{AB}$ ) da tensão interfacial superfície de adesão/líquido ( $\gamma_{sw}$ ), sendo o líquido a água .....	A6
<b>Tabela A.1</b> - Composição do meio de cultura R <sub>2</sub> A .....	A8
<b>Tabela A.2</b> - Composição do meio de cultura TSA.....	A8
<b>Tabela A.3</b> - Composição do meio de cultura TBX .....	A9
<b>Tabela A.4</b> - Composição do meio de cultura PIA.....	A9
<b>Tabela A.5</b> - Composição do meio de cultura Mínimo com Metanol .....	A10



## Lista de Símbolos

### Simbologia

$Re$	Número de Reynolds
$S_F$	Superfície de filtração da membrana, $cm^2$
$S_R$	Superfície do retículo contada, $cm^2$
$V$	Velocidade, m/s
$V_{DL}$	Energia potencial de interacção devido à dupla camada eléctrica, J
$V_T$	Energia potencial de interacção total, J
$V_W$	Energia potencial de interacção devido às forças de <i>van der Waals</i> , J
$\bar{X}$	Média do número de colónias/bactérias contadas nas placas/membranas

### Símbolos Gregos

$\Delta G^{AB}$	Componente polar (AB) da variação da energia livre de adesão, $J/m^2$
$\Delta G^{BR}$	Variação da energia livre de adesão devido aos movimentos Brownianos, $J/m^2$
$\Delta G^{DL}$	Variação da energia livre de adesão devido às interacções electrostáticas, $J/m^2$
$\Delta G^{LW}$	Componente apolar (LW) da variação da energia livre de adesão, $J/m^2$
$\Delta G^{TOT}$	Variação da energia livre total, $J/m^2$
$\Delta G_{adesão}$	Variação da energia livre de adesão, $J/m^2$
$\Delta G_{ii}$	Variação da energia livre de coesão de um material no vácuo, $J/m^2$
$\Delta G_{ii}^{AB}$	Variação da energia livre polar de coesão de um material no vácuo, $J/m^2$
$\Delta G_{ij}^{AB}$	Componente polar da variação da energia livre de interacção entre as substâncias i e j, $J/m^2$
$\Delta G_{ij}^{LW}$	Componente apolar da variação da energia livre de interacção entre as substâncias i e j, $J/m^2$
$\Delta G_{bls}^{AB}$	Componente polar da variação da energia livre de interacção entre as células bacterianas e a superfície em meio aquoso, $J/m^2$

$\Delta G_{bls}^{LW}$	Componente apolar da variação da energia livre de interação entre as células bacterianas e a superfície em meio aquoso, $J/m^2$
$\Delta G_{bwb}^{AB}$	Componente polar da variação da energia livre de interação hidrofóbica da superfície de uma bactéria, $J/m^2$
$\Delta G_{bwb}^{LW}$	Componente apolar da variação da energia livre de interação hidrofóbica da superfície de uma bactéria, $J/m^2$
$\Delta G_{bwb}^{TOT}$	Variação da energia livre de interação hidrofóbica da superfície de uma bactéria, $J/m^2$
$\Delta G_{sws}^{AB}$	Componente polar da variação da energia livre de interação hidrofóbica de uma superfície, $J/m^2$
$\Delta G_{sws}^{LW}$	Componente apolar da variação da energia livre de interação hidrofóbica de uma superfície, $J/m^2$
$\Delta G_{sws}^{TOT}$	Variação da energia livre de interação hidrofóbica de uma superfície, $J/m^2$
$\gamma_{bl}$	Tensão interfacial entre a bactéria e o líquido, $J/m^2$
$\gamma_{bs}$	Tensão interfacial entre a bactéria e a superfície de adesão, $J/m^2$
$\gamma_i$ ou $\gamma_i^{TOT}$	Tensão superficial de uma substância i, $J/m^2$
$\gamma_i^{AB}$	Componente polar da tensão superficial da substância i, $J/m^2$
$\gamma_i^{LW}$	Componente apolar da tensão superficial da substância i, $J/m^2$
$\gamma_i^+$	Parâmetro aceitador de electrões da componente polar da tensão superficial da substância i, $J/m^2$
$\gamma_i^-$	Parâmetro dador de electrões da componente polar da tensão superficial da substância i, $J/m^2$
$\gamma_{ij}$	Tensão interfacial entre as substâncias i e j, $J/m^2$
$\gamma_{ij}^{AB}$	Tensão interfacial polar entre as substâncias i e j, $J/m^2$
$\gamma_{ij}^{LW}$	Tensão interfacial apolar entre as substâncias i e j, $J/m^2$
$\gamma_{lv}$	Tensão interfacial entre o líquido e o vapor, $J/m^2$
$\gamma_{sl}$	Tensão interfacial entre a superfície de adesão e o líquido, $J/m^2$

$\gamma_{sv}$	Tensão interfacial entre a superfície de adesão e o vapor, J/m <sup>2</sup>
$\theta$	Ângulo de contacto
$\theta_B$	Ângulo de contacto obtido com $\alpha$ -bromonaftaleno
$\theta_F$	Ângulo de contacto obtido com formamida
$\theta_W$	Ângulo de contacto com água
$\lambda$	Comprimento de onda

### Abreviaturas

API	Analytical profile index
ASI	American steel institute
BGAC	Carvão activado granular biológico
BT	Bactérias totais
CEB	Centro de engenharia biológica
CTC	5 cyano-2,3-dietyl tetrazolium chloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIC	Microscopia de contraste de interferência diferencial
DLVO	Teoria proposta por Derjaguin, Landau e Verwey e Overbeek
DO	Densidade óptica
DPD	N,N-dietil-p-fenilodiamina
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
GAC	Carvão activado granular
HPC	Contagem microrganismos heterotróficos em placa
L/D	Live/Dead® BacLight™ viability kit
MMM	Meio mínimo com metanol
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Plate count agar
PCR	Polimerase chain reaction
PIA	Pseudomonas isolation agar
PVC	Cloreto de polivinilo
R <sub>2</sub> A	R <sub>2</sub> A agar
RNAr	Ácido ribonucleico ribossómico
SEM	Microscopia electrónica de varrimento

TBX	TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) agar
THM's	Trihalometanos
TM	Tanque de mistura
TR	Tanque de recirculação
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UFC	Unidades formadoras de colónias
XDLVO	Extensão à teoria DLVO

---

## Capítulo 1 - Introdução

---

Neste capítulo faz-se uma revisão bibliográfica dos fundamentos teóricos que estão na base do estudo abordado nesta dissertação. Assim, faz-se uma breve referência à necessidade de controlo da qualidade da água para abastecimento público, por forma a garantir que a água potável que chega aos consumidores não constitua um risco para a saúde pública. Apresenta-se o conceito de biofilme, descrevendo-se os seus principais constituintes e as suas principais vantagens e desvantagens. Faz-se uma descrição sumária do mecanismo de formação de biofilmes e dos principais factores que influenciam a sua formação, assim como de alguns reactores usados para a sua monitorização. Como a formação de qualquer biofilme é sempre precedida pela adesão de células a superfícies sólidas, descreve-se o mecanismo de adesão e as principais teorias explicativas da adesão, bem como os aspectos microbiológicos envolvidos na adesão. Por último faz-se referência a algumas técnicas usadas neste trabalho para o estudo da adesão, nomeadamente as utilizadas para a caracterização das propriedades superficiais dos microrganismos e das superfícies de adesão.

### 1.1 Controlo da Qualidade da Água Potável de Abastecimento Público

### 1.2 Definição de Biofilme

### 1.3 Importância do Estudo dos Biofilmes

### 1.4 Formação de Biofilmes

### 1.5 Factores que Influenciam a Formação de Biofilmes

### 1.6 Reactores de Biofilme

### 1.7 Mecanismo de Adesão Bacteriana e Colonização de Superfícies

### 1.8 Teorias Explicativas da Adesão entre Microrganismos e Superfícies Sólidas

### 1.9 Aspectos Microbiológicos da Adesão

### 1.10 Técnicas para Estudar a Adesão

## 1.1 - Controlo da Qualidade da Água Potável de Abastecimento Público

O controlo da qualidade da água para consumo humano constitui, hoje em dia, uma preocupação dominante para muitas entidades gestoras de sistemas de abastecimento de água de todo o mundo industrializado. Para que se atinja o objectivo de controlar a qualidade da água que é distribuída, é necessário utilizar procedimentos de rastreio eficientes e economicamente viáveis.

A qualidade da água que é consumida pela população depende de diversos factores tais como: a selecção e protecção eficaz e permanente das origens da água; o tratamento adequado da água; a correcta concepção, construção e exploração dos sistemas de distribuição; a manutenção das redes de tubagens e reservatórios de armazenamento; o diagnóstico periódico e sistemático da qualidade da água que é distribuída aos consumidores e a realização de acções correctivas que o diagnóstico evidencie como necessárias.

O modo mais eficiente de diagnosticar se uma água tem a qualidade pretendida, é medir sistematicamente as concentrações dos seus principais constituintes. Para isso deve-se proceder à realização de análises físicas, químicas e microbiológicas da água, com uma frequência adequada, em todo o sistema de abastecimento, desde a origem até à distribuição, incluindo todas as etapas do tratamento.

### 1.1.1 - Microbiologia dos Sistemas de Distribuição de Água Potável

A água que circula nas redes de distribuição está longe de constituir um produto puro e estável. Na maior parte dos casos, a rede transporta uma água que respeita as normas de qualidade. No entanto, a densidade dos microrganismos presentes na rede pode aumentar com o tempo de residência ou/e a distância entre a estação e o utilizador (Maul *et al.*, 1989), diminuindo, assim, a qualidade da água fornecida.

Em sistemas de distribuição de água para consumo humano podem detectar-se uma grande variedade de microrganismos como bactérias, leveduras, fungos, algas, protozoários e macro - invertebrados que podem ser agrupados em populações autóctones ou endógenas e alóctones ou exógenas. As populações endógenas são de difícil erradicação por estarem bem adaptadas ao meio e representarem ecossistemas estáveis. Desenvolvem-se nas paredes das

condutas e dos reservatórios, formando biofilmes, que mais tarde podem ser introduzidos na água circulante por arrastamento ou erosão. Por seu turno, as populações exógenas podem ser transportadas pelo escoamento. Embora a maior parte destas populações não tenham a capacidade de se desenvolver dentro de um sistema de distribuição de água, são capazes de sobreviver por longos períodos e de se desenvolver mais tarde, logo que atinjam de novo um ambiente favorável (Alegre, 1994). No entanto, nem todos os microrganismos presentes na água para consumo humano são prejudiciais para a saúde pública. Na Tabela 1.1 resumem-se os principais agentes infecciosos da água para consumo (Geldreich, 1990; US EPA, 1998).

**Tabela 1.1** - Principais agentes infecciosos da água para consumo

<b>Bactérias</b>	<b>Vírus</b>	<b>Protozoários</b>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Adenovírus (31 tipos)	<i>Balantidium coli</i>
<i>Escherichia coli</i>	Enterovírus (71 tipos)	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella</i> (1700 spp.)	Hepatite A	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Shigella</i> (4 spp.)	Agente de Norwalk	<i>Cryptosporidium spp.</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	Reovírus	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Rotavírus	
<i>Helicobacter pylori</i>	Vírus coxsackie	

A pesquisa de microrganismos patogénicos para o Homem na água de consumo é um ponto importante quando se faz o controlo de qualidade microbiológica da água. Contudo, tais microrganismos, quando presentes, encontram-se em pequeno número pelo que as dificuldades técnicas da sua detecção e isolamento tornam esta análise impraticável como método de rotina. Por esta razão, recorre-se a uma abordagem indirecta, pesquisando-se grupos de microrganismos aceites como indicadores de contaminação, nomeadamente fecal, e que ocorrem em populações mais elevadas facilitando assim a sua detecção e quantificação (Cruickshank, 1985). Estes indicadores incluem grupos (não taxonómicos) de microrganismos que por si só não são geralmente perigosos mas que informam acerca de possíveis contactos da água com matérias de origem fecal.

### 1.1.2 - Causas de Contaminação da Água nos Sistemas de Distribuição

Em águas para consumo humano os grupos de microrganismos potencialmente patogénicos encontram-se presentes em pequenas quantidades. No entanto, podem surgir

variações súbitas dos seus valores, “os episódios”, que podem ter diversas causas (van der Wende e Characklis, 1990): *-atravessamento*, quando o aumento do número de bactérias na rede de distribuição, resulta de bactérias viáveis que conseguiram atravessar o processo de desinfecção e tratamento; *-crescimento*, o aumento do número de bactérias no sistema é devido à proliferação de bactérias a jusante do processo de desinfecção, que tanto pode ocorrer em biofilmes (crescimento nas superfícies) como na fase líquida; *-retro-contaminação*, aumento da quantidade de microrganismos por entrada destes pelos pontos de saída de água e posterior progressão em sentido contrário do movimento da água circulante.

Segundo estudos efectuados, a ocorrência de episódios de contaminação da água para consumo deve-se cada vez menos ao atravessamento ou a retro-contaminação ou qualquer outra fonte de contaminação externa, uma vez que os sistemas de tratamento e distribuição são cada vez mais eficientes. Assim, o crescimento microbiano, principalmente o crescimento sob a forma de biofilmes, assume um papel primordial nas alterações súbitas da qualidade da água nos sistemas de distribuição de água potável, resultante da erosão e do desprendimento de porções do biofilme para a água circulante, influenciando directamente a qualidade da água.

Assim, a monitorização dos biofilmes e o conhecimento e a compreensão dos factores que influenciam o seu desenvolvimento em sistemas de distribuição de água, apresenta-se como um passo fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento para obter água de qualidade em qualquer ponto do sistema de distribuição. Para melhor compreensão da forma como um biofilme pode afectar a qualidade da água e intervir no seu processo de contaminação é essencial conhecer o modo como vários factores influenciam a formação desta película biológica.

## 1.2 - Definição 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.

As células microbianas aderem firmemente a quase todas as superfícies imersas em solução aquosa. Estas células aderidas crescem, reproduzem-se e produzem substâncias



poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, assumindo o conjunto a designação de biofilme (Characklis e Coosey, 1983; Characklis e Wilderer, 1989). Os biofilmes não são necessariamente uniformes quer no tempo quer no espaço, podendo englobar partículas sólidas (argilas, areias, produtos de corrosão e partículas orgânicas) provenientes do meio aquoso onde estão imersos (Characklis e Marshall, 1990; Wimpenny *et al.*, 1993).

### 1.2.1 - Composição dos Biofilmes

Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas.

A água é a fracção mais significativa da massa total do biofilme, podendo variar entre 70 a 95% da massa total do biofilme (Flemming, 1993). Outros autores (Christensen e Characklis, 1990; Neu, 1994; Azeredo e Oliveira, 2000), referem que a razão massa de água/massa de biofilme pode ser até próximo de 99% ou mesmo atingir valores superiores.

Os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume do biofilme, geralmente menos de 10%, embora estes excretem as substâncias poliméricas que representam a fracção dominante da matéria orgânica seca do biofilme. Segundo Flemming (1993), as substâncias poliméricas representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme, enquanto que para Bakke *et al.* (1984) pode variar entre 50 e 90% do total da matéria orgânica dos biofilmes.

Os biofilmes possuem uma enorme diversidade de espécies microbianas, em que os microrganismos frequentemente encontrados são microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus (Characklis *et al.*, 1990), sendo, no entanto, devido à sua maior versatilidade e resistência, as bactérias os microrganismos predominantes. As bactérias devido às suas características como tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são de entre todos os microrganismos, consideradas como excelentes produtoras de biofilme (Characklis *et al.*, 1990).

A composição química das substâncias poliméricas extracelulares que constituem a matriz é muito complexa e heterogênea, sendo maioritariamente composta por polissacáridos (até 65%) (Horan e Eccles, 1986; Wimpenny *et al.*, 1993). No entanto, a matriz polimérica

pode também ser constituída por proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, substâncias húmicas e heteropolímeros, tais como glicoproteínas (Goodwin e Foster, 1985; Jahn e Nielsen, 1995; Frolund *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1996). 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).

Os biofilmes que se encontram em ambientes naturais são de um modo geral heterogéneos contendo mais do que um microambiente distinto. No mesmo biofilme podem ser encontrados estratos aeróbios e estratos anaeróbios (Characklis and Marshall, 1989; van der Wende e Characklis, 1990). Os primeiros situam-se nas zonas mais superficiais do biofilme e os segundos nas mais profundas, junto ao suporte sobre o qual o biofilme se desenvolve. Esta estratificação deve-se à dificuldade de difusão do oxigénio presente na água através do biofilme, conjugado com o facto do oxigénio disponível ser logo consumido pelos microrganismos que compõem as camadas mais superficiais.

A espessura dos biofilmes varia com as condições do meio, composição química e hidrodinâmica, podendo encontrar-se desde películas muito finas (5 a 10  $\mu\text{m}$ ) em sistemas de águas purificadas, até algumas bastante espessas (5 a 10 mm) como nos circuitos de “águas brancas” da indústria do papel e da pasta de papel.

Assim, o modo de desenvolvimento em biofilme proporciona, aos microrganismos que o constituem, importantes benefícios, tais como:

- 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 flutuações de pH, concentrações de sais, desidratação, forças de tensão de corte, substâncias químicas agressivas, 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 bem como a utilização de substratos de difícil degradação;
- capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos (Flemming, 1991; Mittelman, 1998).

Os biofilmes que se encontram na superfície das tubagens da rede de distribuição de água potável (fluido muito pobre em nutrientes) são pouco espessos, atingindo máximos de espessura de poucas centenas de micrómetros (van der Wende e Characklis, 1990) e por vezes não cobrem completamente a superfície. Estes podem albergar microrganismos patogénicos (Walker *et al.*, 1995), criar zonas anaeróbias, promover o aparecimento de zonas de biocorrosão, consumir o cloro residual (Kiéné *et al.*, 1998), produzir metabolitos que geram odor e sabor, diminuir a capacidade de transporte da água e ainda contaminar a água por desprendimento de porções de biofilme.

### 1.3 - Importância do Estudo dos Biofilmes

Os biofilmes desempenham um papel importante na natureza e em processos tecnológicos. Do ponto de vista do interesse do Homem podem ser benéficos ou prejudiciais, donde resulta a necessidade do seu estudo para poder desenvolver estratégias no sentido de melhorar as suas características, caso ele seja benéfico, ou para o eliminar ou inibir a sua formação, quando a sua acção é prejudicial.

Como exemplo de biofilmes benéficos temos aqueles que se acumulam em ambientes naturais nos depósitos dos rios, lagos ou ambientes marinhos, e que se desenvolvem em associação com as raízes de algumas plantas fornecendo-lhes alguns nutrientes. São também biofilmes benéficos aqueles que são utilizados em biotecnologia ambiental com grande sucesso no tratamento de efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas. Na indústria alimentar os biofilmes apresentam inúmeras vantagens, podendo ser utilizados na produção de alimentos fermentados, como por exemplo, a produção de vinagre.

Infelizmente, nem sempre as potencialidades 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 ambiente circundante. Nas ciências médicas, os biofilmes apresentam-se geralmente com um carácter nocivo uma vez que estão associados a um grande número de problemas de saúde, tais como infecções em tecidos, infecções do trato urinário, infecções e consequente rejeição de próteses e implantes e infecções da placa dentária, entre outras (Costerton *et al.*, 1981; Neu *et al.*, 1992; Wilcox, 1993).

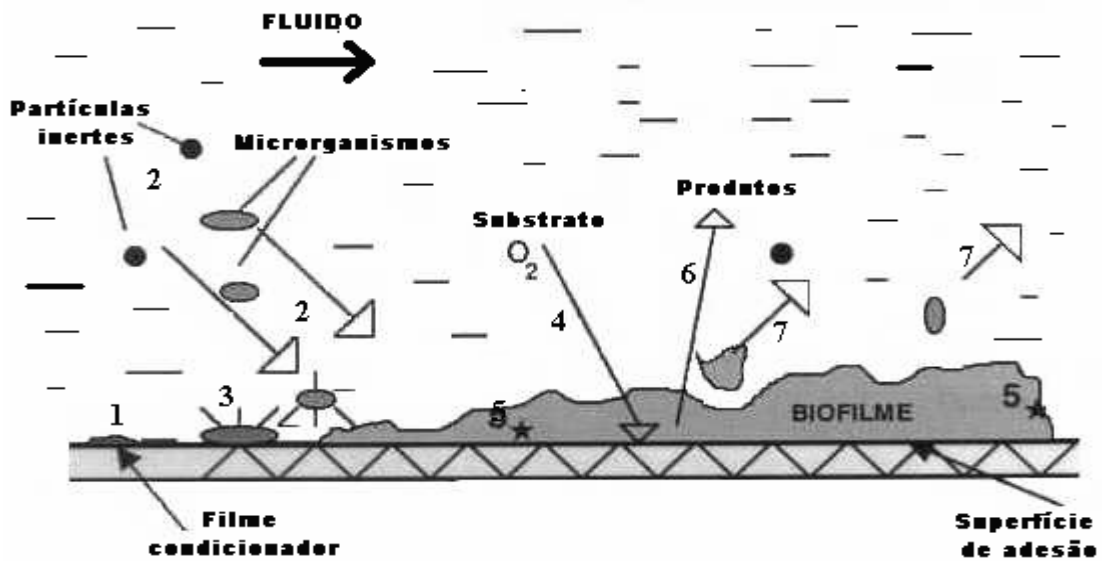
Na indústria, para além de originar problemas de higiene, a acumulação de biofilmes pode provocar perdas de eficiência em permutadores de calor, perda de carga nas tubagens e aceleração da deterioração dos materiais (Characklis e Cooksey, 1983; Matilla-Shandhom e Wirtanen, 1992).

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).

#### 1.4 - Formação de Biofilmes

Os principais processos envolvidos na formação de um biofilme sobre uma superfície sólida em contacto com um meio líquido são (Figura 1):

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

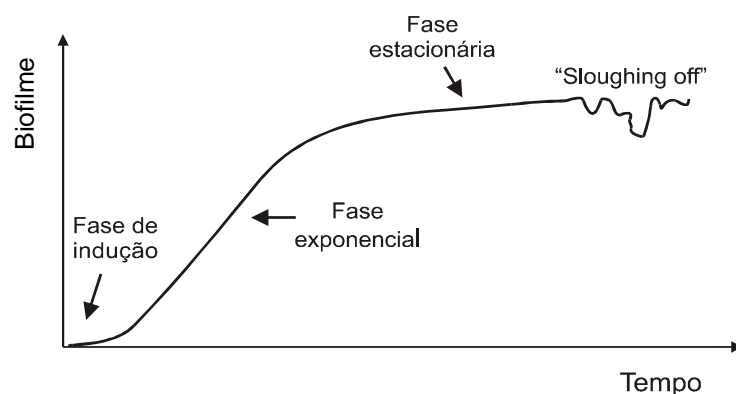


**Figura 1.1** - Principais processos envolvidos na formação de um biofilme (Pereira, 2001).

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

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

De acordo com Bott (1993), a acumulação de biofilme é um processo natural, que ocorre segundo um padrão sigmoidal (Figura 1.2), como resultado de um balanço entre vários processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem em simultâneo.



**Figura 1.2** - Acumulação de biofilme ao longo do tempo (Pereira, 2001).

As condições hidrodinâmicas do meio líquido circundante influenciam todos os processos que estão envolvidos no desenvolvimento do biofilme, 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 que intervêm no crescimento biológico do biofilme estão associados aos mecanismos de transferência de massa do meio líquido para a superfície do biofilme, que podem ocorrer por difusão molecular quando o fluido está estagnado ou escoar em regime laminar, ou difusão turbulenta e convecção forçada quando o escoamento se dá em regime turbulento, seguidos de transporte no interior do biofilme e reação biológica (Melo, 1994). Como a maioria dos processos de desenvolvimento de biofilme ocorre de forma consecutiva, o processo mais lento influencia e limita a velocidade do processo global, tornando-se o processo limitante (Characklis, 1990).

A formação do “filme condicionador” ocorre rapidamente, após o transporte e adsorção à superfície sólida de íons e moléculas orgânicas dissolvidas no meio aquoso. Segundo Mittelman (1998) este é estabelecido nos primeiros 5 a 10 s após uma superfície sólida limpa ser colocada no meio aquoso. A velocidade de formação do “filme condicionador” é dependente da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso e sua afinidade para o suporte sólido, das condições hidrodinâmicas do meio líquido (Chamberlain, 1992) e das características superficiais do suporte (carga superficial, energia livre de superfície, rugosidade) (Marshall e Blainey, 1990).

O “filme condicionador” pode alterar consideravelmente as características físico-químicas superficiais do suporte sólido, favorecendo ou, em alguns casos reduzindo, a adesão bacteriana aos suportes (Fletcher, 1992).

Após a formação do “filme condicionador”, etapa precursora de todo o processo de desenvolvimento de biofilme, ocorrem os mecanismos de transporte e adesão bacteriana que se encontram descritos no ponto 1.6 deste capítulo.

O desprendimento de porções de biofilme pode ocorrer segundo quatro processos distintos: erosão superficial, descolamento (“sloughing off”), abrasão e ataque por predadores (Bryers, 1987).

A erosão superficial consiste na remoção contínua de pequenos fragmentos da superfície do biofilme para a interface biofilme-líquido, como resultado essencialmente de alterações ambientais na fase aquosa, nomeadamente alterações de fluxo. Diz-se que ocorre desprendimento por descolamento de biofilme quando ocorre esporadicamente o

destacamento de grandes porções de biofilme devido a alterações de certas condições dentro do próprio biofilme. Este tipo de desprendimento é particularmente comum quando o líquido escoar em regime laminar, quando os valores da tensão de corte junto ao biofilme são relativamente baixos, quando ocorre produção interna de gás, alterações bruscas da concentração de nutrientes e devido à presença de desinfectantes.

A remoção de biofilme pode ainda ocorrer por abrasão devido ao contacto físico do biofilme com outras entidades, como por exemplo, colisão com partículas em suspensão (Gjaltema, 1996), e por ataque de predadores (“grazing”), uma vez que os protozoários se alimentam na superfície dos biofilmes bacterianos.

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 contem biofilmes (Rittman, 1989).

### **1.5 - Factores que Influenciam a Formação de Biofilme**

Segundo o revisto por vários autores, Characklis (1990), Bott (1993) e Vieira (1995), o desenvolvimento de um biofilme pode ser condicionado por diversos factores entre os quais se destacam: o pH, a temperatura, a força iónica do meio, a velocidade de escoamento, a concentração de nutrientes do meio líquido, as características dos microrganismos presentes no meio líquido, o tipo de material e a rugosidade da superfície sólida, a presença de material particulado, de micronutrientes e de agentes antimicrobianos. Alguns destes factores por serem objecto de estudo neste trabalho como o pH, a temperatura, a velocidade de escoamento, a concentração de nutrientes, o tipo de material da superfície sólida e o seu estado de conservação e a presença de agentes antimicrobianos (cloro), serão a seguir descritos de uma forma mais pormenorizada. As características dos microrganismos e dos materiais onde ocorre a formação de biofilme, nomeadamente as suas propriedades superficiais (tensão superficial e hidrofobicidade), também estudadas neste trabalho, são analisadas no ponto 1.9 deste capítulo.

### 1.5.1 - pH

Os microrganismos têm limites de sobrevivência e valores de pH óptimos de crescimento. De acordo com os valores de pH do meio, estes podem ser classificados em três grandes grupos: acidófilos, neutrófilos e basófilos (Stanier *et al.*, 1995).

A maioria dos biofilmes naturais forma-se a valores de pH próximos da neutralidade. Desvios para valores superiores ou inferiores de pH 7 irão afectar o desenvolvimento e actividade do biofilme (Bott, 1995), já que o pH tem um efeito preponderante no metabolismo microbiano. Por outro lado, o pH também afecta as propriedades 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.

Quando se estudam os biofilmes de sistemas de distribuição de água potável deve ser considerado que a turbulência do fluido pode conduzir a uma redução dos valores de pH devido ao CO<sub>2</sub> se misturar com a água e formar HCO<sub>3</sub>. Adicionalmente, o abaixamento dos valores de pH também pode ocorrer, devido à libertação para o meio de substâncias acídicas produzidas pelos microrganismos que se desenvolvem nas paredes (Characklis e Marshall, 1989; Caldwell *et al.*, 1992; Buckman, 1997). Esta redução é mais notória junto da superfície das tubagens, nos biofilmes, onde se criam microambientes resguardados da corrente da água (van der Wende, 1990).

### 1.5.2 - Temperatura

A temperatura é outro factor determinante no desenvolvimento microbiano, e como tal, pode afectar a formação e a actividade de qualquer biofilme, bem como o tipo de microrganismos que o compõem. Assim, quando se pretende estudar a formação de biofilme em sistemas de distribuição de água potável, o conhecimento do impacte que a temperatura pode ter no desenvolvimento bacteriano reveste-se de grande importância para a compreensão da composição e evolução dos biofilmes de uma dada região, principalmente a nível do desenvolvimento de microrganismos patogénicos.

Para valores elevados da temperatura ocorre a desnaturação das proteínas que compõe os microrganismos, o que se manifesta por uma redução abrupta da taxa de crescimento. O valor da temperatura a partir do qual esses efeitos destrutivos são preponderantes designa-se



por limite máximo de temperatura. A temperatura para a qual se regista um valor máximo da taxa de crescimento, designa-se por temperatura óptima. Por outro lado, com a redução da temperatura ocorre uma diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos até um dado valor em que o crescimento cessa, correspondendo este valor da temperatura ao limite mínimo de temperatura. Cada microrganismo tem valores precisos para os limites mínimo e máximo e temperatura óptima. No caso das bactérias esses valores e os valores dos intervalos nos quais o crescimento é possível variam bastante (Stanier *et al.*, 1995).

Assim, em países do norte da Europa, Canadá e em alguns estados dos EUA, as temperaturas médias da água que circula nas tubagens dificilmente ultrapassam os 15°C. Em países do sul da Europa, como por exemplo Portugal, os valores da temperatura da água que circula nas tubagens é por longos períodos do ano superior a 20°C, o que poderá favorecer um maior desenvolvimento de bactérias como por exemplo a *E. coli* e outras bactérias que podem representar um risco para a saúde pública.

### 1.5.3 - Velocidade de Escoamento/Regime de Escoamento

Os efeitos da velocidade de escoamento, ou os efeitos de turbulência no seio do líquido avaliados pelo tipo de regime de escoamento da água (dado pelo número de Reynolds), têm um papel bastante significativo no desenvolvimento e estabilidade dos biofilmes (Bott, 1993). A velocidade de escoamento da água em contacto com as superfícies sólidas interfere com os processos de adesão bacteriana, transporte de nutrientes e de desprendimento dos biofilmes e, conseqüentemente, com o desenvolvimento do biofilme.

A velocidade de escoamento do fluido tem influência sobre a taxa de transferência de massa do seio do líquido para o biofilme bem como sobre a taxa de desprendimento de porções de biofilme (Characklis, 1990). Quando a velocidade do fluido é baixa, a resistência à transferência de massa (nutrientes, oxigénio, etc.) do meio líquido para os microrganismos embebidos no biofilme é mais elevada, sendo deste modo o crescimento do biofilme prejudicado. Quando a velocidade do fluido é elevada (elevados números de Reynolds), obtém-se, conseqüentemente, uma elevada turbulência no seio do líquido. Isto traduz-se essencialmente em dois aspectos de carácter oposto: por um lado, provoca um aumento da transferência de massa no seio do líquido para o biofilme o que poderá originar um aumento da taxa de desenvolvimento de biofilme; por outro lado, com o aumento da 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. No entanto, a redução em biomassa origina biofilmes menos espessos, o que poderá beneficiar o transporte de nutrientes no interior do biofilme (Pereira, 2001).

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

Percival *et al.* (1998), em estudos efectuados sobre a formação de biofilme utilizando água potável, verificaram que para velocidades de escoamento da água elevadas (1,75 m/s) o crescimento do biofilme é maior do que o observado para velocidades de 0,32 e 0,96 m/s. Contudo, para elevadas velocidades de escoamento este efeito desaparece com o decurso do tempo, o que se deve, provavelmente, às elevadas forças de tensão de corte sentidas na superfície, provocando o desprendimento de biofilme, o que pode conduzir a um acréscimo na quantidade de células no seio do líquido. Estes autores também constataram que o aumento da velocidade promoveu o aparecimento de cadeias de exopolímeros e também a presença de bactérias filamentosas na superfície.

A variação da velocidade pode também influenciar no modo de colonização das superfícies. A baixas velocidades as células isoladas aderem à superfície e originam colónias. A elevadas velocidades ocorre uma adesão de grandes grupos de células e só muito poucas de forma isolada (Antunes, 1999).

#### 1.5.4 - Concentração de Nutrientes

A relativa facilidade com que os biofilmes se desenvolvem deve-se em parte à grande variedade das espécies de microrganismos que os compõe requererem quantidades mínimas de nutrientes para que ocorra o seu crescimento. Quanto maior for a quantidade de nutrientes disponíveis sob a forma de carbono orgânico facilmente assimilável, maior será o crescimento microbiano e maior será a diversidade de organismos que podem ser mantidos (Buckman, 1997).

Relativamente aos biofilmes das tubagens da rede de abastecimento de água potável, uma das possíveis fontes de carbono orgânico facilmente assimilável é o que é transportado em suspensão pela própria água desde a zona de captação. O teor em carbono orgânico em suspensão na água depende da estação do ano a qual influencia os caudais dos cursos de água,

e conseqüentemente, o maior ou menor arrastamento de matérias orgânicas das margens e em especial de campos. Outra das fontes de carbono orgânico podem ser os biofilmes que se desenvolvem ao longo do sistema de distribuição de água: ocorre o desprendimento de partes deste para a água corrente, como consequência da actuação de desinfectantes e das forças de tensão de corte.

O ferro é também um dos nutrientes necessários para o desenvolvimento celular bacteriano, apresentando-se mesmo como um nutriente limitante para o crescimento. As tubagens de ferro que ainda compõe uma boa parte das redes de distribuição e abastecimento de água potável oferecem um substrato de ferro que é uma fonte nutritiva para as bactérias e funcionam como ambientes óptimos para o desenvolvimento de certos microrganismos.

### **1.5.5 - Tipo de Material da Superfície e o Seu Estado de Conservação**

A superfície inerte onde se formam os biofilmes desempenha um papel importante na forma e desenvolvimento do biofilme. O estado de conservação da superfície pode, muitas vezes, ser um factor determinante na formação do biofilme. A revisão de inúmeros casos sugere que os biofilmes são um problema comum em tubagens que estão em serviço nas redes de distribuição de água potável há mais de 10 anos. Os depósitos porosos e irregulares (tubérculos) que se encontram frequentemente à superfície das tubagens antigas, são zonas preferenciais para o crescimento bacteriano.

Portanto, em tubagens que apresentam longas vidas de utilização regista-se uma maior deterioração da qualidade da água, tanto em termos microbiológicos como em termos das propriedades químicas devido ao processo de corrosão e produção de metabolitos resultantes do desenvolvimento microbiano. Deste modo, a vida de um tubo está intimamente relacionada com a qualidade da água que circula dentro deste.

O tipo de material da superfície é outro factor que também pode influenciar o desenvolvimento de biofilme. Tubagens de natureza ferrosa são habitats propícios para o desenvolvimento microbiano, uma vez que o ferro é um nutriente necessário para o desenvolvimento de certas espécies bacterianas, como já foi referido anteriormente.

Walker *et al.* (1995), analisaram o desenvolvimento de biofilme sobre vidro e aço macio betumado (material indicado para as condutas de água) e constataram, pelos resultados obtidos que, em ambos os materiais, o crescimento do biofilme apresenta valores semelhantes em termos de microrganismos.

Por outro lado, estudos efectuados por Camper *et al.* (1996) mostraram que superfícies reactivas, como a do aço, permitem um desenvolvimento microbiano bastante superior (10 vezes superior) ao de superfícies inertes, como o policarbonato.



**Figura 1.3** - Segmentos de tubagens da rede de distribuição de água potável com visível deterioração.

#### 1.5.6 - Concentração de Agentes Anti-Microbianos (Concentração de Cloro)

O cloro é uma substância oxidante vulgarmente utilizada no processo de desinfecção da água para abastecimento público, sendo responsável por danificar ou mesmo destruir os microrganismos presentes evitando a sua proliferação ao longo das redes de distribuição.

Nos processos de desinfecção de água para consumo humano o cloro pode ser adicionado à água na forma de hipoclorito ou na forma de cloroaminas. O cloro livre tem um efeito mais eficaz a curto prazo. No entanto, as cloroaminas são menos reactivas mas mais persistentes, mantendo-se em quantidades elevadas por todo o sistema de distribuição e penetrando de forma mais eficaz no biofilme. Por conseguinte, as cloroaminas danificam mais os microrganismos presentes do que o cloro na forma livre (Connell, 1996), mas estes compostos de cloro têm o inconveniente de serem mais propícios para formar subprodutos cancerígenos do que o cloro livre. Os subprodutos resultantes da combinação do desinfectante com a matéria orgânica são os trihalometanos (THM's).

De um modo geral, a concentração de cloro que é necessária para erradicar a maior parte dos microrganismos presentes na água ronda os 0,3 mg/L de cloro residual. Porém, mesmo com a adição de grandes quantidades (4,3 mg/L) de cloro livre, verifica-se que alguns coliformes conseguem subsistir (LeChevallier *et al.*, 1984). Isto pode dever-se a diversos motivos: por um lado o cloro adicionado à água pode não chegar em quantidades suficientes a todos os pontos da rede de distribuição, em zonas terminais do sistema de distribuição e muito afastadas da estação de tratamento ou de pontos de pós-cloração, registam-se concentrações

de cloro baixas ou praticamente nulas que permitem o desenvolvimento bacteriano; à elevada carência em cloro da água, resultante da sua reacção com a matéria orgânica e ou produtos de corrosão; e à menor susceptibilidade das bactérias presentes nos biofilmes das paredes das canalizações ao cloro, devido à dificuldade de difusão deste nas matrizes poliméricas que as protegem, comparado com as existentes na forma planctónica.

A carência em cloro da água corresponde à quantidade de cloro que reage inicialmente com agentes redutores e outros compostos presentes no meio, e que, num caso limite, pode resultar numa quantidade nula de cloro residual na água para a inactivação microbiana, sendo o seu valor variável e dependente de vários factores (Connell, 1996). Assim quanto maior for a quantidade de matéria orgânica em suspensão na água, maior será a carência em cloro da água.

## 1.6 - Reactores de Biofilme

Os reactores de biofilme são reactores biológicos em que a biomassa, ou seja, o conjunto formado pelas células microbianas constituídas em biofilme juntamente com as substâncias poliméricas por elas excretadas, se encontra fixada a suportes sólidos e não suspensa no meio líquido.

Este tipo de reactores apresenta-se de um modo geral, como bastante vantajoso uma vez que se consegue obter altas concentrações de biomassa mesmo trabalhando a elevadas taxas de diluição (Gjaltema, 1996). Este factor é especialmente significativo quando a capacidade dos reactores para manter uma elevada concentração de microrganismos em suspensão é limitada, superando-se com esta propriedade a restrição segundo a qual a taxa de diluição não pode ultrapassar a taxa específica de crescimento dos microrganismos para não ocorrer lavagem de biomassa do sistema (Bailey e Ollis, 1986). Pelo facto da biomassa estar fixa, este tipo de reactores pressupõe 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 (choque orgânico, choque hidráulico, choque térmico, presença de substâncias tóxicas, etc.) (Bryers e Characklis, 1990).

Assim os reactores de biofilme, constituem uma alternativa bastante promissora aos tradicionais processos que operam com microrganismos em suspensão. Este tipo de reactores são especialmente usados e com bastante frequência nos sistemas de tratamento de águas

residuais, sendo os sistemas de discos biológicos rotativos e os leitos percoladores exemplos clássicos de reactores de biofilme utilizados no tratamento de efluentes.

### 1.6.1 - Reactores para a Monitorização de Biofilmes

Os reactores utilizados para a monitorização de biofilmes 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 projectados e desenvolvidos reactores que minimizam as heterogeneidades e tornam a monitorização dos biofilmes mais fácil e eficiente.

Os bio-reactores laboratoriais usados para a monitorização de biofilme podem ser divididos em dois grupos distintos: os reactores à escala laboratorial com geometria industrial, sendo estes pequenas réplicas dos reactores industriais onde são simulados os processos biotecnológicos de larga escala; e as secções de teste específicos. Este segundo grupo engloba todos os dispositivos desenvolvidos experimentalmente para o estudo da formação de biofilmes em ambiente bem controlado e reproduzível. Estes dispositivos de teste permitem obter de forma mais expedita informações acerca do crescimento, estrutura e actividade de biofilmes, bem como a cinética de consumo de substrato. Estas informações seriam mais morosas e difíceis de obter em reactores de geometria semelhante à industrial ou com biofilmes formados em habitats naturais.

As secções de teste específicas apresentam uma grande variedade de geometrias, mas todas elas devem apresentar as seguintes características:

- Possibilidade de utilização de qualquer tipo de material como superfície sólida de adesão, uma vez que se sabe que os microrganismos podem colonizar qualquer tipo de material e que as propriedades de um biofilme são determinadas, de certa forma, pelo tipo de material onde este se forma;
- Facilidade de remoção, em condições de assepsia, de amostras de biofilme representativas e reproduzíveis, permitindo a amostragem do biofilme associado à superfície de adesão onde está aderido, minimizando desta forma 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, etc.), físicos (temperatura, tempo de

retenção hidráulico, regime de fluxo) e biológicos (tipo e concentração de microrganismos) (Bryers e Characklis, 1992);

- Fácil esterilização e manipulação em condições de assepsia, caso seja necessário;
- 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 acesso 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.

Os principais exemplos de geometrias de secção de teste laboratoriais com superfícies removíveis são os 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) e o Reactor de Células de Fluxo (Pereira *et al.*, 2002b). No entanto, podem ser referidas outras geometrias, ainda que a amostragem de biofilme não envolva a remoção de parte da superfície sólida, tais como: quimiostatos, reactores tubulares e reactores de membrana.

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.

#### 1.6.1.1 - Células de Fluxo

O desenvolvimento das Células de Fluxo, particularmente as de secção circular, é atribuído, em grande parte, à sua clara similaridade geométrica com uma grande variedade de sistemas quer industriais (condutas de abastecimento de água, tubos de permutadores de calor)

quer médicos (catéteres, enxertos cardiovasculares, etc.) onde é frequente a ocorrência de biofilmes.

Os sistemas de células de fluxo podem ser descritos de uma forma resumida como segmentos de condutas com incorporação de superfícies sólidas removíveis na parede interna para a amostragem do biofilme ao longo do tempo (Bryers e Characklis, 1992). Este tipo de reactores utilizados para a monitorização de biofilme apresentam muitas vantagens práticas que incluem a 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 mais de vinte anos (McCoy *et al.*, 1981) e por isso baptizado de dispositivo de Robbins. Este 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. A sua especificidade constituiu uma limitação para a sua aplicação directa em outras áreas. Para ultrapassar estas limitações, algumas modificações foram desenvolvidas (Lappin-Scott *et al.*, 1993) e surgiu o Dispositivo de Robbins Modificado que teve uma aplicação proveitosa no estudo de biofilmes em áreas mais diversas como a área médica (Nickel *et al.*, 1985; Evans 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 as células de fluxo com placas, apontando inúmeras vantagens deste tipo de dispositivos para a avaliação da adesão celular e da quantificação da cinética de formação de biofilme de quatro estirpes diferentes de *E. 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.

Pereira *et al.* (2002b) desenvolveram e propuseram um simples reactor de células de fluxo que opera em posição vertical com recirculação em contínuo. Este permite a monitorização da formação de biofilme em condições ambientais controladas, testando



diferentes condições hidrodinâmicas, pela remoção periódica das superfícies de adesão sem que haja paragem do escoamento, diminuindo, assim, a possibilidade de contaminação e perturbação da estrutura do biofilme. Este tipo de reactor é altamente versátil permitindo uma grande variedade de análises não destrutivas e destrutivas do biofilme, tendo sido usado para o estudo da formação de biofilme em condições laboratoriais e industriais.

### 1.6.1.2 - Reactores Anulares Rotativos

O Roto Torque consiste em dois cilindros concêntricos, um exterior estacionário e um interior rotativo; constituindo as secções de amostragem removíveis 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, é de fácil operação e compacto pois, num espaço limitado, oferece uma elevada área superficial para a formação de biofilme. A principal desvantagem é que, contrariamente ao que seria suposto, o Roto Torque não garante tensões de corte uniformes em toda a superfície disponível para a formação de biofilme (Gjaltema, 1996). Este facto torna este tipo de reactor inadequado para estudos quantitativos, quer fisiológicos quer cinéticos, uma vez que não é possível obter-se amostras representativas de biofilmes.

Uma das vantagens do 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).

## 1.7 - Mecanismo de Adesão Bacteriana e Colonização de Superfícies

A formação de qualquer biofilme é sempre precedida pela adesão inicial de células a superfícies, sendo esta, de acordo com Busscher *et al.* (1995), determinante na sua formação. Por outro lado, a síntese de exopolímeros pelas bactérias também contribui de forma significativa para a formação de biofilme (Vandevivere e Kirchman, 1993). Assim, o conhecimento da forma como os microrganismos aderem e dos factores que condicionam este fenómeno reveste-se de grande importância no estudo dos biofilmes.

A adesão de microrganismos a superfícies é um fenómeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e que depende das propriedades superficiais dos suportes de adesão e dos

microrganismos envolvidos na adesão (carga superficial e hidrofobicidade), das propriedades microbiológicas dos microrganismos (exopolímeros ou estruturas extracelulares) e das propriedades do meio aquoso (presença de substâncias que podem condicionar as superfícies, pH, temperatura, velocidade de escoamento, tempo de exposição, concentração de microrganismos, tensão superficial e força iónica do meio), tendo isto já sido vastamente comprovado por vários autores (Duddriege *et al.*, 1982; Absolom *et al.*, 1983; Chamberlain e Johal, 1988; Neu e Marshall, 1990; Carballo *et al.*, 1992; Hood e Zottola, 1995).

Para além das propriedades superficiais das superfícies sólidas acima referidas, existem outros factores inerentes à morfologia das superfícies que podem ser determinantes na adesão, tais como a sua composição, rugosidade e porosidade (Pereira *et al.*, 2000).

A influência da rugosidade da superfície na adesão tem sido objecto de estudo de muitos trabalhos que a consideram como um factor determinante na adesão (Quirynen *et al.*, 1994; Verran e Taylor, 1995), tal como é considerada por vários autores a hidrofobicidade (Fletcher e Loeb, 1979; Jones *et al.*, 1996) e a carga superficial (van Looschecht *et al.*, 1989; Harkes *et al.*, 1992;). O aumento da rugosidade da superfície tem sido associada com o aumento da retenção microbiana em, por exemplo, plásticos tais como polimetilmetacrilato (Taylor *et al.*, 1998) e cloreto de polivinilo (PVC) (Foschino *et al.*, 1998), superfícies metálicas como o aço inoxidável (Pederson, 1990) e também superfícies dentárias (Quirynen *et al.*, 1990; Yamauchi *et al.*, 1990). O aumento dos níveis de adesão associados à rugosidade da superfície, atribuem-se à protecção das células no interior das irregularidades da superfície das forças de tensão de corte, permitindo que a adesão irreversível seja estabelecida mais facilmente, sendo por isso locais preferenciais para a colonização inicial. Além disso, as irregularidades da superfície contribuem para um aumento da área superficial disponível para a adesão (Quirynen *et al.*, 1994; Quirynen e Bollen, 1995; Verran e Maryan, 1997).

A porosidade da superfície sólida também contribui para o aumento da adesão devido à maior área superficial disponível (Pereira *et al.*, 2000).

### 1.7.1 - Processo de Adesão

A colonização de uma superfície sólida por microrganismos pode processar-se em quatro etapas: transporte até à superfície, adesão inicial, fixação à superfície e colonização.

O transporte dos microrganismos até à superfície pode fazer-se por difusão devido aos movimentos Brownianos em fluidos em repouso, ou por convecção num fluido em

movimento. Segundo Characklis (1981) a velocidade do transporte convectivo é muito maior do que a do transporte por difusão. A aproximação do microrganismo à superfície pode ainda ocorrer por movimento activo dos mesmos quando possuem apêndices extracelulares que lhes conferem mobilidade.

A adesão inicial do microrganismo à superfície ocorre na vizinhança desta (50 nm), na qual os microrganismos e a superfície podem interactuar por forças de curto e longo alcance que conduzem à adesão. A adesão pode ser reversível ou irreversível. A primeira refere-se a uma interacção inicial fraca entre o microrganismo e a superfície, de tal modo que este após estar fixo à superfície continua a exhibir movimentos Brownianos podendo ser removido por acção de forças de corte, ou pelo seu movimento activo. Este tipo de adesão envolve forças de longo alcance entre o microrganismo e a superfície: forças de van der Waals e forças electrostáticas. Na adesão irreversível o microrganismo liga-se permanentemente à superfície e deixa de poder ser facilmente removido desta deixando de exhibir movimentos Brownianos (Characklis, 1981).

Assim, após ocorrer a adesão inicial pode estabelecer-se uma ancoragem firme entre a célula microbiana e a superfície (fixação à superfície), por meio de ligações físico-químicas específicas (covalentes, iónicas e pontes de hidrogénio) ou através de pontes estabelecidas por estruturas extracelulares específicas produzidas pelos microrganismos (apêndices celulares filamentosos ou polímeros extracelulares). Após as células estarem firmemente aderidas, dá-se a colonização da superfície, as células começam a crescer e as novas células formadas crescem sobre as inicialmente aderidas, formando-se assim, microcolónias que se desenvolvem dando origem a um biofilme (Brex *et al.*, 1983).

No processo de adesão, as interacções entre os microrganismos e as superfícies são efectuadas por um conjunto de fenómenos físico-químicos, termodinâmicos e microbiológicos. Existem algumas teorias que permitem quantificar as energias envolvidas nas interacções entre superfícies. Contudo, apenas consideram os aspectos físico-químicos e termodinâmicos da adesão, omitindo o facto dos microrganismos serem entidades vivas.

## 1.8 - Teorias Explicativas da Adesão entre Microrganismos e Superfícies Sólidas

### 1.8.1. - Teoria DLVO

A adesão de microrganismos a superfícies pode ser interpretada de acordo com a teoria DLVO, desenvolvida por Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948), para explicar a estabilidade de colóides liofóbicos. Uma vez que a maioria das bactérias não excede os 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, a sua densidade é pouco superior à da água e possuem carga global negativa, podem ser consideradas neste caso como partículas coloidais vivas (Marshall, 1976).

Segundo a teoria DLVO, que considera apenas as forças de longo alcance, a energia potencial total de interacção entre dois corpos ( $V_T$ ) é resultante da acção combinada entre as forças atractivas de van der Waals ( $V_W$ ) e as forças da dupla camada eléctrica ( $V_{DL}$ ) que geralmente são repulsivas, uma vez que a maioria das superfícies quando em solução adquire carga superficial negativa.

As forças de van der Waals podem ser de três tipos: - dispersão de London ou dipolo induzido – dipolo induzido; - interacções de Debye ou dipolo induzido – dipolo permanente; interacções de Keesom ou dipolo permanente – dipolo permanente. A intensidade das forças de van der Waals é directamente proporcional ao tamanho dos corpos interactuantes e varia na razão inversa da distância à superfície.

A maior parte dos sólidos quando imersos numa solução aquosa adquirem cargas eléctricas à superfície por acção de diversos mecanismos (Hunter, 1988). No caso dos sistemas biológicos, a carga superficial adquire-se por adsorção de iões ou por ionização dos grupos superficiais. Este fenómeno é geralmente dependente das propriedades da solução aquosa, nomeadamente o seu pH. A superfície de um sólido carregada electricamente, juntamente com os iões existentes no líquido em contacto com o sólido formam uma camada difusa chamada dupla camada eléctrica, resultante do mecanismo de atracção e repulsão de iões e do efeito oposto dos movimentos Brownianos. O potencial electrostático, estabelecido entre a superfície e o líquido, resultante da diferente concentração de cargas no interior da dupla camada eléctrica tem a designação de potencial da dupla camada eléctrica e o seu valor diminui através da camada difusa desde o valor do potencial da superfície até atingir o valor

nulo no seio da solução aquosa. Este é, em geral, representado pelo potencial Zeta ou potencial electrocinético e está directamente relacionado com a carga da superfície.

A contribuição das interacções consideradas pela teoria DLVO resulta num perfil de energia potencial que é muito dependente da força iónica do meio. Assim, se a força iónica do meio é baixa, o perfil de energia potencial de interacção entre os dois corpos de sinal igual apresenta um máximo de energia, que representa uma barreira para a aproximação dos corpos, e um mínimo de energia, designado mínimo primário, que se localiza a uma distância inferior a 2 nm da superfície. Quando se aumenta a força iónica do meio, a barreira de energia diminui, devido à diminuição da energia da dupla camada eléctrica. Assim, para valores intermédios da força iónica do meio, o máximo de energia diminui e cria-se um mínimo secundário. Este, quando os microrganismos interactuantes são bactérias, situa-se a 5-20 nm da superfície e pode ser tanto mais profundo quanto maiores forem as forças atractivas de van der Waals. Uma vez ultrapassado o máximo de energia e atingido o mínimo primário, a ligação entre os dois corpos interactuantes torna-se irreversível. Para valores elevados da força iónica do meio, a energia potencial de interacção é sempre negativa e neste caso todas as partículas podem atingir o mínimo primário. A existência de dois mínimos de energia permite distinguir entre a adesão reversível (quando ocorre no mínimo secundário) e irreversível (quando ocorre no mínimo primário).

Como já foi anteriormente referido, a teoria DLVO explica a adesão de microrganismos com base na interacção entre partículas coloidais e despreza todos os aspectos microbiológicos da adesão. Além disso, as forças de interacção contabilizadas por esta teoria são apenas as forças de longo alcance (forças de van der Waals e forças resultantes da dupla camada eléctrica), pelo que esta teoria só permite prever se os microrganismos se aproximam a uma certa distância da superfície. A teoria DLVO só prevê se a adesão ocorre no mínimo primário, mas não permite quantificar a energia potencial dessa interacção. Quando uma partícula atinge o mínimo primário, um conjunto de forças de curto alcance passa a dominar a interacção e a determinar as forças de adesão.

#### **1.8.1.1 - Forças de Curto Alcance**

As forças de curto alcance também designadas forças não DLVO (Elimelech, 1995) englobam as forças de repulsão de Born, as forças de hidratação, as interacções hidrofóbicas, as interacções estéricas e as pontes poliméricas. Estas forças permitem justificar os desvios da teoria DLVO, contudo este tipo de interacções não são facilmente quantificáveis com a excepção das interacções hidrofóbicas (Elimelech, 1995). A hidrofobicidade tem sido

considerada a força de curto alcance mais importante na adesão bacteriana (Busscher *et al.*, 1990; van Oss, 1997).

#### 1.8.1.1.1 - Interações Hidrofóbicas / Hidrofobicidade

As forças de interação hidrofóbicas apesar de serem de curto alcance, podem em determinados casos, ocorrer até 80 nm da superfície e apresentar energias potenciais de interação duas vezes superiores às interações de van der Waals (Pashley e Israelachvili, 1984).

Segundo o demonstrado por vários autores, a hidrofobicidade pode originar forças de interação particularmente importantes na adesão de microrganismos em ambientes aquáticos, assumindo em determinados casos uma maior importância do que as interações electrostáticas (Fletcher e Loeb, 1979; van Looschecht, 1988; Nikawa *et al.*, 1989; Stenstrom, 1989; Sousa *et al.*, 1997; Azeredo e Oliveira, 1999; Teixeira e Oliveira, 1999;). Também foi demonstrado que a hidrofobicidade desempenha um papel muito importante na fase inicial da colonização por microrganismos patogénicos, responsáveis por muitas doenças no Homem (Doyle e Rosenberg, 1990).

Muitos foram os estudos em que se verificou uma relação directa entre a hidrofobicidade das células e a sua capacidade de adesão a suportes sólidos (Fletcher e Loeb, 1979; McEldowney e Fletcher, 1986; Miyake *et al.*, 1986; Stenstrom, 1989; Erner e Douglas, 1992; Sousa *et al.*, 1997; Panagoda *et al.*, 1998).

A importância do carácter hidrofóbico da superfície das células na adesão foi explicada por Busscher *et al.* (1990) e van Looschecht *et al.* (1990) que defendem, que para se estabelecer uma adesão efectiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interactuantes contribui para a facilidade dessa remoção.

Durante muito tempo, a hidrofobicidade de uma superfície foi considerada como um parâmetro qualitativo. Segundo Adamson (1982), uma superfície é considerada hidrofóbica quando não consegue ser molhada pela água, podendo o seu carácter hidrofóbico ser avaliado pelo ângulo de contacto que uma gota de água forma sobre a superfície. Assim, para ângulos de contacto superiores a 50° a superfície é considerada hidrofóbica, enquanto para ângulos inferiores a 50° a superfície será hidrofílica.

van Oss e Giese (1995) definiram um critério quantitativo que permite avaliar a hidrofobicidade da superfície de minerais a partir da energia de coesão entre moléculas da superfície imersas em água (1.10.2.1).

### 1.8.2 - Teoria Termodinâmica da Adesão

A adesão de um microrganismo (bactéria) a uma superfície sólida em solução aquosa só se estabelece se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido (bl) e a interface superfície de adesão/líquido (sl) terá que ser substituída pela interface bactéria/superfície de adesão (bs). Segundo a teoria termodinâmica, a energia livre permutada neste fenómeno tende a ser minimizada e a adesão só se verifica se o processo conduzir a uma diminuição da energia livre global.

A energia livre,  $\Delta G_{\text{adesão}}$ , permutada na substituição das interfaces é definida pela equação modificada de Dupré (Absolom *et al.*, 1983):

$$\Delta G_{\text{adesão}} = \gamma_{\text{bs}} - \gamma_{\text{bl}} - \gamma_{\text{sl}} \quad (1.1)$$

em que  $\gamma_{\text{bs}}$  corresponde à tensão interfacial bactéria/superfície de adesão,  $\gamma_{\text{bl}}$  corresponde à tensão interfacial bactéria/líquido e  $\gamma_{\text{sl}}$  corresponde à tensão interfacial superfície de adesão/líquido.

A tensão interfacial pode ser determinada recorrendo a vários métodos analíticos, sendo a medição de ângulos de contacto a técnica mais vulgarmente utilizada (1.10.1.1).

A teoria termodinâmica permite quantificar a energia envolvida na adesão e prever de forma quantitativa a possibilidade de se estabelecer uma interface superfície de adesão/microrganismo. Contudo, nesta teoria as interacções electrostáticas não são contabilizadas e são muito importantes em sistemas aquáticos, pelo que esta teoria só pode ser aplicada se a barreira de energia que separa as duas superfícies for ultrapassada. Para além das interacções electrostáticas também não são consideradas nesta teoria as interacções específicas mediadas por exopolímeros ou apêndices extracelulares, ou seja, não tem em conta os aspectos microbiológicos da adesão.

As teorias até agora apresentadas apenas permitem interpretar parcialmente os fenómenos de adesão. Contudo foi recentemente publicada uma sùmula de uma extensão à teoria DLVO para explicar a interacção entre partículas (van Oss, 1994), que integra os aspectos termodinâmicos da adesão com a teoria DLVO, que se designa por teoria XDLVO.

### 1.8.3 - Teoria XDLVO

Segundo esta teoria quando duas partículas imersas numa solução aquosa se aproximam, estabelecem-se entre as duas superfícies as seguintes forças de interacção: interacções electrodinâmicas ou apolares ou de Lifshitz-van der Waals (interacções LW); interacções polares ou ácido-base de Lewis (interacções AB); interacções electrostáticas resultantes da sobreposição das duplas camadas eléctricas (interacções DL) e as interacções resultantes dos movimentos Brownianos (interacções BR). A energia livre total destas interacções resulta do somatório das energias livres de cada uma das forças de interacção, segundo a seguinte equação:

$$\Delta G^{\text{TOT}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} + \Delta G^{\text{DL}} + \Delta G^{\text{BR}} \quad (1.2)$$

#### 1.8.3.1 - Interacções de Lifshitz-van der Waals

As forças de interacção de Lifshitz-van der Waals são também consideradas forças de interacção apolares porque se estabelecem entre as moléculas apolares da superfície das partículas. A energia livre resultante das interacções apolares está directamente relacionada com a tensão superficial. Segundo Good (1967), a tensão superficial de líquidos ou sólidos,  $\gamma_i$ , é definida como sendo metade da energia livre,  $\Delta G_{ii}$  permutada na coesão de um material no vácuo, ou seja,

$$\gamma_i = -\frac{1}{2} \times \Delta G_{ii} \quad (1.3)$$

A energia livre de coesão é obtida através da determinação experimental da tensão superficial utilizando a técnica de medição de ângulos de contacto.

A tensão interfacial apolar entre duas substâncias apolares (1 e 2) é dada pela equação combinada de Good-Girifalco-Fowkes (van Oss, 1979):

$$\gamma_{12}^{\text{LW}} = \gamma_1^{\text{LW}} + \gamma_2^{\text{LW}} - 2 \times \sqrt{\gamma_1^{\text{LW}} \times \gamma_2^{\text{LW}}} \quad (1.4)$$

A energia livre de interacção entre os materiais 1 e 2 no vácuo é calculada segundo a equação de Dupré:

$$\Delta G_{12}^{\text{LW}} = \gamma_{12}^{\text{LW}} - \gamma_1^{\text{LW}} - \gamma_2^{\text{LW}} \quad (1.5)$$



### 1.8.3.2 - Interações Ácido-Base de Lewis

Para além das interações de van der Waals e das interações electrostáticas, vários autores verificaram a existência de outra forças de interacção que também poderiam ter um papel importante na interacção entre colóides. Estas forças de interacção apresentam um carácter polar e podem ser atractivas (interacções hidrofóbicas) ou repulsivas (pressão de hidratação).

As energias resultantes destas interações podem apresentar uma grandeza 10 a 100 vezes superior às interações LW ou DL, que são as interações contabilizadas pela teoria DLVO (van Oss *et al.*, 1987; 1988). Portanto, as interações polares não contempladas pela teoria DLVO permitem rectificar os desvios verificados por esta teoria, especialmente em meios polares, tais como os meios aquosos (van Oss *et al.*, 1988).

Em meios aquosos, as forças de interacção polares devem-se principalmente a interações entre dadores e aceitadores de electrões que representam interações do tipo ácido-base de Lewis, que são geralmente designadas por AB (Fowkes, 1987; van Oss *et al.*, 1987).

As forças de interacção devidas ao aceitador de electrões e ao dador de electrões são consideradas assimétricas (van Oss *et al.*, 1987) e a energia livre polar de coesão de uma substância *i*,  $\Delta G_{ii}^{AB}$ , é dada por:

$$\Delta G_{ii}^{AB} = -4 \times \sqrt{\gamma_i^+ \times \gamma_i^-} \quad (1.6)$$

em que  $\gamma_i^+$  representa o parâmetro de tensão superficial devido à capacidade aceitadora de electrões e  $\gamma_i^-$  o parâmetro da tensão superficial devido à capacidade dadora de electrões.

Como a energia livre de coesão de uma substância *i* no vácuo é o dobro da sua tensão superficial (equação 1.3), então a tensão superficial de uma substância *i* polar é dada por:

$$\gamma_i^{AB} = 2 \times \sqrt{\gamma_i^+ \times \gamma_i^-} \quad (1.7)$$

O aceitador de electrões de uma substância 1 reage com o dador de electrões de uma substância 2 da seguinte forma:

$$\Delta G_{12}^{AB} = -2 \times \sqrt{\gamma_1^+ \times \gamma_2^-} - 2 \times \sqrt{\gamma_1^- \times \gamma_2^+} \quad (1.8)$$

Sendo a equação de Dupré também válida para as interações polares, a energia livre de interacção polar entre duas substâncias 1 e 2, é dada por:

$$\Delta G_{12}^{AB} = \gamma_{12}^{AB} - \gamma_1^{AB} - \gamma_2^{AB} \quad (1.9)$$

Combinando estas equações, a componente polar da tensão interfacial entre as substâncias 1 e 2 pode ser definida como:

$$\gamma_{12}^{AB} = 2 \times \left( \sqrt{\gamma_1^+ \times \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \times \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+ \times \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \times \gamma_2^+} \right) \quad (1.10)$$

De acordo, com o modelo de adesão proposto pela teoria XDLVO, a tensão superficial de um componente i é resultado das contribuições aditivas das interações de Lifshitz-van der Waals (interações LW) e de ácido-base de Lewis (interações AB):

$$\gamma_i^{TOT} = \gamma_i^{LW} + \gamma_i^{AB} \quad (1.11)$$

## 1.9 - Aspectos Microbiológicos da Adesão

Vários estudos de adesão realizados por diferentes autores, permitiram concluir que devem existir outras características na superfície das bactérias, para além das suas propriedades superficiais, que contribuem para a adesão bacteriana a superfícies (Reid *et al.*, 1994; Flint *et al.*, 1997; Sinde e Carballo, 2000).

As teorias apresentadas anteriormente não têm em conta os aspectos microbiológicos da adesão. Consideram apenas os aspectos físico-químicos e termodinâmicos da adesão, não tendo em conta o facto de os microrganismos serem entidades vivas e as suas características microbiológicas poderem condicionar a adesão.

Em meios aquosos a maior parte dos microrganismos apresenta uma superfície ionogénica negativa (Marshall, 1980), bem como grande parte das superfícies de adesão. Neste caso com base na teoria DLVO as forças electrostáticas entre os microrganismos e as superfícies de adesão seriam repulsivas. No entanto, muitos autores têm vindo a verificar a colonização de suportes negativamente carregados por microrganismos com carga do mesmo sinal (van Loosdrecht *et al.*, 1987; Sousa *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1998; Azeredo e Oliveira, 2000).

Quando a força iónica do meio é baixo, o perfil de energia potencial de interacção é caracterizado por uma barreira de energia que dificulta a aproximação das superfícies, necessária para se estabelecerem interações de curto alcance (até 0,3 nm de distância) responsáveis pela adesão firme (que ocorre no mínimo primário). Nestes casos, a interacção

entre o microrganismo e a superfície só poderia ocorrer no mínimo secundário (5 a 20 nm da superfície) e portanto a adesão seria reversível (Characklis e Cooksey, 1983). No entanto, verificou-se que muitos microrganismos aderem firmemente à superfície sólida em ambientes aquáticos de força iónica não muito elevada (Marshall, 1980). Quando a adesão ocorre nestas situações pode ser explicada pelo facto dos microrganismos poderem ser móveis ou mesmo possuírem estruturas extracelulares específicas capazes de ultrapassar a barreira de energia imposta pelas forças electrostáticas repulsivas.

Segundo a teoria DLVO, as interacções electrostáticas são tanto mais repulsivas quanto maior for o raio efectivo das partículas interactuantes. Assim, se as células através destas estruturas (apêndices extracelulares filamentosos) conseguirem reduzir o seu raio efectivo de interacção com a superfície, poderão ultrapassar a barreira de energia e atingir o mínimo primário.

As estruturas extracelulares que podem facilitar a adesão de bactérias a superfícies são as seguintes:

- Flagelos: estruturas responsáveis pela mobilidade das bactérias (MacNab, 1987) e que medeiam a adesão irreversível que é estabelecida por pontes poliméricas (produção de exopolímeros);
- Polímeros extracelulares: substâncias excretadas por muitas bactérias para o meio ambiente. A produção de polímeros está associada à adesão irreversível de bactérias a superfícies de adesão por pontes poliméricas.
- Fímbrias ou Pêlos: apêndices que não estão associados à mobilidade das bactérias, no entanto, são responsáveis pela capacidade adesiva das bactérias a outras bactérias, a células animais ou vegetais ou a partículas sólidas;
- “Prosthecae” ou Talos: este conjunto de apêndices extracelulares constitui extensões de parede ou membrana celular responsáveis pela adesão firme dos microrganismos a locais específicos de outros microrganismos ou a superfícies de partículas (Stanier, 1983);

### **1.10 - Técnicas para Estudar a Adesão**

Para a quantificação das energias envolvidas na adesão de microrganismos a superfícies, é necessário determinar as propriedades superficiais das entidades interactuantes.

As principais propriedades superficiais que química e fisicamente influenciam a adesão são a carga superficial e a hidrofobicidade.

A seguir encontram-se descritas algumas das técnicas utilizadas para a determinação das propriedades superficiais mais relevantes para a adesão, nomeadamente a tensão superficial e a hidrofobicidade.

### 1.10.1 - Técnicas de Determinação da Tensão Superficial de Sólidos

Existem várias técnicas para determinar as tensões superficiais de sólidos, em que as mais comuns se baseiam na medição de ângulos de contacto, adesão a solventes orgânicos e partição bifásica em solventes orgânicos. As considerações termodinâmicas que explicam o princípio de cada uma destas técnicas, relacionam sempre o coeficiente de partição ou a percentagem de células aderidas a solventes orgânicos com o ângulo de contacto previsível, que por sua vez está relacionado com a tensão superficial. Por esta razão a medição de ângulos de contacto é o método mais vulgarmente aceite.

#### 1.10.1.1 - Determinação da Tensão Superficial por Medição de Ângulos de Contacto

O ângulo de contacto ( $\theta$ ) formado por uma gota de líquido sobre uma superfície sólida está directamente relacionado com a molhabilidade da superfície por esse líquido. A equação de Young (Fowkes, 1964) estabelece a relação entre o ângulo de contacto e as componentes da tensão superficial:

$$\cos\theta \times \gamma_{lv} = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (1.12)$$

em que  $\gamma_{lv}$  representa a tensão superficial da interface líquido/vapor,  $\gamma_{sv}$  a tensão superficial da interface sólido/vapor e  $\gamma_{sl}$  a tensão superficial da interface sólido/líquido.

Existem vários métodos para a medição do ângulo de contacto líquido/sólido. Segundo Busscher (1984) o método mais fácil de utilizar é o da gota séssil. De acordo com van Oss *et al.* (1987) a tensão superficial é determinada pelo somatório da componente apolar ( $\gamma^{LW}$ ) e polar ( $\gamma^{AB}$ ) da tensão superficial (equação 1.11).

Combinando as equações 1.4, 1.10 e 1.11 com a equação de Young (1.12) obtêm-se a equação completa de Young-Good-Girifalco-Fowkes, que relaciona o ângulo de contacto

formado por um líquido sobre a superfície de um sólido com as componentes da tensão superficial do líquido ( $\gamma_l^{LW}, \gamma_l^{AB}, \gamma_l^+, \gamma_l^-$ ) e da superfície sólida ( $\gamma_s^{LW}, \gamma_s^{AB}, \gamma_s^+, \gamma_s^-$ ):

$$(1 + \cos \theta) \times \gamma_1^{\text{TOT}} = 2 \times \left( \sqrt{\gamma_s^{LW} \times \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \times \gamma_l^+} \right) \quad (1.13)$$

van Oss *et al.* (1992) consideram que se pode desprezar a pressão de espalhamento, quando  $\gamma_l > \gamma_s$ , porque neste caso a força de coesão do líquido é superior às forças de adesão à superfície e portanto o líquido não se espalha sobre a superfície.

Para se determinar as três componentes da tensão superficial de um sólido é necessário determinar-se o ângulo de contacto formado por três líquidos de polaridades diferentes, de acordo com a metodologia descrita no ponto 2.5.3.1 do Capítulo 2.

### 1.10.2 - Técnicas de Determinação da Hidrofobicidade de Superfícies

Como a hidrofobicidade é um parâmetro muito importante na adesão de microrganismos a superfícies em ambientes aquáticos, a determinação do carácter hidrofóbico ou hidrofílico das entidades interactuantes é de primordial importância para a interpretação do fenómeno de adesão. Existem vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade de superfícies celulares como: adesão a hidrocarbonetos, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico, cromatografia de interacção hidrofóbica, agregação por adição de sais - “salting out”, adesão a superfícies hidrofóbicas e medição de ângulos de contacto.

#### 1.10.2.1 - Determinação da Hidrofobicidade por Medição de Ângulos de Contacto

A medição de ângulos de contacto é a técnica universalmente utilizada para determinar a hidrofobicidade de materiais (Fowkes *et al.*, 1980). Para se poder aplicar esta técnica os sólidos têm que ser planos, lisos e homogéneos. Por vezes é necessário preparar previamente a superfície para que esta adquira as características necessárias para a boa execução da técnica.

Como esta técnica deve ser utilizada sobre superfícies homogéneas, planas, lisas e secas; a sua aplicação a microrganismos torna-se bastante difícil (Johnson *et al.*, 1977). No entanto, de modo a contornar estas limitações, desenvolveram-se estratégias na preparação das células por forma a minimizar os desvios à execução ideal da técnica. Uma das estratégias

consiste na construção de um filme plano de microrganismos, obtido por filtração de uma suspensão de células através de uma membrana de baixa porosidade (Busscher *et al.*, 1984; van der Mei *et al.*, 1987). A deposição das células na membrana deve ser o mais homogénea possível e a secagem da membrana constitui um dos passos críticos do processo. Uma das grandes limitações deste método consiste na dificuldade de medir o ângulo formado, uma vez que a porosidade do filme de células provoca uma rápida absorção da água (Doyle e Rosenberg, 1990). No entanto, apesar desta dificuldade, este é um dos métodos mais importantes uma vez que é o único que permite obter uma estimativa da hidrofobicidade global das células (Doyle e Rosenberg, 1990).

van Oss e Giese (1995) desenvolveram uma metodologia de cálculo que permite quantificar a hidrofobicidade da superfície dos materiais através das componentes da tensão superficial. Segundo estes autores a hidrofobicidade é expressa em termos da energia hidrofóbica de atracção e define o grau de interacção entre as moléculas de um material imerso em água.

De acordo com o critério proposto por estes autores, a hidrofobicidade é definida em termos da energia livre de interacção entre as moléculas de uma superfície (s) imersa em água (w),  $\Delta G_{sws}^{TOT}$ . Quando a energia global de interacção entre as moléculas de um sólido (s) imerso em água é atractiva ( $\Delta G_{sws}^{TOT} < 0$ ), significa que as moléculas do sólido têm menor afinidade para a água do que entre si, sendo neste caso considerada hidrofóbica. Quando a energia livre global de interacção entre as moléculas de um sólido (s) imerso em água é suficientemente repulsiva ( $\Delta G_{sws}^{TOT} > 0$ ) a superfície do sólido é considerada hidrofílica. Quanto maior for o valor absoluto de  $\Delta G_{sws}^{TOT}$  mais hidrofóbica (valores negativos) ou mais hidrofílica (valores positivos) é a superfície.

A energia livre global de interacção  $\Delta G_{sws}^{TOT}$  entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) é calculada pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interacção,  $\Delta G_{sws}^{LW}$  e  $\Delta G_{sws}^{AB}$  respectivamente:

$$\Delta G_{sws}^{TOT} = \Delta G_{sws}^{LW} + \Delta G_{sws}^{AB} \quad (1.14)$$

em que a componente apolar é determinada por:

$$\Delta G_{sws}^{LW} = -2 \times \left( \sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 \quad (1.15)$$

e a componente polar por:

$$\Delta G_{sws}^{AB} = -4 \times \left[ \left( \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} \right) + \left( \sqrt{\gamma_w^+ \times \gamma_w^-} \right) - \left( \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_w^-} \right) - \left( \sqrt{\gamma_w^+ \times \gamma_s^-} \right) \right] \quad (1.16)$$

A metodologia de cálculo desenvolvida por van Oss e Giese (1995) para quantificar a hidrofobicidade de superfícies de matérias sólidos através das componentes da tensão superficial obtidas pela técnica de medição de ângulos de contacto, já foi aplicada com sucesso para determinar a hidrofobicidade de superfícies celulares (Azeredo, 1998).

## Capítulo 2 – Material e Métodos

---

Neste capítulo descreve-se a metodologia experimental usada para a elaboração do trabalho. Apresenta-se a instalação experimental e descrevem-se as condições testadas durante os vários ensaios, os métodos analíticos, os métodos de cálculo e o tratamento de resultados.

2.1 Cinéticas de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo

2.2 Instalação Experimental

2.3 Identificação e Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão

2.4 Métodos Analíticos

2.5 Métodos de Cálculo

---



## 2.1 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo

Com o objectivo de estudar a cinética de formação de biofilmes em sistemas de distribuição de água potável e o modo como o tipo de material das tubagens, o regime de escoamento hidráulico e a presença de matéria orgânica biodegradável podem afectar o processo, foram realizados ensaios de formação de biofilme utilizando a instalação experimental descrita a seguir.

### 2.1.1 - Condições Experimentais

Os ensaios de formação de biofilme realizaram-se testando em simultâneo duas superfícies, aço e PVC. Efectuaram-se ensaios em regime de fluxo turbulento e laminar com e sem a adição de meios de cultura ricos em nutrientes. Na Tabela 2.1 apresentam-se as diferentes condições experimentais estudadas nos ensaios de formação de biofilme.

**Tabela 2.1** - Condições experimentais dos ensaios de formação de biofilme

Ensaio	Materiais de Suporte	Características do Escoamento			Nutrientes
		V (m/s)	Re	Regime	
Tipo A <sub>0</sub>	Aço 316	1,1	11000	turbulento	com nutrientes
Tipo A <sub>1</sub>	PVC				
Tipo A <sub>2</sub>	PVC				
Tipo B <sub>1</sub>	Aço 316	1,1	11000	turbulento	sem nutrientes
Tipo B <sub>2</sub>	PVC				
Tipo C	Aço 316 PVC	0,2	2000	laminar	com nutrientes
Tipo D	Aço 316 PVC	0,2	2000	laminar	sem nutrientes

## 2.2 - Instalação Experimental

A instalação experimental utilizada para estudar a formação de biofilmes encontra-se esquematizada na Figura 2.1. Basicamente, é composta por um sistema de duas células de fluxo em paralelo, que pretendem simular à escala laboratorial pequenos troços de conduta da rede de distribuição, alimentadas por água potável, previamente preparada num sistema de duas colunas consecutivas de carvão activado granular.

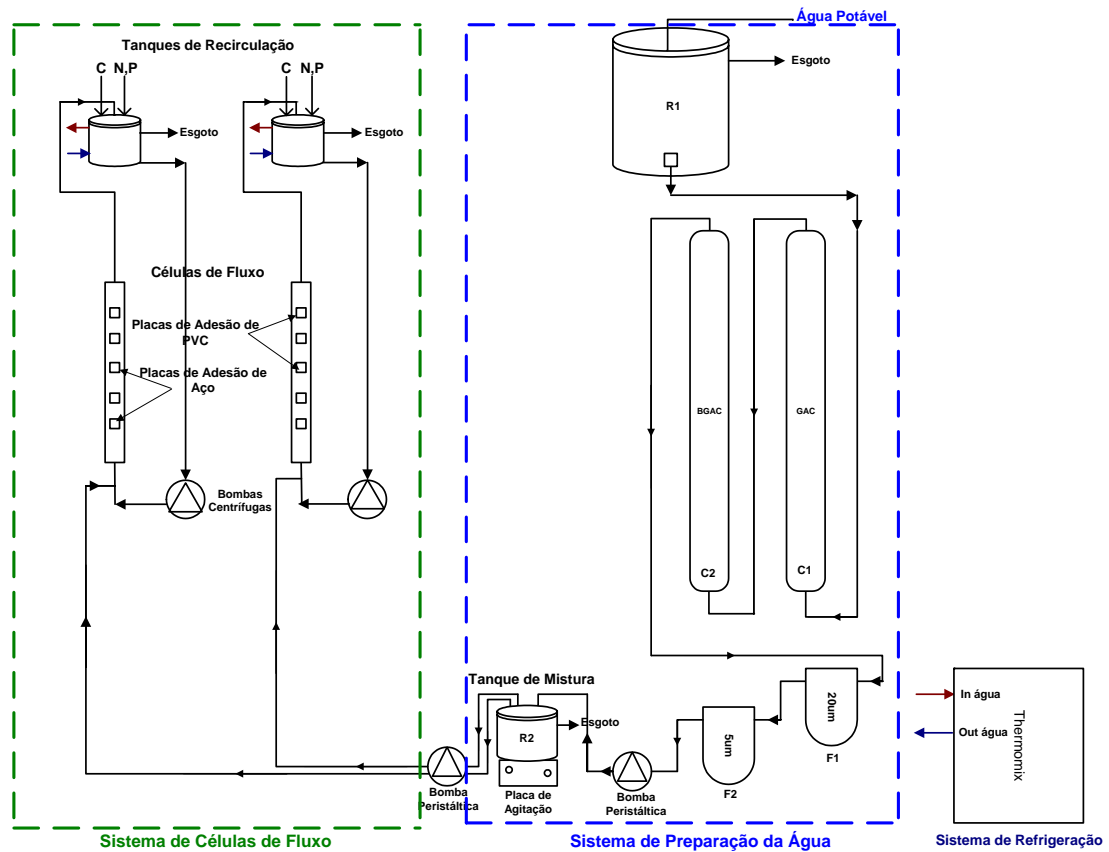


Figura 2.1 - Representação esquemática da instalação experimental.



**Figura 2.2** - Fotografia da instalação experimental usada nos ensaios de formação de biofilme.

### 2.2.1 - Sistema de Preparação da Água

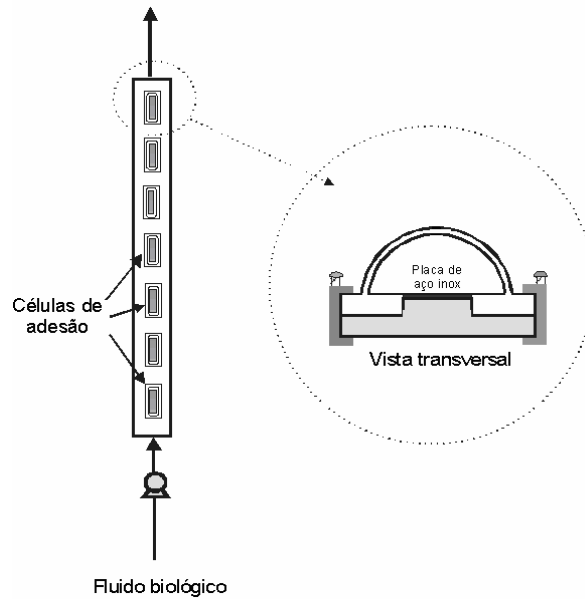
A água potável proveniente do sistema de distribuição de água da rede pública de Braga é recolhida num reservatório fechado ( $R_1$ ) e submetida a uma preparação antes de ser alimentada ao sistema de células de fluxo. A preparação da água, segundo o já descrito por Morin e Camper (1997) e Morin *et al.* (1996), consiste na sua passagem através de um sistema de duas colunas consecutivas de carvão activado granular (GAC) que operam em fluxo ascendente. O primeiro filtro de carvão activado granular ( $C_1$ ) elimina o conteúdo em cloro livre presente na água potável, enquanto o segundo ( $C_2$ ) funciona como um filtro de carvão activado granular biológico (BGAC) que fornece um inóculo bacteriano contínuo ao reservatório ( $R_2$ ) que alimenta o sistema de células de fluxo. Este sistema de colunas também remove o conteúdo em matéria orgânica biodegradável presente na água potável. Para evitar o aparecimento de partículas de carvão no sistema de células de fluxo proveniente das colunas, colocou-se entre estas e o reservatório  $R_2$  dois filtros consecutivos de 20 e 5  $\mu\text{m}$  de porosidade,  $F_1$  e  $F_2$  respectivamente.

A água é depois bombeada através de uma bomba peristáltica (Ismatec) para um reservatório de menor capacidade ( $R_2$ ), que se denominou por tanque de mistura. Este consiste num tanque cilíndrico agitado com um volume útil de 1,6 L, construído em acrílico (Perspex™). A agitação foi promovida pela colocação do tanque sobre uma placa de agitação electromagnética de velocidade regulável e a introdução de uma barra magnética de tamanho adequado no seu interior. O tanque de mistura funciona assim como um reservatório de água que alimenta o sistema de células de fluxo a um caudal constante de 0,02 L/h através de uma bomba peristáltica (Ismatec), obtendo-se um tempo de residência da água nas células de fluxo de 2 h. O tempo de residência de 2 h foi escolhido, de modo a que nos estudos cinéticos de crescimento de biofilme fosse minimizado o crescimento de células bacterianas no seio do líquido. Deste modo, a quantificação bacteriana efectuada reflecte apenas as células aderidas ou desprendidas da superfície (Morin e Camper, 1997).

### 2.2.2 - Sistema de Células de Fluxo

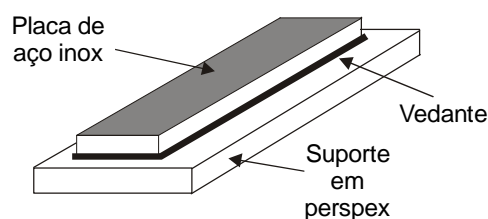
Este sistema foi desenvolvido pelo grupo de Biofilmes do Centro de Engenharia Biológica (CEB) e a sua descrição encontra-se em Pereira *et al.* (2002b). O sistema usado para a elaboração deste trabalho é constituído por duas células de fluxo colocadas na posição vertical e em paralelo ligadas cada uma a um tanque de recirculação.

Cada uma das células de fluxo foi construída em acrílico (Perspex™) e pode-se descrever como sendo uma pequena conduta de secção semicircular de 43,3 cm de comprimento e 0,98 cm de diâmetro equivalente (diâmetro da secção semicircular é de 1,6 cm), com cinco aberturas rectangulares na sua face plana para convenientemente alojar as várias superfícies de suporte do biofilme. A Figura 2.3 representa esquematicamente uma célula de fluxo utilizada nos ensaios de formação do biofilme.



**Figura 2.3** - Representação esquemática de uma célula de fluxo.

As superfícies de adesão são constituídas por pequenas placas (2,4 × 1,4 cm) de aço inoxidável ASI 316 e de cloreto de polivinilo (PVC) coladas com cola (epóxi Araldite® rapide) em suportes rectangulares de acrílico (Perspex™). Ao conjunto suporte de acrílico mais placa chamou-se placa de adesão (Pereira, 2001). A sua geometria (Figura 2.4) foi desenhada por forma a que cada uma ficasse adequadamente ajustada nas aberturas da face plana de cada célula de fluxo. Em cada placa de adesão colocou-se um vedante para garantir as condições de estanquicidade do sistema. A fixação de cada placa de adesão à face plana da célula de fluxo foi efectuada usando uma pinça Hoffman.



**Figura 2.4** - Pormenor de uma placa de adesão.

O biofilme é formado sobre estas placas de adesão pela recirculação da água, continuamente obtida do tanque de mistura, no interior do sistema de células de fluxo. O sistema permite uma recolha periódica destas placas de adesão para posteriormente quantificar o conteúdo bacteriano do biofilme.

As superfícies de adesão usadas nos ensaios de formação de biofilme, aço inoxidável ASI 316 e PVC, foram seleccionadas por possuírem características superficiais diferentes, o

ação é hidrofílico enquanto que o PVC é hidrofóbico (Pedersen, 1990), e representarem os materiais mais utilizados na actualidade em sistemas de distribuição de água potável.

Cada sistema de células de fluxo inclui um tanque de recirculação colocado a uma altura de cerca de 70 cm, que consiste num tanque cilíndrico em acrílico (Perspex™) de volume útil de 2,1 L com uma camisa que permite manter a sistema a uma temperatura de  $20 \pm 1$  °C através da recirculação de água proveniente de um sistema de refrigeração externa (Thermomix® BU, B. Braun – Biotech SA). Este tanque está ligado à célula de fluxo através de bombas centrífugas (Eheim, tipo 1060 ou 1046) que variando o seu caudal de recirculação permitem obter diferentes regimes de escoamento hidráulico (diferentes velocidades). Este sistema de volume total aproximado 2,7 L permite variar a velocidade de escoamento da água sem variar o tempo de residência desta nas células de fluxo.

### 2.2.3 - Meios de Cultura Líquidos

Em alguns dos ensaios de formação de biofilme, a água potável preparada que circula no sistema é suplementada com meios ricos em carbono, azoto e fósforo de modo a obter uma concentração final no sistema de células de fluxo de 0,5, 0,1 e 0,01 mg/L em carbono, azoto e fósforo respectivamente. Esta adição de nutrientes à água pretende simular o conteúdo em matéria orgânica biodegradável que normalmente se encontra presente na água potável que circula nas redes de distribuição e que neste caso tinha sido removido nas colunas de GAC.

Os meios ricos em carbono, azoto e fósforo foram preparados pipetando 2,2 mL de uma solução stock de carbono com concentração de 104 g C/L e 3 mL de uma solução stock de azoto e fósforo com concentração de 14,96 g N/L e 1,48 g P/L cada uma para um bidão com 20 L de água destilada nos quais se acertou o pH a 7 com uma solução de NaOH 1M, sendo depois esterilizados no autoclave a 121 °C durante 20 min e adicionados nos tanques de recirculação por meio de duas bombas peristálticas (Ismatec) a um caudal de 2 mL/min. A composição das soluções stock de nutrientes encontra-se descrita na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** - Composição das soluções stock de nutrientes

<b>Solução Stock de Carbono</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O (J. M. Gomes Santos)	176,20
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (p.a. Riedel-de Haën)	35,80
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O 98% (Fluka)	30,10
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> (p.a. Riedel-de Haën)	72,90
<b>Solução Stock de Azoto e Fósforo</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
KNO <sub>3</sub> (p.a. Merck)	108,30
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (J. M. Gomes Santos)	8,53

#### 2.2.4 - Desinfecção e Lavagem

Antes de iniciar cada ensaio de formação de biofilme parte da instalação experimental era submetida a um processo de desinfecção.

Dado que o material utilizado na construção do tanque de mistura e sistema de células de fluxo não suportava temperaturas elevadas procedeu-se à desinfecção química, em circuito fechado, com uma solução de hipoclorito de sódio comercial (15% V/V) durante 30 min. Após este tempo removeu-se a solução de hipoclorito e procedeu-se à lavagem através da circulação, em circuito aberto, de água destilada previamente esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 min, por forma a eliminar a concentração residual de hipoclorito de sódio.

Finda esta operação a instalação considerava-se desinfectada. Nos ensaios em que havia a adição dos meios de cultura líquidos as tubagens e acessórios, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 min, foram assepticamente introduzidos na instalação.

#### 2.2.5 - Operação e Monitorização

Após a desinfecção, o tanque de mistura e o sistema de células de fluxo foram cheios com água proveniente do sistema de preparação de água substituindo a bomba peristáltica por outra com capacidade para debitar um caudal maior (Easy-load<sup>®</sup> Masterflex<sup>®</sup> Model 7518-00) de modo a minimizar o tempo de enchimento. Inicialmente, o sistema de células de fluxo

operou em modo descontínuo durante cerca de 13 h. Findo este tempo passou a operar em modo contínuo pela alimentação de água potável proveniente do tanque de mistura e em alguns ensaios dos meios de cultura líquidos ricos em nutrientes.

O biofilme desenvolveu-se pela recirculação de água, assegurada por bombas centrífugas, no interior das células de fluxo, a um caudal determinado.

Cada ensaio teve uma duração média de 14 d, tempo necessário para o biofilme atingir o estado estacionário. Durante este período de tempo procedeu-se à amostragem periódica de biofilme, efluente dos tanques de recirculação e água do tanque de mistura.

As várias amostras recolhidas ao longo do tempo foram analisadas em termos do seu conteúdo bacteriano pela contagem de heterotróficos em placa em dois meios de cultura diferentes, R<sub>2</sub>A (Oxoid) e TSA (Merck), e pela contagem de bactérias totais por observação ao microscópio de epifluorescência. Para além destes parâmetros também foram monitorizados nos vários pontos de amostragem (tanque de mistura e efluente dos tanques de recirculação) o pH e a temperatura ao longo do tempo em que decorreram os ensaios de formação de biofilme.

Mediu-se periodicamente a concentração de cloro livre à entrada e saída do sistema de preparação da água, para verificar a eficiência deste na remoção de cloro da água potável.

Os caudais de alimentação de água às células de fluxo, bem como os caudais dos meios de cultura líquidos ricos em nutrientes foram constantemente medidos e convenientemente ajustados caso necessário.

### **2.2.5.1 - Amostragem do Biofilme**

Para recolher amostras de biofilme, parava-se a recirculação das células de fluxo e fechavam-se as suas entradas e saídas com pinças Hoffman, e em condições de assepsia, colocavam-se as células de fluxo na posição horizontal e removiam-se as placas de adesão pretendidas de cada uma das células de fluxo, substituindo-as por outras limpas e estéreis, previamente reservadas em álcool etílico a 70%. A remoção das placas de adesão e consequente substituição por outras ocorria assim com paragem do fluxo de água.

O biofilme formado sobre as placas de adesão era removido destas em condições de assepsia e da seguinte forma: lavava-se, para um goblé, a superfície com 10 mL de uma solução tampão fosfato pH 7 estéril (a sua composição encontra-se descrita no ponto 2.4.3) para remover os microrganismos que se encontravam fracamente aderidos (ou apenas depositados). Em seguida raspa-se o biofilme com auxílio de uma espátula, previamente mergulhada em álcool e flamejada, lavando-se simultaneamente a superfície de adesão com



10 mL de tampão fosfato pH 7 estéril para um goblé de 20 mL, de modo a recolher todo o biofilme aderido à superfície. O conteúdo do goblé era depois vigorosamente homogeneizado durante 2 min num vortex (Heidolph Reax 2000) regulado para a potência máxima, para promover a dispersão das bactérias do biofilme, de modo a que a posterior quantificação bacteriana do biofilme representasse células isoladas e não agregados celulares.

### **2.3 - Identificação e Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão**

A água contida no tanque de mistura contém as bactérias que colonizam o sistema de células de fluxo usado para o estudo das cinéticas de formação de biofilme.

Com o objectivo de identificar e caracterizar as várias espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura efectuaram-se testes de identificação. Depois de convenientemente identificadas as várias bactérias foram caracterizadas segundo as suas propriedades superficiais.

Com o intuito de fazer um estudo teórico de previsão da adesão das várias espécies isoladas da água aos materiais em estudo neste trabalho, foi também efectuada a determinação das propriedades superficiais das superfícies de adesão usadas nos ensaios de formação de biofilme.

#### **2.3.1 - Identificação das Bactérias Colonizadoras**

Para a identificação das bactérias presentes na água do tanque de mistura recolheram-se amostras de água desse tanque que foram espalhadas em placas de Petri contendo R<sub>2</sub>A ou TSA e incubadas à temperatura ambiente durante 15 d. O isolamento dos diferentes tipos de bactérias presentes na água foi baseado na observação da cor e tipo de morfologia das colónias presentes nas placas de Petri. Os diferentes tipos de colónias foram então repicados e isolados para o mesmo meio sólido onde foram encontradas (R<sub>2</sub>A e TSA). Após o isolamento, as culturas foram mantidas a 4 °C e repicadas todos os meses para manter a sua viabilidade, até à sua identificação pelo sistema de identificação Programa API (ID32 GN) efectuada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Numa tentativa preliminar de identificar os diferentes grupos de bactérias presentes no inóculo foram usados três meios sólidos selectivos: Chromocult<sup>®</sup> TBX agar (Merck) para a detecção de *Escherichia coli*, quando inoculadas neste meio durante 24 h a 30°C as colónias de *E. coli* apresentam uma coloração azul esverdeada; PIA (Difco) para a detecção de bactérias da família das *Pseudomonadaceae*, estas crescem neste meio após incubação a 30°C durante 18-24 h e o meio mínimo com metanol (MMM), este é um meio mínimo sintético suplementado com 1% (V/V) de metanol, sendo usado para o crescimento de metilotróficos facultativos que quando crescem neste meio a 30°C apresentam uma pigmentação rosa, como é o caso dos microrganismos pertencentes ao género *Methylobacterium* (Kim *et al.*, 1999). Foi também usada a coloração de Gram para todas as bactérias isoladas da água do tanque de mistura.

As diferentes espécies bacterianas encontradas, foram também submetidas a um estudo para verificar a sua capacidade de crescimento nos dois meios usados para a contagem de microrganismos heterotróficos (R<sub>2</sub>A e TSA) em condições de stress como é o caso da água potável.

Depois de identificadas as diferentes bactérias foram crioconservadas numa câmara a -80 °C em Skim Milk powder (Merck) com 30% de glicerol 87% (p.a. Merck).

A composição e modo de preparação dos meios de cultura, de isolamento e selectivos bem como o meio usado para a crioconservação encontram-se descritos no Anexo A.

### **2.3.2 - Determinação das Propriedades Superficiais das Bactérias e das Superfícies de Adesão**

Com o objectivo de melhor compreender a adesão bacteriana a superfícies em contacto com a água foram estudadas as propriedades superficiais das bactérias e superfícies de adesão, nomeadamente a determinação das tensões superficiais e hidrofobicidade a partir da técnica de medição de ângulos de contacto, para todas as diferentes espécies isoladas da água e para as duas superfícies de adesão usadas nos ensaios de formação de biofilme.

#### **2.3.2.1 - Preparação das Células para a Medição de Ângulos de Contacto**

Fizeram-se crescer as diferentes espécies de bactérias no meio de cultura TSB (Merck) (meio líquido com a mesma composição do meio TSA onde algumas bactérias foram isoladas). As bactérias crescidas, regra geral, durante cerca de 12 h foram recolhidas e

centrifugadas a 7000 g durante 10 minutos a 4 °C (Sigma 4K10, B. Braun). Os “pellets” foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M (8,5 g/L NaCl (p.a. Merck), 0,272 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (comercial) e 1,785 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (comercial)) e, após cada lavagem, procedeu-se a uma nova centrifugação. Finalmente, as células foram ressuspensas em PBS 0,1 M de modo a obter uma densidade óptica celular entre 0,2 e 0,3 a um comprimento de onda de 640 nm. O número de células correspondente a esta densidade óptica foi determinado pela contagem de heterotróficos em placa usando o meio de cultura  $\text{R}_2\text{A}$ .

De seguida preparou-se um sistema de filtração com uma membrana de ester de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade e 47 mm de diâmetro (Pall Gelman), que foi molhada com água destilada estéril. Posteriormente filtrou-se 30 mL da suspensão celular repartida em três porções de 10 mL. Para que a camada celular depositada sobre a membrana ficasse o mais homoganeamente distribuída introduziram-se simultaneamente com cada 10 mL de suspensão celular 10 mL de água destilada estéril com ajuda de pipetas graduadas.

Depois da filtração, a membrana com a camada de células foi cortada cuidadosamente em três partes, e colada em lâminas de vidro com fita adesiva de dupla face. Deste modo, a membrana ficava bem aderida à lâmina como uma superfície plana e lisa para facilitar a leitura dos ângulos de contacto. Para que não ocorresse desidratação das células as lâminas de vidro com as membranas foram colocadas dentro de placas de Petri sobre uma camada de 0,5 cm de espessura de 1% (p/V) de agar (Merck) e 10% (V/V) de glicerol 87% (p.a. Merck) previamente preparadas. As placas foram colocadas no frigorífico a 5° C até ao momento da leitura (dia seguinte). Antes de se efectuar a leitura dos ângulos de contacto retiram-se as placas do frigorífico e deixam-se secar à temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos (van der Mei *et al.*, 1998).

### **2.3.2.2 - Preparação das Superfícies de Adesão para a Medição de Ângulos de Contacto**

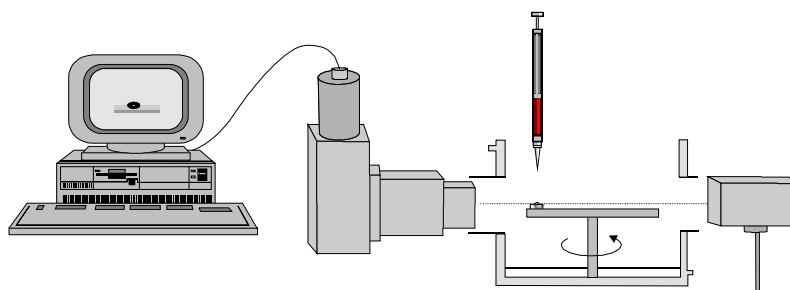
Como já foi anteriormente referido, as superfícies de adesão usadas nos ensaios de formação de biofilme foram o aço ASI 316 e o PVC.

As placas de aço e PVC antes de serem submetidas à determinação dos ângulos de contacto foram convenientemente lavadas e desengorduradas com um detergente comercial, sendo depois passadas por álcool etílico 96% e água destilada e posteriormente secas numa estufa. E por último guardadas num excicador até ao momento de leitura. A medição dos ângulos de contacto foi efectuada segundo o procedimento descrito a seguir para as células bacterianas, substituindo as membranas com as células pelas placas de adesão.

### 2.3.2.3 - Medição de Ângulos de Contacto de Células Bacterianas

Os ângulos de contacto foram determinados pelo método da gota séssil sobre uma superfície homogênea, plana, lisa e seca de microrganismos depositados sobre uma membrana de baixa porosidade (Busscher *et al.*, 1984; van der Mei *et al.*, 1987), usando um aparelho de medição de ângulos de contacto de marca Kruss-GmH, Hamburg (Figura 2.5). As amostras a analisar são colocadas sobre um suporte no interior da câmara e uma gota de volume aproximadamente constante é colocada sobre a superfície da camada de células bacterianas. A queda da gota é feita com muito cuidado, sem mover a agulha em torno da mesma, para evitar distorções que falseiam os resultados. A determinação do ângulo formado sobre superfície foi efectuada imediatamente a seguir à colocação da gota, sendo as medições dos ângulos de contacto efectuadas manualmente em vez de se recorrer a um sistema de análise de imagem (Kruss-GmH, Hamburg) que permite captar as imagens através de uma câmara de vídeo e digitaliza-las num computador pessoal (486 DX4, 100 MHz) onde está instalado um sistema automático de leitura (G2/G40), uma vez que este está sujeito a interferências e por vezes não consegue ajustar os vários parâmetros do software usado.

Todas as medições foram efectuadas à temperatura ambiente, utilizando três líquidos de diferente polaridade: água, formamida e  $\alpha$ -bromonaftaleno.



**Figura 2.5** - Esquema do equipamento utilizado para a medição de ângulos de contacto (Azeredo, 1998).

## 2.4 - Métodos Analíticos

### 2.4.1 - Determinação da Temperatura e pH

A determinação da temperatura foi efectuada utilizando um termómetro de mercúrio. Os resultados vêm expressos em °C.

A determinação do pH foi efectuada usando um medidor de pH da Hanna Instruments (pH HI 8711E).

#### **2.4.2 - Determinação da Concentração de Cloro Livre**

Para a determinação da concentração do cloro livre expresso em mg Cl/L, usou-se um medidor iónico específico da Hanna Instruments (HI 93701). Este determina o conteúdo em iões de cloro da água baseado em métodos colorimétricos (método do DPD). O reagente DPD (N,N-dietil-p-fenilodiamina) (HI 93701-0) reage com o cloro livre presente na amostra de água originando uma coloração rosa. A gama de leitura deste medidor encontra-se entre 0 – 2,5 mg Cl/L.

#### **Procedimento Experimental**

A determinação da concentração de cloro livre foi efectuada logo após a recolha das amostras. O procedimento de leitura foi efectuada de acordo com o descrito no manual do medidor. Os valores lidos no medidor vêm expressos em mg Cl/L.

#### **2.4.3 - Contagem de Heterotróficos em Placa (Bactérias Cultiváveis)**

A contagem microrganismos heterotróficos em placa (HPC), é um procedimento que permite estimar o número de bactérias heterotróficas cultiváveis presentes na água e é usualmente utilizado para medir as mudanças na sua qualidade durante o tratamento e sua distribuição. O termo HPC representa o número total de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que tem como fonte de carbono e energia compostos orgânicos e que tem a capacidade de crescer num determinado meio de cultura, a uma temperatura e por um período de tempo adequados. As colónias podem surgir aos pares, em cadeias, agrupadas ou isoladas, estando todas incluídas no termo “unidades formadoras de colónias” (UFC). A contagem final depende também da interacção entre as colónias em desenvolvimento; deve escolher-se a combinação do procedimento e meio que produz o maior número de colónias dentro do tempo de incubação designado.

Existem diferentes métodos e meios que podem ser utilizados para a contagem de microrganismos heterotróficos em placa. Os métodos que existem são: o método de vertimento em placa usado para volumes de amostra que variam de 0,1 a 2 mL; o método de

espalhamento em placa, sendo este método limitado pelo pequeno volume de amostra que pode ser absorvido pelo agar, 0,1 a 0,5 mL; e o método da filtração em membrana que permite testar grandes volumes de amostra sendo escolhido para amostras de água com baixas contagens. O Plate Count Agar (PCA) a 35 °C durante 48 h de incubação era o meio tradicionalmente usado para a contagem de heterotróficos em placa para amostras de água potável. Contudo este meio não permitia o crescimento de muitas bactérias que podem estar presentes na água potável, pelo que um novo meio, R<sub>2</sub>A, foi desenvolvido por Reasoner e Geldreich (1985). Este produz contagens significativamente mais elevadas do que o PCA, sendo recomendado para a monitorização das populações bacterianas heterotróficas da água durante os processos de tratamento e sua distribuição usando qualquer um dos métodos acima referidos à temperatura de 28 °C e durante 5 a 7 d de incubação.

A contagem de microrganismos heterotróficos em placa em amostras de água potável é principalmente afectada pela temperatura da água, a presença de cloro residual e a quantidade de matéria orgânica assimilável.

### Reagentes

Meio de cultura: Os meios de cultura usados para a quantificação das bactérias cultiváveis foram o R<sub>2</sub>A e o TSA, independentemente do método utilizado. Para a preparação do R<sub>2</sub>A dissolvem-se 12,67 g de R<sub>2</sub>A (Oxoid) em 700 mL de água destilada, e para a preparação do meio TSA dissolvem-se 21 g de TSB (Merck) com 10,5 g de agar granulado (Merck) em 700 ml de água destilada. Autoclavam-se estes dois meios de cultura sólidos a 121°C durante 15 min. Depois de esterilizados vertem-se à chama estes meios para placas de Petri de modo a formar, em cada uma, uma camada de 3 a 5 mm de espessura. Passadas duas horas invertem-se as placas e armazenam-se em posição invertida.

Solução de tampão fosfato pH 7: Dissolver 0,28 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,176 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O em 700 mL de água destilada, ajustando o pH da solução a 7 e autoclavar a 121°C durante 15 min.

### Procedimento Experimental

Preparam-se em condições de assepsia tubos de ensaio com 9 mL de tampão fosfato pH 7 que são usados para a diluição das amostras. Estas são vigorosamente homogeneizadas num vortex regulado para a sua potência máxima. Posteriormente, para cada amostra, preparam-se à chama diluições sucessivas até ao factor de diluição desejado, homogeneizando sempre no vortex o tubo de ensaio antes de pipetar 1 mL do seu conteúdo para o tubo de

ensaio seguinte. As placas de Petri previamente preparadas com meio de cultura são marcadas com o tipo de amostra, diluição, data e qualquer outra informação necessária, sendo cada análise efectuada em triplicado. Depois de agitar bem a amostra ou diluição no vortex, pipetam-se, à chama, 100 µL desta e vertem-se sobre a superfície do meio de cultura das placas anteriormente preparadas. De seguida, mergulha-se o espalhador de vidro em álcool passa-se pela chama, depois de ligeiramente arrefecido à chama, espalha-se a amostra, distribuindo-a sobre a superfície do meio, rodando ao mesmo tempo a placa com a outra mão. Depois da amostra ser completamente absorvida pelo meio, incuba-se a placa em posição invertida à temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). São contadas as colónias individualizadas na superfície do meio após 3, 7 e 15 d de incubação. A temperatura e o tempo de incubação foram seleccionados de acordo com as conclusões obtidas por Reasoner e Geldreich (1985), que obtiveram para amostras de água potável contagens máximas com R<sub>2</sub>A a 20 °C durante 14 d.

#### **2.4.4 - Bactérias Totais (Contagem Directa Microbiana Total- Método do Microscópio de Epifluorescência com DAPI)**

A contagem directa de células totais de bactérias na água excede usualmente a obtida pela contagem de heterotróficos em placa e métodos de número mais provável, porque, ao contrário destes procedimentos, a contagem directa evita erros causados por fenómenos relacionados com a viabilidade, a selectividade dos meios de crescimento, a acumulação de células e taxas de crescimento lentas.

Este método consiste na fixação da amostra para armazenamento, coloração com um fluorocromo químico, neste caso o DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) que fixa o DNA das células, filtração sob vácuo através de uma membrana de policarbonato não fluorescente e enumeração por contagem com recurso à microscopia de epifluorescência.

A observação de células através do microscópio de epifluorescência após coloração com um fluorocromo químico, permite uma contagem directa de células totais com uma relativa rapidez e sensibilidade. (APHA *et al.*, 1995)

#### **Reagentes**

Solução de DAPI 0,01% (0,1 g/L): Dissolver 1mg de DAPI (Sigma) em 10 mL de água ultrapura num recipiente limpo e esterilizado. Filtrar a solução através de uma seringa com um filtro estéril de 0,2 µm de porosidade (Schleicher & Schuell FP 30/0,2 CA-S) para um

recipiente estéril de vidro escuro. A preparação desta solução deve ser efectuada com o mínimo de luz presente. E esta solução é depois armazenada no frigorífico.

#### Óleo de imersão de baixa fluorescência (Merck)

Solução de formaldeído min. 37% (p.a. Merck): Esta solução é esterilizada por filtração através de um filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosidade (Schleicher & Schuell FP 30/0,2 CA-S).

### **Procedimento Experimental**

- Coloca-se uma membrana negra de polycarbonato com 25 mm de diâmetro (diâmetro útil de 22,7 mm) e 0,2  $\mu\text{m}$  de porosidade (Whatman), num sistema de filtração com cuidado para que fique bem aderida e plana. A membrana é depois lavada com água destilada isenta de bactérias, sendo esta filtrada através de uma seringa com um filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosidade.
- De seguida agita-se a amostra num vortex (Heidolph Reax 2000) regulado para a potência máxima durante 2 min e filtra-se um determinado volume desta, ligando e desligando o sistema de filtração para que esta se dê lentamente. Depois da membrana estar seca deita-se sobre esta 400  $\mu\text{l}$  da solução de DAPI e espera-se no mínimo 5 min. Findo este tempo lava-se novamente a membrana com água destilada isenta de bactérias. Tira-se a membrana do sistema de filtração com a ajuda de uma pinça, sendo esta colocada em cima de uma lâmina de vidro para secar.
- Depois desta se encontrar seca coloca-se no centro da lâmina sobre uma gota de óleo de imersão, adicionando de seguida mais uma pequena gota de óleo de imersão sobre a superfície da membrana e cobrindo-a cuidadosamente com uma lamela, eliminado com papel absorvente os excessos de óleo e guarda-se a preparação no escuro no interior de uma caixa apropriada. Esta preparação pode ser guardada no escuro por vários meses sem que haja uma perda significativa da fluorescência.
- Por último observa-se ao microscópio de epifluorescência (Zeiss, Axioskop) com o filtro apropriado ( $\lambda_{\text{excitação}}=359 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}}=461 \text{ nm}$ ) e com objectiva de 100 $\times$  usando óleo de imersão e procede-se à contagem directa das bactérias. A contagem deve ser efectuada em pelo menos 10 campos seleccionados ao acaso na membrana, de modo a cobrir toda a superfície de filtração e a permitir obter no mínimo 300 bactérias.

Nota: Todo este procedimento deve ser efectuada com o mínimo de luz presente, uma vez que o fluorocromo DAPI é fotossensível e em condições de assepsia.



### **Método de Preservação das Amostras**

Como regra geral as amostras não foram analisadas no mesmo dia em que foram recolhidas. Deste modo, estas foram fixadas e preservadas pela adição da solução de formaldeído de modo a obter uma concentração de formaldeído na amostra de 2%, sendo depois armazenadas no frigorífico a 4 °C.

#### **2.4.5 - 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.

Durante este trabalho experimental usaram-se vários fluorocromos para além do já referido DAPI, para a observação de amostras de biofilme directamente sobre as placas de adesão, formado em diferentes condições experimentais e com diferentes tempos de formação. Assim, também foram usados os fluorocromos CTC (5 cyano-2,3-diotyl tetrazolium chloride) (Polysciences) e L/D (Live/Dead® BacLight™) (Molecular Probes). Os procedimentos de coloração usados para os vários fluorocromos são os seguintes:

##### **Coloração do Biofilme com CTC+DAPI:**

- Lavar a superfície da placa de adesão com biofilme aderido, com 10 mL de uma solução de tampão fosfato pH 7.
- Cobrir a superfície com 500 µL da solução de CTC 5 mM e incubar à temperatura ambiente durante 4 h a 100 rpm.
- Lavar novamente a superfície da placa de adesão com 10 mL de uma solução de tampão fosfato pH 7.
- Cobrir a superfície com 500 µL da solução de DAPI 0,01% (0,1 g/L) e incubar à temperatura ambiente a 100 rpm durante 30 min..
- Por último lavar a superfície da placa de adesão com mais 10 mL de tampão fosfato pH 7 e observar ao microscópio de epifluorescência (Zeiss, Axioskop) com o filtro apropriado ( $\lambda_{\text{excitação}}=365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}}=455 \text{ nm}$ ) e com objectiva de 100× usando óleo de imersão.

##### **Coloração do Biofilme com L/D:**

- Lavar a superfície da placa de adesão com biofilme aderido, com 10 mL de uma solução de tampão fosfato pH 7.

- Aplicar 300  $\mu\text{L}$  da solução do componente A 0,3% (V/V) + 300  $\mu\text{L}$  da solução do componente B 0,3% (V/V) (L/D) sobre a superfície da placa de adesão e incubar à temperatura ambiente durante 15 min..
- Escorrer bem o corante e observar ao microscópio de epifluorescência (Zeiss, Axioskop) com o filtro apropriado ( $\lambda_{\text{excitação}}=480\text{-}500\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}}=485\text{ nm}$ ) e com objectiva de 100 $\times$  usando óleo de imersão.

#### **Coloração do Biofilme com DAPI:**

- Lavar a superfície da placa de adesão com biofilme aderido, com 10 mL de uma solução de tampão fosfato pH 7.
- Aplicar 500  $\mu\text{L}$  da solução de DAPI 0,01% (0,1 g/L) sobre a superfície da placa de adesão e incubar à temperatura ambiente durante 30 min..
- Por último lavar a superfície da placa de adesão com mais 10 mL de tampão fosfato pH 7 e observar ao microscópio de epifluorescência (Zeiss, Axioskop) com o filtro apropriado ( $\lambda_{\text{excitação}}=359\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}}=461\text{ nm}$ ) e com objectiva de 100 $\times$  usando óleo de imersão.

Nota: As soluções de CTC 5 mM e L/D 0,3% (V/V) foram preparadas com água ultrapura num recipiente limpo e estéril, sendo depois filtradas através de uma seringa com um filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosidade para recipientes estéreis de vidro escuro. Estas soluções são depois armazenadas no frigorífico. Todos os procedimentos foram efectuados com o mínimo de luz presente e em condições de assepsia.

#### **2.4.6 - Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)**

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) foi também usada para a observação da estrutura superficial do biofilme. Antes da observação, o biofilme formado nas superfícies de adesão de aço e PVC foi desidratado através da imersão em soluções de etanol absoluto (p.a. Riedel-de Haën) com concentração crescente (10, 25, 40, 50, 70, 80, 90, 100%), permanecendo cerca de 15 min em cada solução. Posteriormente, as placas de adesão foram transferidas para um exsiccador para a secagem completa onde permaneceram até serem observadas. No dia da observação, as amostras foram cobertas com ouro e examinadas num microscópio electrónico de varrimento (Leica S360), instalado na Universidade do Minho, Centro de Microscopia Electrónica.

Não foi seguido o método típico de preparação de amostras para SEM (fixação com uma solução de glutaraldeído 3% (V/V) preparada com 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 durante 24 h à temperatura ambiente, 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 conseqüentemente alterar a arquitectura do biofilme.

#### **2.4.7 - Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC)**

O microscópio de interferência diferencial (Nikon Labophot-2) é uma adaptação do microscópio de interferência de Nomarski e encontra-se descrito em Keevil & Walker (1992), sendo especialmente designado para o estudo de biofilmes.

Assim, algumas amostras de biofilme formado nas superfícies de adesão foram observadas neste microscópio na Unidade de Saúde Ambiental, Escola de Ciências Biológicas da Universidade de Southampton, UK.

A preservação e o transporte das amostras foi efectuada pela fixação das placas de adesão com biofilme em placas de Petri de vidro estéreis nas quais se colocou uma gaze estéril e humedecida com água destilada e glicerol estéreis, para manter as condições de hidratação do biofilme até ao momento da sua observação. Depois as placas foram convenientemente seladas.

#### **2.4.8 - Coloração de Gram**

A coloração de Gram é um dos métodos mais importantes na classificação bacteriana, pois permite dividir as bactérias em dois grandes grupos, as Gram positivas e as Gram negativas.

Algumas bactérias quando tratadas com determinados corantes (como o cristal violeta e iodo) e subsequentemente lavadas com um descorante retêm o corante (Gram positivas), outras porém perdem o corante (Gram negativas). Estas últimas podem tornar-se visíveis quando tratadas com um contrastante apropriado. Assim as bactérias Gram positivas tomam a cor violeta conferida pelo corante primário (cristal de violeta) e as Gram negativas coram de vermelho (fucsina básica).

O diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram deve-se ao facto dos dois grupos bacterianos apresentarem uma parede celular química e estruturalmente

distinta. As bactérias Gram positivas de um modo geral não apresentam lípidos e o conteúdo em peptidoglicano é cerca de 50 – 90% do peso total da parede celular seca, enquanto as bactérias Gram negativas apresentam um elevado teor em lípidos e o peptidoglicano constitui somente cerca de 10% do peso da parede celular seca (Ferreira e Sousa, 1998).

Nas bactérias Gram negativas o descorante remove os lípidos da membrana externa da parede celular resultando num aumento da sua permeabilidade. Assim, o complexo violeta de cristal – iodo pode ser extraído do interior das células, ficando as bactérias descoradas. As bactérias Gram positivas pelo contrário quando tratadas com o descorante são desidratadas o que resulta na redução da permeabilidade da parede celular e na retenção do complexo violeta de cristal – iodo (Alcantra *et al.*, 1996).

### **Reagentes**

Solução de oxalato de amónio – cristal violeta: Dissolvem-se 2 g de cristal de violeta (Merck) em 20 mL de álcool etílico 96%. E dissolvem-se 0,8 g de oxalato de amónio (p.a. Riedel-de Haën) em 80 mL de água destilada. Mistura-se as duas soluções em partes iguais e filtra-se por papel.

Solução de lugol: Dissolvem-se 2 g de iodeto de potássio (p. a. Merck) e 1 g de iodo em 300 mL de água destilada.

Solução de safranina 0,25%: Dissolvem-se 2,5 g de safranina T (Riedel-de Haën) em 100 mL de álcool etílico 96%. Antes de usar adiciona-se 10 mL da solução aquosa de safranina a 100 mL da água destilada.

Solução descorante: Misturam-se 50 ml de álcool 96% com 50 mL de acetona (p.a. Merck).

### **Procedimento Experimental**

#### Preparação e Fixação do Esfregaço Bacteriano:

- Colocar as lâminas em álcool a 96%, e antes de as usar inflamá-las à chama;
- Colocar uma gota de água destilada sobre a lâmina e retirar uma ansa de cultura bacteriana em meio sólido e ressuspende-la na gota de água, espalhar a suspensão numa área aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup> e deixar secar ao ar durante 30 a 60 segundos;
- Passar a face inferior da lâmina três vezes à chama para fixar o material celular;
- Identificar a lâmina com a designação da espécie bacteriana utilizada.

Coloração de Gram (modificação de Hucker):

- Corar o esfregaço fixado com uma gota de cristal de violeta durante 60 s, agitando suavemente. Findo este tempo lavar com água corrente, a água deve começar a correr na extremidade da lâmina correndo para cima do fixado;
- Inundar com a solução de lugol durante 60 s e depois lavar novamente com água corrente;
- Descorar com a solução decolorante durante 30 s agitando suavemente e passar novamente por água corrente;
- Corar com a solução de safranina durante 30 s e no fim do tempo lavar com água corrente. Deixar secar e observar ao microscópio óptico com objectiva de imersão.

**2.5 - Métodos de Cálculo****2.5.1 - Contagem de Heterotróficos em Placa (Bactérias Cultiváveis)**

Os resultados da contagem de heterotróficos em placa vêm expressos em UFC/mL ou UFC/cm<sup>2</sup>, consoante se refiram a amostras de água ou de biofilme respectivamente, sendo dados pelas seguintes fórmulas:

$$\text{UFC/mL} = \bar{X} \times \text{factor de diluição} \quad (2.1)$$

$$\text{UFC/cm}^2 = \bar{X} \times \frac{\text{Volume da suspensão de biofilme}}{\text{Área da superfície de adesão}} \times \text{factor de diluição} \quad (2.2)$$

Em que,  $\bar{X}$  representa a média do número de colónias contadas nas placas.

**2.5.2 - Contagem de Bactérias Totais**

O valor do número de bactérias totais vem expressos em Bactérias Totais/mL ou Bactérias Totais/cm<sup>2</sup>, consoante se refiram a amostras de água ou de biofilme respectivamente e é dado pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Bactérias Totais/mL} = \frac{(\bar{X}/S_R) \times S_F \times \text{factor de diluição}}{\text{Volume de Amostra (mL)}} \quad (2.3)$$

$$\text{Bactérias Totais/cm}^2 = \frac{(\bar{X}/S_R) \times S_F \times \text{factor de diluição}}{\text{Volume de Amostra (mL)}} \times \frac{\text{Volume da suspensão de biofilme}}{\text{Área da superfície de adesão}}$$

(2.4)

Em que:  $\bar{X}$  – média do número de bactérias contadas na membrana;

$S_R$  – superfície do retículo contada (a superfície total do retículo é  $3.46E^{-4} \text{ cm}^2$  e cada quadrado tem  $1E^{-6} \text{ cm}^2$  de superfície);

$S_F$  - superfície de filtração da membrana (esta é igual a  $2.27 \text{ cm}^2$ ).

### 2.5.3 - Determinação da Tensão Superficial e da Hidrofobicidade das Células e Superfícies de Adesão a partir da Técnica de Medição de Ângulos de Contacto

A metodologia usada para a determinação das tensões superficiais e hidrofobicidade das células bacterianas e superfícies de adesão é a mesma, sendo neste caso efectuada a partir da técnica experimental de medição de ângulos de contacto.

#### 2.5.3.1 - Determinação da Tensão Superficial

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes

$$(1 + \cos \theta) \times \gamma_1^{\text{TOT}} = 2 \times \left( \sqrt{\gamma_s^{\text{LW}} \times \gamma_1^{\text{LW}}} + \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_s^- \times \gamma_1^+} \right) \quad (2.5)$$

Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula e portanto a equação anterior reduz-se a:

$$\gamma_s^{\text{LW}} = \frac{\gamma_1^{\text{TOT}}}{4} \times (1 + \cos \theta)^2 \quad (2.6)$$

Para se poder determinar as três componentes da tensão superficial é necessário determinar-se o ângulo de contacto formado por três líquidos de polaridades diferentes.

As componentes polares e apolares dos líquidos utilizados encontram-se na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** - Valores das componentes da tensão superficial dos líquidos a 20 °C

Líquido	Tensão superficial (mJ/m <sup>2</sup> )			
	$\gamma_1^{\text{TOT}}$	$\gamma_1^{\text{LW}}$	$\gamma_1^+$	$\gamma_1^-$
água	72,8	21,8	25,5	25,5
$\alpha$ -bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Com os valores dos ângulos de contacto obtidos com formamida ( $\theta_F$ ), água ( $\theta_W$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ ), aplicando a equação 2.5 e com auxílio dos valores da Tabela 2.3 obtêm-se as seguintes equações:

$$\gamma_s^{\text{LW}} = 11,1 \times (1 + \cos \theta_B)^2 \quad (2.7)$$

$$5,049 \times \sqrt{\gamma_s^+} + 5,049 \times \sqrt{\gamma_s^-} = 36,4 \times (1 + \cos \theta_W) - 15,55 \times (1 + \cos \theta_B) \quad (2.8)$$

$$6,293 \times \sqrt{\gamma_s^+} + 1,510 \times \sqrt{\gamma_s^-} = 29 \times (1 + \cos \theta_F) - 20,806 \times (1 + \cos \theta_B) \quad (2.9)$$

Pela resolução em simultâneo destas três últimas equações, obtêm-se as três componentes da tensão superficial,  $\gamma_s^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_s^+$  e  $\gamma_s^-$ . Que permitem calcular a tensão superficial global de uma superfície (s),  $\gamma_s^{\text{TOT}}$ :

$$\gamma_s^{\text{TOT}} = \gamma_s^{\text{LW}} + \gamma_s^{\text{AB}} \quad (2.10)$$

$$\gamma_s^{\text{AB}} = 2 \times \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} \quad (2.11)$$

Nota: Se pela resolução simultânea das equações 2.7, 2.8 e 2.9 se obtiver para  $\sqrt{\gamma_s^+}$  ou  $\sqrt{\gamma_s^-}$  valores negativos então o seu quadrado é zero (van der Mei *et al.*, 1998).

### 2.5.3.2 - Determinação da Hidrofobicidade

Van Oss e Giese (1995) desenvolveram uma metodologia de cálculo que permite quantificar a hidrofobicidade de uma superfície através das componentes da tensão superficial. Tendo também já sido aplicada esta metodologia com sucesso para determinar a hidrofobicidade de superfícies celulares (Azeredo, 1998).

Segundo estes autores, a hidrofobicidade é expressa em termos da energia hidrofóbica de atracção e define o grau de interacção entre as moléculas de um material imerso em água.

De acordo com este critério, a hidrofobicidade é definida em termos da energia livre de interacção entre as moléculas de uma superfície (s) imersa em água (w),  $\Delta G_{sws}^{TOT}$ .

A energia livre global de interacção  $\Delta G_{sws}^{TOT}$  entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) é calculada pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interacção,  $\Delta G_{sws}^{LW}$  e  $\Delta G_{sws}^{AB}$  respectivamente:

$$\Delta G_{sws}^{TOT} = \Delta G_{sws}^{LW} + \Delta G_{sws}^{AB} \quad (2.12)$$

$$\Delta G_{sws}^{LW} = -2 \times \left( \sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 \quad (2.13)$$

$$\Delta G_{sws}^{AB} = -4 \times \left[ \left( \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} \right) + \left( \sqrt{\gamma_w^+ \times \gamma_w^-} \right) - \left( \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_w^-} \right) - \left( \sqrt{\gamma_w^+ \times \gamma_s^-} \right) \right] \quad (2.14)$$

Os valores das componentes da tensão superficial da água encontram-se na Tabela 2.3.

Obtendo-se assim pela resolução destas equações os valores de  $\Delta G_{sws}^{LW}$ ,  $\Delta G_{sws}^{AB}$  e  $\Delta G_{sws}^{TOT}$ , que nos permitem tirar conclusões quanto ao carácter hidrofóbico ou hidrofílico da superfície celular ou da superfície de adesão.

#### 2.5.4 - Determinação da Energia Livre Total de Adesão ( $\Delta G_{adesão}$ )

Fazendo uma abordagem termodinâmica do fenómeno de adesão entre um microrganismo, neste caso uma bactéria, e uma superfície sólida em solução aquosa e admitindo que a barreira de energia imposta pelas interacções repulsivas é ultrapassada, passando as interacções de curto alcance a assumir um papel dominante na interacção total, a variação da energia livre total considera apenas as interacções polares e apolares.

Segundo a teoria termodinâmica a adesão será favorável se a interacção conduzir a uma diminuição da energia livre global que é traduzida pela equação de Dupré:

$$\Delta G_{adesão} = \gamma_{bs} - \gamma_{bl} - \gamma_{sl} \quad (2.15)$$

Em que:  $\gamma_{bs}$  - tensão interfacial bactéria/superfície de adesão;

$\gamma_{bl}$  - tensão interfacial bactéria/líquido;

$\gamma_{sl}$  - tensão interfacial superfície de adesão/líquido.

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial é possível determinar a energia livre total de adesão entre duas superfícies ( $\Delta G_{adesão}$ ). Os valores das componentes das



tensões interfaciais são determinados a partir dos valores determinados ou tabelados em 2.5.3.1, das tensões superficiais das bactérias, das superfícies de adesão e do líquido em que estas duas superfícies se encontram imersas que neste caso considera-se a água, através das seguintes equações definidas para um sistema bifásico de interação (por exemplo bactéria/superfície) pela teoria termodinâmica:

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (2.16)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2 \times \sqrt{\gamma_b^{LW} \times \gamma_s^{LW}} \quad (2.17)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2 \times \left( \sqrt{\gamma_b^+ \times \gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+ \times \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^- \times \gamma_s^+} \right) \quad (2.18)$$

Pela aplicação das equações 2.15, 2.16, 2.17 e 2.18 obtém-se o valor da energia livre total de adesão  $\Delta G_{adesão}$ , que permite fazer uma avaliação termodinâmica do fenómeno de adesão.

A equação 2.15 também pode ser apresentada da seguinte forma, uma vez que a energia livre de coesão está directamente relacionada com a tensão superficial:

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (2.19)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (2.20)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (2.21)$$

### 2.5.5 - Tratamento Estatístico dos Resultados

Alguns dos resultados obtidos ao longo deste trabalho experimental foram analisados estatisticamente usando o modelo estatístico “two-way ANOVA” do programa SPSS 10.0 para o Windows, por forma a fazer comparações entre as diferentes variáveis em estudo. Foi também usado o modelo estatístico “one-way ANOVA” do mesmo programa (Pallant, 2001).

## Capítulo 3 – Cinéticas de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo

Neste capítulo são apresentados os resultados dos ensaios de formação de biofilme em superfícies em contacto com água potável, obtidos no sistema de células de fluxo descrito no capítulo anterior. Estes ensaios permitem estudar a influência de diferentes factores como o tipo de material da superfície em contacto com a água potável, o regime de escoamento hidráulico e a quantidade de matéria orgânica biodegradável (nutrientes), na formação de biofilme. Para tal, efectuaram-se amostragens periódicas do biofilme, do efluente dos tanques de recirculação e da água do tanque de mistura para cada ensaio. Estas amostras foram analisadas em termos do seu conteúdo microbiano pela contagem de heterotróficos em placa (bactérias cultiváveis) e bactérias totais (DAPI) por microscopia de epifluorescência. Foram também monitorizados, ao longo do tempo e para cada ensaio, o pH, a temperatura e a concentração de cloro livre, uma vez que são parâmetros que influenciam a população bacteriana. A quantificação de bactérias cultiváveis foi efectuada em dois meios de cultura diferentes, com o objectivo de estudar o efeito do meio de cultura na contagem de heterotróficos em placa. Foram também utilizados vários tipos de microscopia para observar o biofilme formado nas placas de adesão e verificar a influência dos diferentes factores na arquitectura do biofilme.

### 3.1 Ensaios de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo

### 3.2 Comparação de Diferentes Parâmetros na Formação de Biofilme

### 3.3 Efeito do Meio de Cultura na Quantificação das Bactérias Cultiváveis

### 3.4 Visualizações Microscópicas de Biofilme de Água Potável

### 3.5 Conclusões

### 3.1 - Ensaio de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo

Com o intuito de estudar a cinética de formação de biofilmes em sistemas de distribuição de água potável e o modo como o tipo de material das condutas, o regime de escoamento hidráulico e a quantidade de matéria orgânica biodegradável (nutrientes) podem afectar o processo, foram realizados diversos ensaios de formação de biofilme testando em simultâneo duas superfícies de adesão, aço 316 e PVC, e efectuando os ensaios em regime turbulento e laminar. Estes ensaios foram realizados com e sem a adição de nutrientes à água. Os diferentes tipos de ensaios de formação de biofilme (Tipo A a D) (Tabela 3.1) foram obtidos no sistema de células de fluxo descrito no Capítulo 2 entre Setembro de 2001 e Julho de 2002.

**Tabela 3.1** - Condições experimentais dos ensaios de formação de biofilme realizados

Condições Experimentais		Ensaio	
Regime Turbulento	Com Nutrientes	Aço 316	<b>Tipo A<sub>0</sub></b>
		PVC	<b>Tipo A<sub>1</sub></b>
	Sem Nutrientes	Aço 316	<b>Tipo A<sub>2</sub></b>
		PVC	<b>Tipo B<sub>1</sub></b>
Regime Laminar	Com Nutrientes	Aço 316	<b>Tipo B<sub>2</sub></b>
		PVC	<b>Tipo C</b>
	Sem Nutrientes	Aço 316	<b>Tipo D</b>
		PVC	

Durante o tempo em que decorreu cada ensaio efectuou-se uma recolha periódica de amostras de água do tanque de mistura, do biofilme e do efluente do tanque de recirculação.

As várias amostras recolhidas foram analisadas em termos do seu conteúdo bacteriano pela contagem de bactérias cultiváveis em dois meios de cultura diferentes (R<sub>2</sub>A e TSA) e pela contagem de bactérias totais (DAPI) por observação ao microscópio de epifluorescência. Foram também monitorizados para cada ensaio o pH e a temperatura no tanque de mistura e de recirculação.

Para verificar a eficiência do sistema de preparação de água na remoção de cloro livre e garantir a sua ausência no tanque de mistura que alimenta o sistema de células de fluxo mediu-se periodicamente a concentração de cloro livre à entrada (água da rede) e saída (água do tanque de mistura) do sistema de preparação de água ao longo do período em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme.

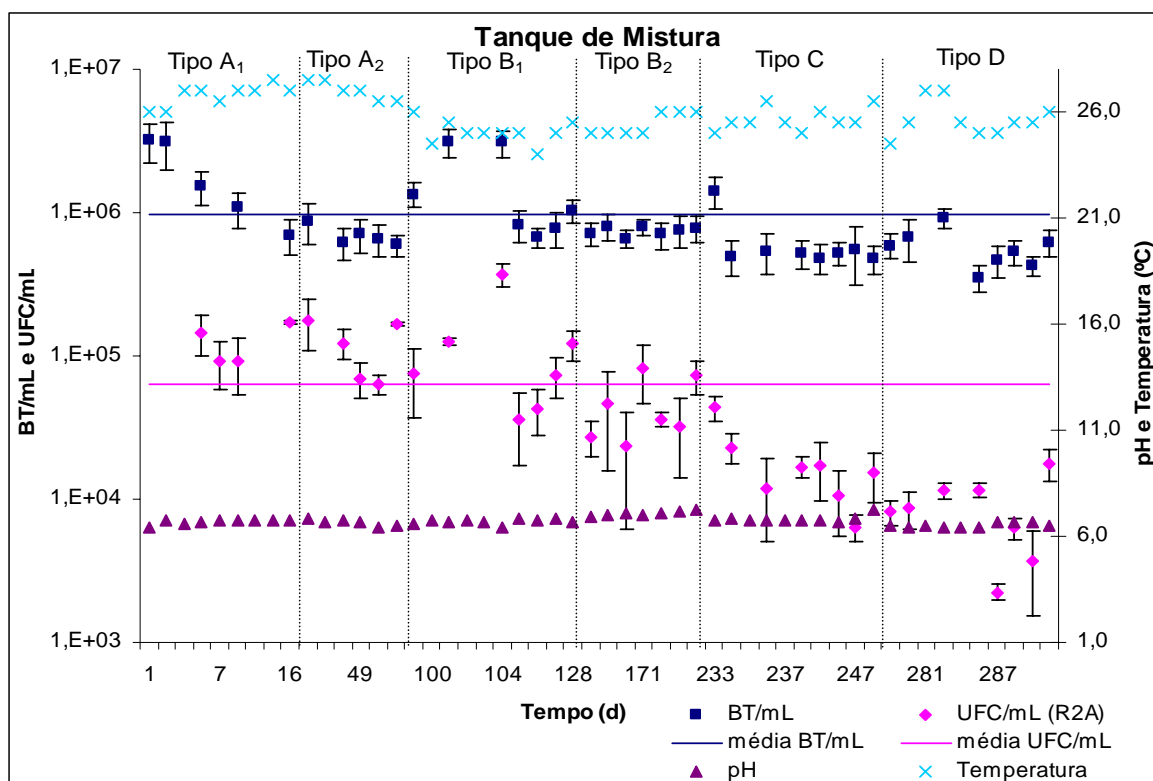
### **3.1.1 - Qualidade da Água Potável da Rede Pública e da Água do Tanque de Mistura**

A água potável proveniente do sistema de distribuição de água da rede pública de Braga no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Engenharia Biológica, é a matéria-prima utilizada ao longo do trabalho elaborado nesta dissertação e usada para a formação de biofilmes. Esta possui uma concentração bacteriana média de  $2,91 \times 10^2 \pm 2,25 \times 10^2$  UFC/mL quando inoculada no meio de cultura R<sub>2</sub>A e uma concentração média de cloro livre de  $0,68 \pm 0,04$  mg Cl/L.

Como já foi anteriormente referido, a água potável, antes de ser alimentada ao sistema de células de fluxo onde se desenvolvem os biofilmes, foi submetida a uma preparação que teve como principal objectivo a remoção de cloro livre presente na água da rede, de modo a possibilitar o crescimento das bactérias da água que posteriormente serão responsáveis pela formação de biofilme.

Após a remoção de cloro, a água contida no tanque de mistura contém a comunidade bacteriana responsável pela formação de biofilme nas superfícies de adesão em estudo e apresenta uma concentração média de cloro livre de  $0,06 \pm 0,02$  mg Cl/L. Assim, pode-se concluir que o sistema de preparação de água potável é eficiente na remoção de cloro uma vez que se obtém uma eficiência média de remoção de cloro livre da água potável de  $91,13 \pm 2,39\%$ .

Na Figura 3.1 pode-se observar a variação do pH, da temperatura e da concentração bacteriana, expressa em termos do número de bactérias cultiváveis no meio de cultura R<sub>2</sub>A (UFC/mL) e bactérias totais (BT/mL) e respectivas concentrações médias, na água do tanque de mistura ao longo dos 307 d que alimentou o sistema de células de fluxo a um caudal constante de 0,02 L/h e permitiu a realização dos diferentes tipos de ensaios de formação de biofilme de água potável.



**Figura 3.1** - Variação da concentração de bactérias totais e cultiváveis, expressa em BT/mL e UFC/mL, respectivas concentrações médias, do pH e da temperatura da água do tanque de mistura durante o tempo em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme.

Pela análise da Figura 3.1 verifica-se um decréscimo da concentração de bactérias ao longo do tempo, sendo este mais acentuado para as bactérias cultiváveis. Pelo contrário, o pH mantém-se aproximadamente constante ao longo do tempo apresentando apenas ligeiras flutuações. As variações, quer do número de bactérias da água, quer do pH, podem estar associadas, possivelmente, às variações de qualidade da água da rede pública no ponto de recolha. Verifica-se, também, que os valores da temperatura da água não são constantes ao longo do tempo. Isto pode ser explicado pelo facto do tanque de mistura não ter qualquer sistema de controlo da temperatura, pelo que a temperatura da água está sujeita às variações da temperatura ambiente do laboratório no período de Setembro de 2001 a Julho de 2002.

Na Tabela 3.2 são apresentados os valores médios dos vários parâmetros monitorizados na água do tanque de mistura para os vários ensaios de formação de biofilme realizados.

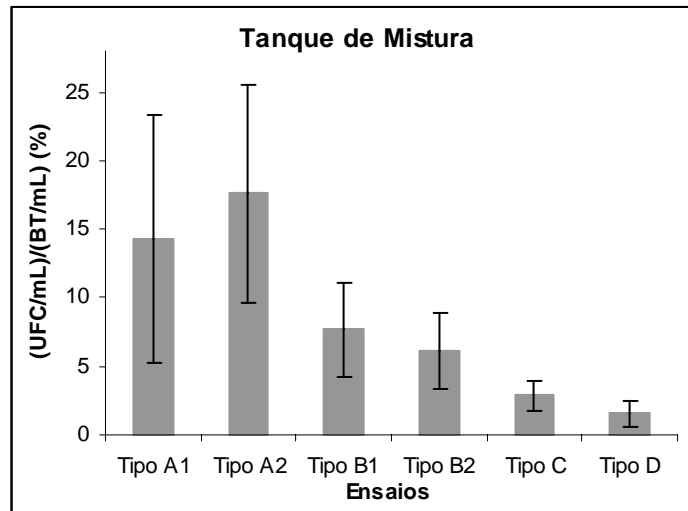
**Tabela 3.2** - Valores médios de BT/mL, UFC/mL (R<sub>2</sub>A), pH e temperatura (°C) na água do tanque de mistura para os vários ensaios de formação de biofilme realizados

Ensaio	BT/mL	UFC/mL	pH	Temperatura (°C)
<b>Tipo A<sub>1</sub></b>	$1,92 \times 10^6 \pm 6,01 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5 \pm 3,11 \times 10^4$	$6,68 \pm 0,12$	$26,78 \pm 0,51$
<b>Tipo A<sub>2</sub></b>	$6,90 \times 10^5 \pm 1,78 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5 \pm 2,69 \times 10^4$	$6,63 \pm 0,15$	$27,00 \pm 0,45$
<b>Tipo B<sub>1</sub></b>	$1,54 \times 10^6 \pm 3,26 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5 \pm 2,79 \times 10^4$	$6,69 \pm 0,13$	$25,05 \pm 0,55$
<b>Tipo B<sub>2</sub></b>	$7,43 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^5$	$4,59 \times 10^4 \pm 1,89 \times 10^4$	$7,06 \pm 0,10$	$25,43 \pm 0,53$
<b>Tipo C</b>	$6,24 \times 10^5 \pm 1,66 \times 10^5$	$1,81 \times 10^4 \pm 5,50 \times 10^3$	$6,81 \pm 0,17$	$25,65 \pm 0,53$
<b>Tipo D</b>	$5,72 \times 10^5 \pm 1,21 \times 10^5$	$8,74 \times 10^3 \pm 1,86 \times 10^3$	$6,51 \pm 0,10$	$25,65 \pm 0,82$

Ao longo dos 307 dias de funcionamento do tanque de mistura a concentração de bactérias totais (BT/mL) variou entre  $3,54 \times 10^5$  e  $3,11 \times 10^6$  apresentando um valor médio de  $9,65 \times 10^5 \pm 2,36 \times 10^5$ . Por sua vez, a concentração de bactérias cultiváveis (UFC/mL) no meio de cultura R<sub>2</sub>A variou entre  $2,25 \times 10^3$  e  $3,68 \times 10^5$  com valor médio de  $6,36 \times 10^4 \pm 1,65 \times 10^4$ . O pH e a temperatura neste tanque oscilaram entre 6,40 e 7,25 e 24 e 27,5°C, obtendo-se valores médios de  $6,72 \pm 0,21$  e  $25,86 \pm 0,89$ °C durante o período em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme.

Analisando os valores médios da concentração de bactérias cultiváveis na água potável da rede pública ( $2,91 \times 10^2 \pm 2,25 \times 10^2$  UFC/mL) e na água do tanque de mistura ( $6,36 \times 10^4 \pm 1,65 \times 10^4$  UFC/mL) verifica-se que a passagem da água potável através do sistema de preparação de água possibilitou um aumento médio do número de bactérias cultiváveis na água de  $99,54 \pm 0,35$  %. Este aumento foi conseguido porque a remoção de cloro no 1º filtro de carvão activado granular (C<sub>1</sub>) permite o crescimento bacteriano no 2º filtro (C<sub>2</sub>), funcionando este como um filtro de carvão activado granular biológico, que fornece um inóculo bacteriano contínuo ao tanque de mistura, pela libertação de bactérias crescidas na superfície do carvão. Este facto comprova o papel importante da concentração residual de cloro livre na água potável para impedir o crescimento bacteriano.

Pela Figura 3.1 e Tabela 3.2 verificou-se que o decréscimo, ao longo do tempo, da concentração de bactérias cultiváveis em R<sub>2</sub>A é superior ao das bactérias totais, o que indica que pode verificar-se uma diminuição da culturabilidade das bactérias da água ao longo do tempo. Na Figura 3.2 pode-se observar os valores médios da culturabilidade das bactérias da água do tanque de mistura no meio de cultura R<sub>2</sub>A para os diversos ensaios de formação de biofilme.



**Figura 3.2** - Variação da percentagem média de bactérias cultiváveis (em R<sub>2</sub>A), expressa em (UFC/mL)/(BT/mL) (%), na água do tanque de mistura para os ensaios de formação de biofilme realizados.

Esta figura demonstra claramente uma diminuição da culturabilidade das bactérias ao longo do tempo na água do tanque de mistura para os vários ensaios de formação de biofilme. A percentagem média global de bactérias cultiváveis em R<sub>2</sub>A durante os 307 d é de 6,91%, ou seja, só uma pequena percentagem do total das bactérias presentes na água do tanque de mistura são capazes de crescer num dos meios de cultura mais usado para a contagem de bactérias em amostras de água potável.

Pela análise dos valores apresentados e por aplicação do teste estatístico “one-way ANOVA”, conclui-se que a concentração de bactérias totais e cultiváveis na água do tanque de mistura não é constante ao longo do tempo ( $P < 0,001$ ). Pode-se ainda concluir, por aplicação do mesmo teste estatístico aos valores do pH e da temperatura da água do tanque de mistura, que estes também não são constantes ao longo do tempo em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme ( $P < 0,001$ ). Assim, a variação da qualidade da água do tanque de mistura que alimenta o sistema de células de fluxo pode ser um factor a considerar aquando do estudo da influência dos diferentes factores nas cinéticas de formação de biofilme.

### 3.1.2 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Células de Fluxo

Os sistemas de fluxo foram desenvolvidos para permitir o estudo e a monitorização contínua da formação de biofilmes em condições laboratoriais e industriais (Pereira *et al.*, 2002b).

As células de fluxo são reactores muito versáteis que operam em posição vertical com recirculação em contínuo, e permitem o estudo da formação de biofilmes sob diferentes condições ambientais (temperatura, pH, concentração de matéria orgânica), hidrodinâmicas, utilizando uma grande variedade de superfícies de adesão. A característica mais importante deste tipo de reactores é permitir o acompanhamento da formação do biofilme nas placas de adesão e a sua amostragem periódica, permitindo, posteriormente, a realização de uma variedade de técnicas de análise do biofilme.

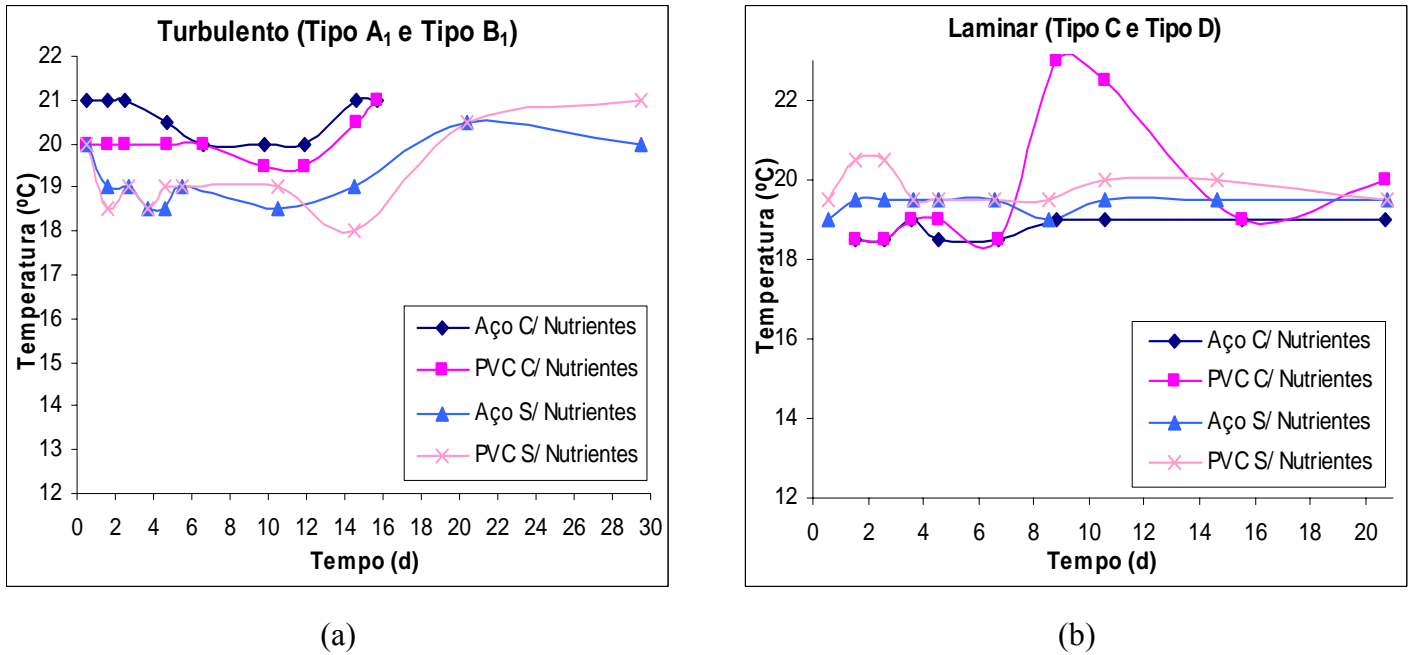
No estudo realizado nesta tese, o biofilme é formado sobre superfícies de adesão de aço e PVC, pela recirculação de água, continuamente obtida do tanque de mistura, no interior do sistema de células de fluxo. O sistema usado é constituído por duas células de fluxo colocadas na posição vertical e em paralelo ligadas cada uma através de uma bomba centrífuga a um tanque de recirculação. Este sistema permite variar a velocidade da água por variação do caudal de recirculação, sem variar o tempo de residência desta nas células de fluxo.

Para cada ensaio efectuado, o sistema de células de fluxo foi cheio com água do tanque de mistura e operou em modo descontínuo durante cerca de 13 h. Findo este tempo passou a operar de modo contínuo pela entrada de água proveniente do tanque de mistura e em alguns dos ensaios (A e C) dos meios de cultura líquidos ricos em nutrientes. Cada ensaio de formação de biofilme teve a duração média de 14 d, tempo necessário para o biofilme atingir o estado estacionário. A adição de nutrientes à água efectuada em alguns dos ensaios, pretende simular o conteúdo em matéria orgânica biodegradável que normalmente se encontra presente na água potável que circula nas redes de distribuição e que neste caso tinha sido removido no sistema de preparação de água (Morin *et al.*, 1996; Morin e Camper, 1997).

A formação de biofilme no sistema de células de fluxo ocorreu à temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  para todos os ensaios realizados. Este valor da temperatura foi seleccionado por ser a temperatura normalmente encontrada nos sistemas de distribuição de água potável da rede pública em Portugal (Chaves, 1999), sendo também, neste caso, o valor aproximado da



temperatura da água no ponto de recolha. Isto foi possível no sistema células de fluxo, com colocação de uma camisa de arrefecimento nos tanques de recirculação, que permitiu manter o sistema a uma temperatura aproximadamente constante através da recirculação de água proveniente de um sistema de refrigeração externa. Na Figura 3.3 pode-se observar a variação da temperatura ao longo do tempo no sistema de células de fluxo para os vários ensaios de formação de biofilme, e na Tabela 3.2 os valores médios da temperatura nas células de fluxo para estes ensaios.



**Figura 3.3** - Variação da temperatura (°C) nos sistemas de células de fluxo ao longo do tempo, para os vários ensaios de formação de biofilme. (a) Ensaio Tipo A<sub>1</sub> e Tipo B<sub>1</sub>; (b) Ensaio Tipo C e Tipo D.

**Tabela 3.3** - Valores médios da temperatura (°C) no sistema de células de fluxo, para os vários ensaios de formação de biofilme

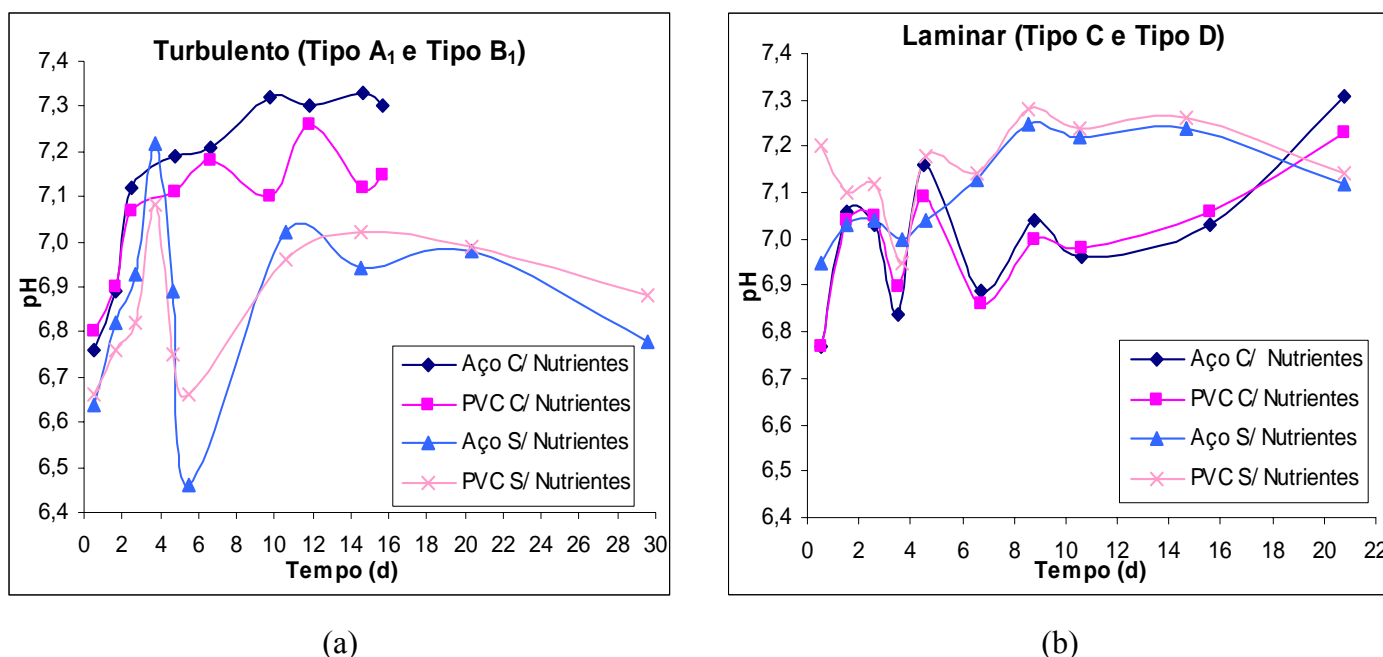
Ensaio	Tipo A <sub>1</sub>	Tipo B <sub>1</sub>	Tipo C	Tipo D
Aço	20,6 ± 0,5	19,2 ± 0,7	18,8 ± 0,3	19,4 ± 0,2
PVC	20,1 ± 0,5	19,3 ± 1,0	19,8 ± 1,8	19,8 ± 0,4

Pela observação da Figura 3.3 (a) verifica-se que a temperatura no sistema de células de fluxo (aço/PVC) permaneceu aproximadamente constante ao longo do tempo, para ambos os ensaios. No entanto, para o ensaio sem nutrientes (Tipo B<sub>1</sub>) verificaram-se temperaturas ligeiramente inferiores às obtidas no ensaio com nutrientes e uma maior variação dos valores da temperatura, como se verifica pelos valores apresentados na Tabela 3.3 referentes a estes ensaios. Observando a Figura 3.3 (b) e os valores da Tabela 3.3 verifica-se que a temperatura

nos sistema de células de fluxo (aço/PVC) para o ensaio sem nutrientes (Tipo D) permaneceu constante,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . O mesmo se verificou na células de fluxo de aço para o ensaio com nutrientes (Tipo C). Pelo contrário para este ensaio na célula de fluxo de PVC entre os dias sete e treze verificaram-se temperaturas consideravelmente mais elevadas do que era esperado, devido a um problema na tubagem do sistema de refrigeração desta célula.

Assim, pode-se concluir que, de um modo geral, o sistema de refrigeração foi eficiente no controlo da temperatura do sistema de células de fluxo, permitindo manter a temperatura a um valor aproximadamente constante para os diferentes tipos de ensaios realizados.

Ao contrário da temperatura, o pH da água não sofreu qualquer ajuste durante o desenvolvimento do biofilme nos sistemas de células de fluxo. Pode-se observar a sua variação ao longo do tempo na Figura 3.4, para os vários ensaios de formação de biofilme. Na Tabela 3.4 são apresentados os valores médios do pH nas células de fluxo para estes ensaios.



**Figura 3.4** - Variação do pH nos sistemas de células de fluxo ao longo do tempo para os diferentes ensaios de formação de biofilme. (a) Ensaio Tipo A<sub>1</sub> e Tipo B<sub>1</sub>; (b) Ensaio Tipo C e Tipo D.

**Tabela 3.4** - Valores médios do pH no sistema de células de fluxo, para os vários ensaios de formação de biofilme

Ensaio	Tipo A <sub>1</sub>	Tipo B <sub>1</sub>	Tipo C	Tipo D
Aço	$7,16 \pm 0,20$	$6,87 \pm 0,21$	$7,01 \pm 0,16$	$7,10 \pm 0,11$
PVC	$7,08 \pm 0,14$	$6,86 \pm 0,15$	$7,00 \pm 0,13$	$7,16 \pm 0,10$

Pela análise da Figura 3.4 (a) e (b) verifica-se que o pH no sistema de células de fluxo não permanece constante ao longo do tempo, para os quatro tipos de ensaios realizados e para as células de fluxo de aço e PVC. Completando esta análise com os valores da Tabela 3.4 verifica-se que o pH dos efluentes das células de fluxo de aço são ligeiramente superiores ao pH do efluente das células de fluxo de PVC para todos ensaios, excepto para o ensaio laminar sem nutrientes (Tipo D). No entanto, as diferenças não são muito significativas. Verifica-se, ainda, que em regime turbulento o pH é maior no ensaio com nutrientes (Tipo A<sub>1</sub>) e pelo contrário em regime laminar é o ensaio sem nutrientes (Tipo D) que apresenta um maior pH no efluente das células de fluxo.

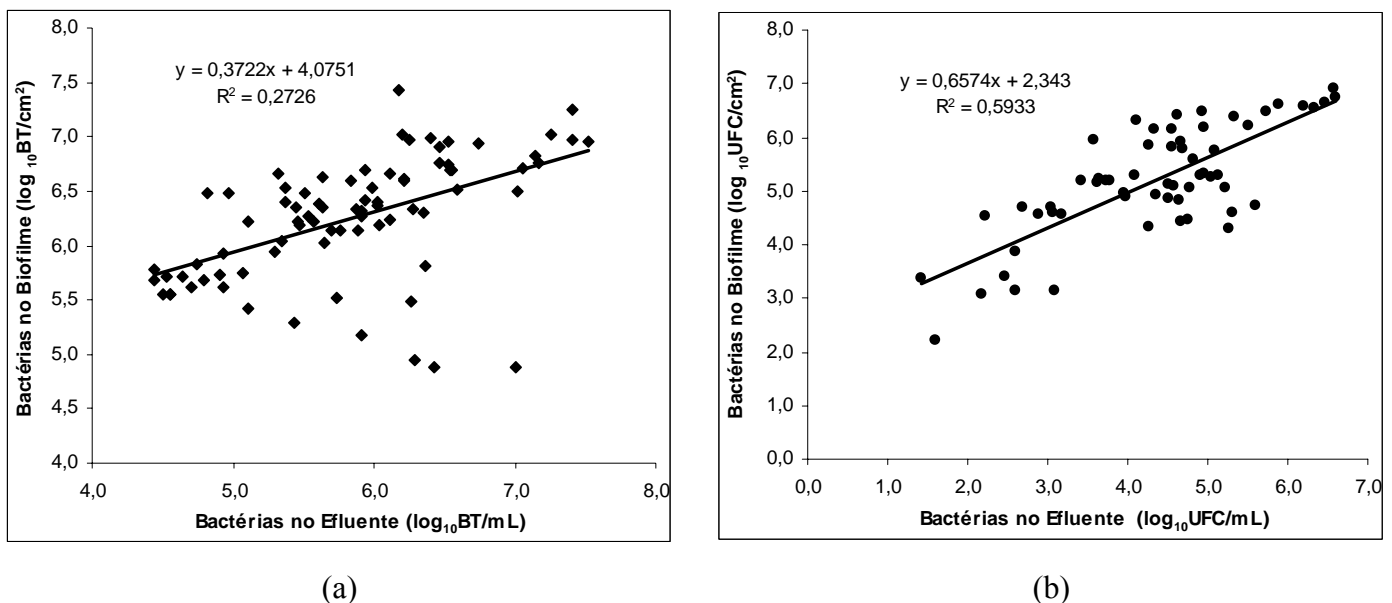
Comparando os valores da Tabela 3.4 com os apresentados na Tabela 3.2 (pH médio da água do tanque de mistura para os ensaios em causa) constata-se que, para todos os ensaios de formação de biofilme, o pH à saída das células de fluxo (no sistema de células de fluxo) é maior do que à entrada das mesmas (na água do tanque de mistura). Pode-se ainda verificar que os ensaios Tipo A<sub>1</sub> e D (aqueles que têm maiores valores de pH médio à saída das células de fluxo) são os que apresentam menores valores médios de pH à entrada destas. Isto poderá indicar possivelmente que a actividade metabólica das bactérias do biofilme altera o pH da água no seio do líquido.

Assim, conclui-se desta análise, que a presença de biofilme nas condutas da rede de distribuição de água potável poderá possivelmente aumentar o pH da água que nelas circula; não se verificam diferenças significativas nos valores do pH da água para o biofilme formado sobre as diferentes superfícies de adesão em estudo e este estudo não permite tirar grandes conclusões quanto à influência do tipo de regime de escoamento e presença de nutrientes no pH da água que circula nas condutas de distribuição.

Segundo o estudo efectuado por Kerr *et al.* (1999) para a formação de biofilmes em diferentes tipos de materiais em contacto com água potável, durante a fase de formação de biofilme existe sempre uma correlação positiva muito elevada entre o número de bactérias heterotróficas do biofilme e o número de bactérias heterotróficas no seio do líquido, independentemente do tipo de material que suporta o biofilme, da temperatura e da concentração de cloro residual da água. Estes resultados indicam que as bactérias do biofilme são continuamente libertadas deste para o seio do líquido, resultando nos sistemas de distribuição de água potável numa deterioração da qualidade microbiológica da água como consequência da formação de biofilme nas condutas, tendo isto sido já vastamente constatado por outros autores (LeChevallier *et al.*, 1987; Haudidier *et al.*, 1988; Van der Wende *et al.*,

1989; Camper *et al.*, 1996). No entanto, num estudo mais recente Ollos *et al.* (1997) verificaram uma baixa correlação entre o número de bactérias aderidas e o número de bactérias no seio do líquido, sugerindo que a contagem de heterotróficos no biofilme não pode ser representada com confiança em função da contagem de heterotróficos em suspensão. Por outro lado, Boe-Hansen *et al.* (2002) referem que o número de bactérias na fase planctónica não se deve apenas às bactérias que são libertadas do biofilme, mas também ao significativo crescimento das bactérias no seio do líquido, que também tem que ser considerado.

Com objectivo de verificar se esta relação é ou não verificada pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar na Figura 3.5 a relação entre a concentração de bactérias no biofilme e no efluente das células de fluxo, expressa em termos de bactérias totais e cultiváveis em R<sub>2</sub>A e os respectivos coeficientes de correlação, para todas as condições experimentais testadas.



**Figura 3.5** - Relação entre o número de bactérias presente no biofilme e no efluente dos sistemas de células de fluxo, onde cresce o biofilme sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para todos os ensaios realizados. (a) Bactérias Totais; (b) Bactérias cultiváveis em R<sub>2</sub>A.

Pela análise da Figura 3.5 verifica-se que a concentração de bactérias no seio do líquido expressa em termos da contagem de bactérias totais fornece uma fraca indicação do estado de acumulação de bactérias no biofilme, apresentando um coeficiente de correlação  $R^2=0,27$ , enquanto que para a contagem de heterotróficos no meio de cultura R<sub>2</sub>A obteve-se um coeficiente de correlação ligeiramente melhor  $R^2=0,59$  ( $P<0,05$ ). Verifica-se ainda que o declive obtido para a relação do número de bactérias heterotróficas crescidas em R<sub>2</sub>A é maior

do que para a relação do número de bactérias totais. Isto indica uma maior culturabilidade das bactérias no biofilme do que no seio do líquido, o que pode ser explicado pela capacidade dos biofilmes constituírem ambientes mais favoráveis para a sobrevivência das bactérias, uma vez que estas nos biofilmes se encontram mais protegidas de agressões físicas e químicas externas.

Pelos resultados obtidos verifica-se que se pode estabelecer uma correlação positiva entre o número de bactérias presentes no biofilme e no efluente das células de fluxo, mas os coeficientes de correlação são muito baixos, pelo que não nos permitem estabelecer uma relação absolutamente fiável entre estas duas variáveis, estando estes resultados de acordo com os obtidos por Ollos *et al.* (1997). Possivelmente, os baixos valores obtidos para os coeficientes de correlação podem ser explicados pelas diferentes condições testadas no sistema, que podem influenciar a relação de equilíbrio que existe entre as bactérias planctónicas e as aderidas.

Assim, pode-se concluir pelos resultados obtidos que a possibilidade de utilizar o número de bactérias heterotróficas na fase planctónica como indicação do nível de desenvolvimento do biofilme nas superfícies das tubagens de rede de distribuição não é tão seguro como o anteriormente constatado por alguns autores.

Na tabela seguinte apresentam-se os valores médios da concentração de bactérias nos efluentes das células de fluxo de aço e PVC, para os vários ensaios de formação de biofilme.

**Tabela 3.5** - Valores médios de BT/mL e UFC/mL ( $R_2A$ ) no efluente das células de fluxo de aço e PVC, para alguns dos ensaios de formação de biofilme realizados

Ensaio	BT/mL		UFC/mL	
	Aço	PVC	Aço	PVC
<b>Tipo A<sub>1</sub></b>	$8,94 \times 10^6 \pm 2,17 \times 10^6$	$5,72 \times 10^6 \pm 1,31 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6 \pm 1,26 \times 10^6$	$3,34 \times 10^6 \pm 5,05 \times 10^5$
<b>Tipo B<sub>1</sub></b>	$2,61 \times 10^6 \pm 6,06 \times 10^5$	$2,70 \times 10^6 \pm 6,46 \times 10^5$	$1,16 \times 10^5 \pm 4,29 \times 10^4$	$1,96 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^5$
<b>Tipo C</b>	$2,83 \times 10^6 \pm 7,19 \times 10^5$	$2,78 \times 10^6 \pm 7,11 \times 10^5$	$1,19 \times 10^6 \pm 6,87 \times 10^5$	$1,66 \times 10^6 \pm 5,92 \times 10^5$
<b>Tipo D</b>	$9,68 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^5$	$8,96 \times 10^5 \pm 1,56 \times 10^5$	$6,42 \times 10^4 \pm 1,89 \times 10^4$	$1,52 \times 10^5 \pm 1,07 \times 10^4$

Comparando os valores médios apresentados na Tabela 3.5 com os apresentados na Tabela 3.2 referentes à concentração de bactérias, expressa em termos de BT/mL e UFC/mL, para a água à entrada do sistema de células de fluxo, para os ensaios de formação de biofilme correspondentes, verifica-se que a concentração bacteriana à saída do sistema de células de

fluxo de aço e PVC é sempre consideravelmente superior à verificada na água do tanque de mistura que alimenta as células de fluxo. Deste modo pode-se concluir que, uma vez que o tempo de residência da água nas células de fluxo (2 h) foi seleccionado de modo a que fosse minimizado o crescimento de bactérias no seio do líquido (Morin e Camper, 1997), o acréscimo dos valores da quantificação bacteriana obtida nos efluentes das células de fluxo reflectem, possivelmente, as células que se desprenderam da superfície.

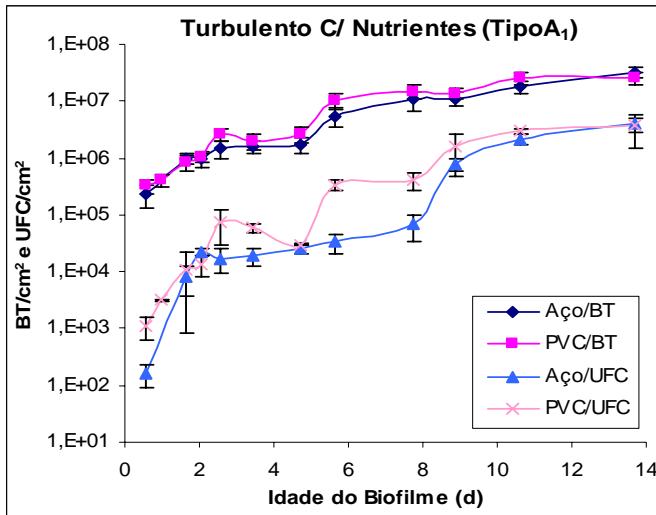
Pela observação da Tabela 3.5 verifica-se ainda que, independentemente do tipo de material em estudo, a concentração média de bactérias totais e cultiváveis em R<sub>2</sub>A, no efluente das células de fluxo apresenta a seguinte ordem decrescente de concentrações para os vários ensaios: Tipo A<sub>1</sub>, Tipo C, Tipo B<sub>1</sub> e Tipo D. Deste modo conclui-se que a concentração média de bactérias nos efluentes das células de fluxo é maior nos ensaios com nutrientes do que sem nutrientes, e é maior em regime turbulento do que em regime laminar.

## **3.2 - Comparação de Diferentes Parâmetros na Formação de Biofilme**

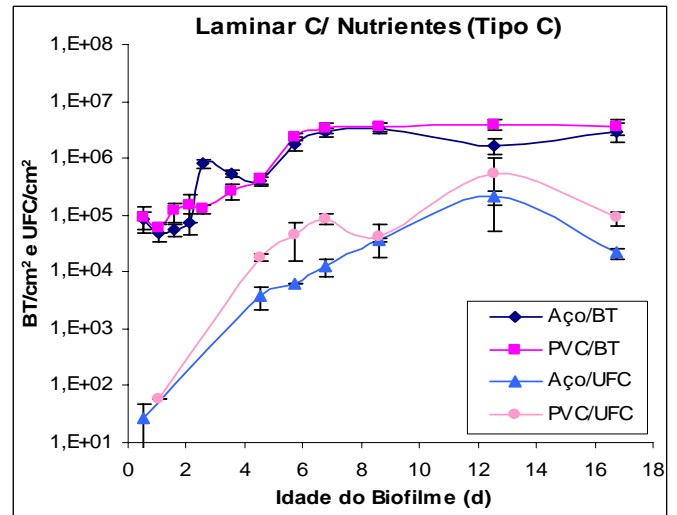
### **3.2.1 - Acumulação de Biofilme em Células de Fluxo**

Como já foi referido anteriormente, efectuaram-se vários tipos de ensaios de formação de biofilme em superfícies em contacto com a água potável, com o objectivo de estudar a influência de factores como o tipo de material das condutas, o regime de escoamento hidráulico e a concentração de matéria orgânica biodegradável (nutrientes) na formação de biofilme em redes de distribuição de água potável. Uma vez que se verificou que as características da água do tanque de mistura que alimenta o sistema de células de fluxo não são constantes ao longo do tempo, à semelhança do que também acontece nas redes de distribuição (Chaves, 1999), a variação da qualidade da água que entra no sistema poderá ser outro factor que pode influenciar a formação de biofilme.

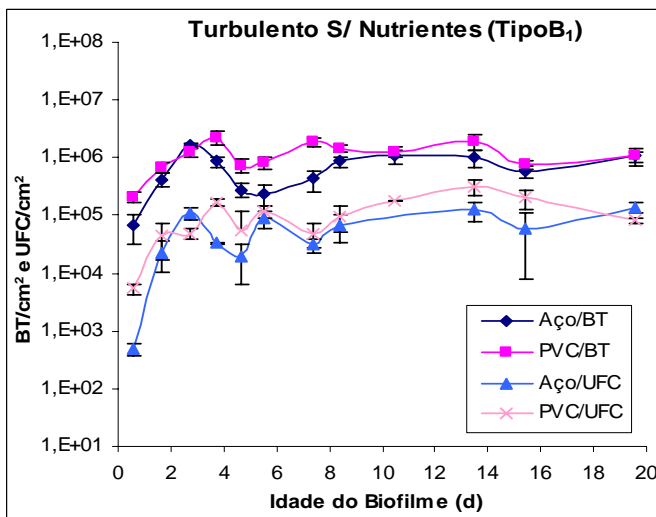
Os resultados da acumulação de biofilme, expressa em termos de bactérias totais (BT/cm<sup>2</sup>) e bactérias cultiváveis em R<sub>2</sub>A (UFC/cm<sup>2</sup>), sobre estas superfícies de adesão encontram-se representados na Figura 3.6.



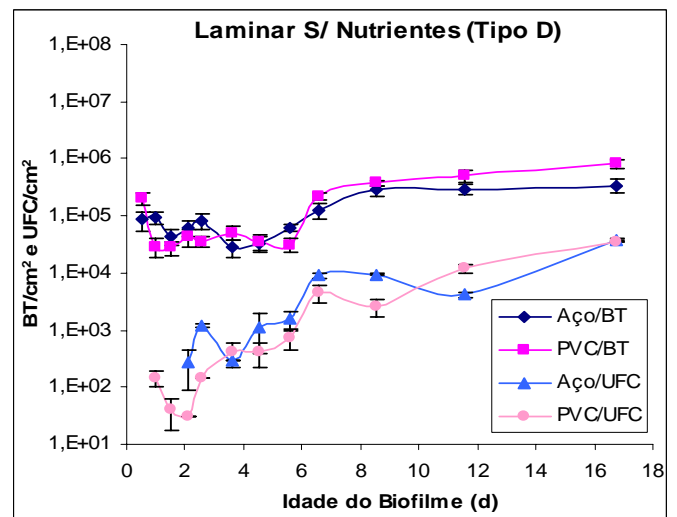
(a)



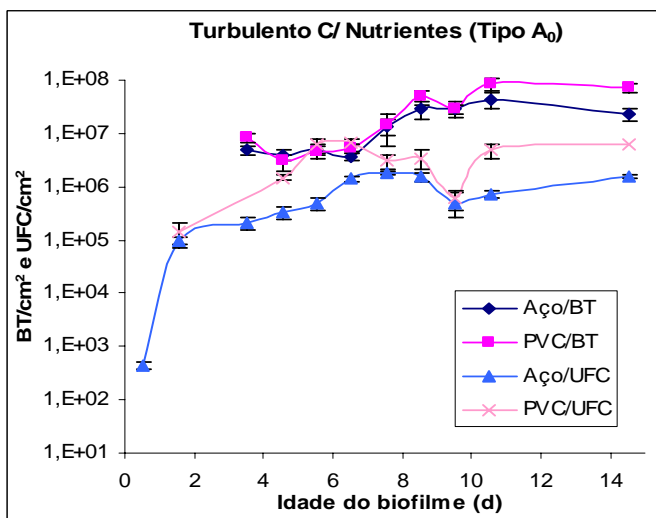
(c)



(b)



(d)



(e)

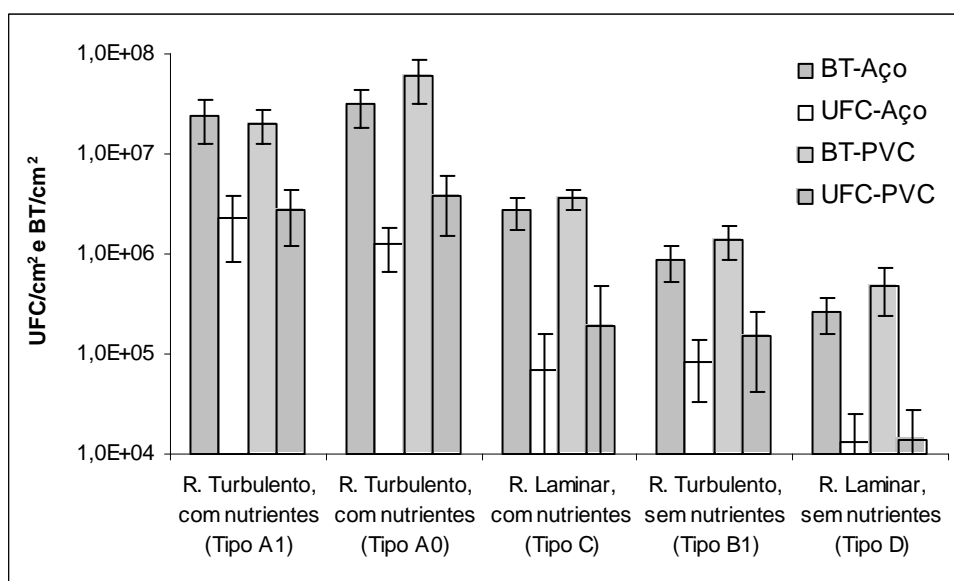
**Figura 3.6** - Variação da concentração de bactérias, expressa em termos de bactérias totais ( $BT/cm^2$ ) e bactérias cultiváveis em  $R_2A$  ( $UFC/cm^2$ ), para a acumulação de biofilme ao longo do tempo sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para os diferentes tipos ensaios de formação de biofilme realizados, (a) Tipo  $A_1$ ; (b) Tipo  $B_1$ ; (c) Tipo C; (d) Tipo D e (e) Tipo  $A_0$ .

Pela análise desta figura verifica-se que a concentração de bactérias acumuladas nas superfícies de adesão de aço e PVC aumenta ao longo do tempo de forma exponencial, atingindo o estado estacionário entre os 8 e 12 d de acumulação de biofilme, dependendo do tipo de ensaio de formação de biofilme. O tempo que os biofilmes demoram para atingir o estado estacionário depende de muitos factores. Neste caso, a eliminação do cloro da água e o fornecimento de um inóculo biológico contínuo pelas colunas de carvão activado são factores determinantes para permitir que um estado quase-estacionário seja rapidamente atingido em 6–8 dias, ao contrário do observado por outros autores que obtiveram estados estacionários por volta dos 100 dias (Holden *et al.*, 1995), 4 meses (Pedersen, 1990), e 11-16 dias (Kerr *et al.*, 1999). Pode-se ainda verificar, pela análise desta figura, que a variação ao longo do tempo do número de bactérias cultiváveis é maior do que a variação do número de bactérias totais, ou seja, os valores obtidos para o número de bactérias totais nos primeiros dias de formação de biofilme são muito próximos dos obtidos em estado quase-estacionário, enquanto que para as bactérias cultiváveis se verificou um aumento lento com o tempo. Assim, em estado estacionário o número de bactérias totais varia de  $10^5$  a  $10^7$  BT/cm<sup>2</sup>, enquanto que o número de bactérias cultiváveis varia de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, dependendo das condições em estudo.

Ao contrário dos resultados obtidos quando se comparam diferentes tipos de material suporte, a avaliação da influência do regime de escoamento hidráulico e da concentração de nutrientes na formação de biofilme foi obtida em diferentes alturas e não simultaneamente. Assim, como já foi anteriormente dito, existe a possibilidade das características da água à entrada do sistema de células de fluxo influenciarem os resultados obtidos.

Na tentativa de minimizar a influência da variabilidade das características da água à entrada, avaliou-se o potencial de crescimento do biofilme para o sistema nas diferentes condições experimentais testadas, considerando a média das amostras recolhidas depois do sistema atingir o estado quase-estacionário, isto é, geralmente depois dos 6 d. Com a excepção do ensaio Tipo A<sub>1</sub> (para as bactérias cultiváveis) e Tipo A<sub>0</sub> (para as bactérias totais), que se considerou que o estado quase-estacionário ocorreu depois dos 8 d. Os resultados desta avaliação encontram-se representados na Figura 3.7.





**Figura 3.7** - Médias da concentração de bactérias totais (BT/cm<sup>2</sup>) e cultiváveis (UFC/cm<sup>2</sup>) obtidas através dos pontos das cinéticas de formação de biofilme, depois deste atingir o estado quase estacionário.

Analisando a Figura 3.7 verifica-se que a quantidade de biofilme acumulada em estado estacionário, independentemente do tipo de material em estudo, apresenta a seguinte ordem decrescente de acumulação para os vários tipos de ensaios de formação de biofilme realizados: Tipo A<sub>1</sub>, Tipo C, Tipo B<sub>1</sub> e Tipo D. Verifica-se também que a concentração de bactérias cultiváveis do biofilme em estado estacionário para o ensaio Tipo C e Tipo B<sub>1</sub> é muito semelhante. Pela análise dos valores dos desvios padrão apresentados nesta figura, verifica-se que estes são maiores para os ensaios em regime laminar do que para regime turbulento, isto pode ser explicado pelo facto de os biofilmes formados em condições laminares estarem mais sujeitos a variações em massa ao longo do tempo devido ao fenómeno de erosão e crescimento (Pereira *et al.*, 2002a).

### 3.2.2 - Influência da Variação da Qualidade da Água do Tanque de Mistura

Como a água do tanque de mistura que alimenta o sistema de células de fluxo está sujeita às variações contínuas da qualidade da água potável da rede pública no ponto de recolha, e uma vez que já se verificou que a concentração de bactérias, pH e temperatura na água do tanque de mistura não são constantes ao longo do tempo, efectuaram-se repetições de alguns dos ensaios de formação de biofilme com as mesmas condições de regime de escoamento e concentração de nutrientes para as superfícies de adesão de aço e PVC, mas em

diferentes alturas com o objectivo de verificar a influência da variação da qualidade da água que alimenta o sistema de células de fluxo, na formação de biofilme.

Assim, efectuou-se a repetição do ensaio de formação de biofilme em regime de escoamento turbulento com a adição de nutrientes (Tipo A). Nas Figuras 3.6 e 3.7 pode-se comparar os resultados da acumulação de biofilme, expressa em termos de bactérias totais (BT/cm<sup>2</sup>) e bactérias cultiváveis no meio de cultura R<sub>2</sub>A (UFC/cm<sup>2</sup>), para os ensaios em que houve repetição das condições experimentais (TipoA<sub>1</sub> e Tipo A<sub>0</sub>).

Pela análise da Figura 3.6 (a) e (e), ensaio turbulento com nutrientes, verifica-se que o perfil das curvas obtidas para a repetição destas condições experimentais são semelhantes. Nos dois ensaios atinge-se o estado estacionário entre os 10 e 12 dias de acumulação de biofilme e os valores obtidos para a concentração de bactérias totais e cultiváveis neste estado são da mesma ordem de grandeza.

No entanto, quando se aplica o teste estatístico “two-way ANOVA”, para comparar as curvas obtidas dos ensaios em que houve repetição das condições experimentais verificou-se que, existe uma elevada discrepância entre as duas curvas, quer para as bactérias totais (aço, P<0,1; PVC, P<0,001) como para as bactérias cultiváveis (aço, P<0,001; PVC, P<0,001). Isto significa que a variação das condições de entrada, ou seja, da concentração de bactérias da água do tanque de mistura influencia as cinéticas de formação de biofilme. Assim, como os ensaios que foram realizados para verificar a influência do regime de escoamento hidráulico e da concentração de nutrientes, foram efectuados em diferentes alturas e, por isso, sujeitos a diferentes condições de entrada, a sua comparação pode ser impossível de se efectuar com confiança devido à interferência deste parâmetro. Contudo, analisando a Figura 3.7 verifica-se que em estado quase estacionário as variações entre os ensaios repetidos foram pequenas quando comparadas com as diferenças obtidas quando diferentes condições foram testadas, pelo que da comparação do efeito dos outros factores se podem tirar algumas conclusões dignas de confiança. Verifica-se ainda que o efeito da variação das condições à entrada do sistema é da mesma ordem de grandeza para os diferentes materiais de suporte em estudo.

### 3.2.3 - Influência do Tipo de Material

As superfícies de adesão usadas nos ensaios de formação de biofilme, aço inoxidável 316 e PVC (cloreto de polivinilo), foram seleccionadas por representarem os materiais mais

utilizados na actualidade nas condutas da rede de distribuição de água potável e por possuírem segundo Pedersen (1990) diferentes características de superfície.

Na Tabela 3.6, a seguir apresentada, pode-se observar os resultados da aplicação do teste estatístico “two-way ANOVA” para a comparação das curvas de acumulação de biofilme das superfícies de adesão em estudo, para os vários tipos de ensaio de formação de biofilme representados na Figura 3.6.

**Tabela 3.6** - Valores da análise estatística obtidos na comparação das curvas de acumulação de biofilme ao longo do tempo, sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para os vários tipos de ensaios realizados, em termos do número de bactérias totais (BT/cm<sup>2</sup>) e cultiváveis (UFC/cm<sup>2</sup>)

Condições Experimentais	Método	Valor de P	Valores médios do Número Bactérias/cm <sup>2</sup>		Valores médios da % Bactérias Cultiváveis		
			Aço	PVC	Aço	PVC	
Com Nutrientes	Turbulento (Tipo A <sub>1</sub> )	BT	0,064	$7,78 \times 10^6$	$9,06 \times 10^6$	8,25	9,21
		UFC	0,127	$6,42 \times 10^5$	$8,34 \times 10^5$		
	Laminar (Tipo C)	BT	0,000	$1,50 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$	3,25	11,06
		UFC	0,005	$4,88 \times 10^4$	$1,36 \times 10^5$		
Sem Nutrientes	Turbulento (Tipo B <sub>1</sub> )	BT	0,000	$7,09 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	8,90	9,00
		UFC	0,000	$6,31 \times 10^4$	$1,08 \times 10^5$		
	Laminar (Tipo D)	BT	0,000	$1,29 \times 10^5$	$1,98 \times 10^5$	5,54	3,20
		UFC	0,003	$7,15 \times 10^3$	$6,34 \times 10^3$		

Analisando a Figura 3.6 e os valores apresentados na Tabela 3.6 para os vários ensaios realizados segundo as diferentes condições experimentais, verifica-se que, pelos valores de P obtidos na comparação do número de bactérias entre o aço e o PVC, aplicando o teste estatístico “two-way ANOVA” às curvas de acumulação de biofilme, seis das oito experiências apresentam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, para estas o tipo de material é um factor que influencia o número de bactérias ao longo de tempo ( $P < 0,05$ ). As restantes experiências em que os valores de P são ligeiramente superiores a 0,05 referem-se ao ensaio em regime turbulento com nutrientes. No entanto, este resultado não permite tirar nenhuma conclusão, mas para este ensaio os valores médios do número de bactérias para o PVC são maiores do que para o aço.

Comparando os valores médios do número de bactérias para o aço e PVC (Tabela 3.6) das experiências que se revelaram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), em duas obtiveram-se valores maiores para o aço, enquanto que as quatro restantes apresentaram valores do número de bactérias mais elevados para o PVC. As duas contagens mais elevadas para o aço foram obtidas para regime laminar, mas nenhuma razão óbvia aparente foi encontrada para explicar este resultado.

Assim, da comparação dos resultados de acumulação de biofilme nos dois tipos de materiais em estudo para os diferentes ensaios realizados, verifica-se que os resultados obtidos são ambíguos, o poderá possivelmente ser explicado pela semelhança de ambos os materiais em promover a adesão bacteriana. Também foi verificado (Capítulo 4) que estes dois materiais têm propriedades de superfície semelhantes, pelo que outros factores, tais como a qualidade microbiológica da água à entrada ou a variabilidade da amostragem, podem influenciar os resultados obtidos. Outra possível explicação, é que os resultados obtidos para os diferentes materiais são diferentes consoante as condições a que estão expostos. A utilização de outros materiais de suporte com propriedades menos semelhantes podia possivelmente aumentar a influência deste factor nas cinéticas de formação de biofilme, como o que se verifica em alguns trabalhos que comparam materiais com maiores diferenças que as encontradas entre o PVC e o aço (Rogers *et al.*, 1994a e Niquette *et al.*, 2000).

De um modo geral, o PVC parece, na maior parte dos casos, suportar maiores números de bactérias totais e cultiváveis, donde se conclui que, entre as duas superfícies estudadas, a utilização de aço inoxidável ASI 316 nas condutas do sistema de distribuição de água potável parece ser mais aconselhável do que a de PVC.

Comparando os resultados obtidos, com os obtidos anteriormente por outros autores para os materiais em estudo neste trabalho, Pedersen (1990) e Zacheus *et al.* (2000) também não puderam concluir qual dos materiais pode suportar maior ou menor crescimento de biofilme. No entanto, Rogers *et al.* (1994a) obtiveram três vezes mais bactérias totais no PVC do que no aço. Segundo Rogers *et al.* (1994b), unicamente o cobre parece ser, até ao momento, incontestavelmente o melhor material suporte no que diz respeito ao controlo do crescimento microbiológico em biofilmes em sistemas de distribuição de água potável.

### 3.2.4 - Influência do Regime de Escoamento Hidráulico

Têm sido publicados vários trabalhos relativos ao efeito das condições hidrodinâmicas em biofilmes. Contudo, referem-se principalmente às alterações provocadas na sua estrutura e não no número de bactérias totais e cultiváveis.

Segundo estudos efectuados por Dunsmore *et al.* (2002) e Wasche *et al.* (2002), biofilmes formados em regime turbulento são mais compactos e tem uma estrutura menos porosa, o que conduz por um lado a uma maior dificuldade na transferência de massa, mas por outro lado a turbulência causada pelas elevadas velocidades do fluido diminui a espessura dos biofilmes e aumenta a transferência de massa possibilitando um aumento do fornecimento de nutrientes para o biofilme denso.

Nos ensaios de formação de biofilme realizados foram testados dois tipos de regime de escoamento, turbulento e laminar, com e sem a adição de nutrientes à água.

Observando os gráficos da Figura 3.6 e comparando o (a) com o (c) e o (b) com o (d), de modo a poder analisar a influência do tipo de regime de escoamento na formação de biofilme, e completando esta análise com o gráfico da Figura 3.7, da média da concentração bacteriana em estado quase estacionário, verifica-se que a concentração de bactérias totais e cultiváveis em  $R_2A$  é maior em regime turbulento do que em regime laminar, independentemente da concentração de nutrientes da água. Verifica-se ainda pela análise da Figura 3.6 que, em regime turbulento, o estado estacionário é atingido entre os 10 e 12 d de acumulação de biofilme, enquanto em regime laminar o estado estacionário atinge-se mais rapidamente, entre 7 e 8 d de acumulação de biofilme sobre as superfícies de adesão em estudo.

Pelos valores apresentados na Tabela 3.6 da percentagem de bactérias cultiváveis para os vários ensaios de formação de biofilme verifica-se que, de um modo geral, em regime laminar a percentagem de bactérias cultiváveis é menor do que em regime turbulento, ou seja, em regime laminar há uma diminuição da culturabilidade das células do biofilme. Isto pode ser explicado tendo em conta o constatado por Pereira *et al.* (2002b), que verificou que a actividade respiratória das bactérias é maior para regime de fluxo turbulento, possivelmente devido à maior eficiência na transferência de nutrientes e oxigénio dentro da estrutura do biofilme.

Os resultados obtidos poderão ser possivelmente explicados pelo facto de em regime turbulento (maiores velocidades) as limitações difusionais serem menores havendo uma maior

transferência de nutrientes para o biofilme o que conduz a um maior crescimento deste. Pelo contrário, maiores velocidades de escoamento também conduzem a um aumento da erosão do biofilme, o que origina que, por um lado, este demore mais a atingir o estado estacionário, e por outro, a formação de biofilmes menos espessos facilitando a difusão de nutrientes no seu interior, originando assim um biofilme mais compacto e consistente.

Assim, pelos resultados obtidos, verifica-se que o regime de escoamento hidráulico da água nas condutas, ou seja, a sua velocidade, é um factor que influencia a concentração de bactérias acumuladas nas superfícies das condutas. Assim, pode-se concluir que menores velocidades da água nas condutas da rede de distribuição conduzem a uma menor acumulação de biofilme na superfície destas e portanto uma menor deterioração da qualidade da água potável que estas transportam.

### 3.2.5 - Influência da Concentração de Nutrientes

Como já foi referido realizaram-se ensaios de formação de biofilme com e sem a adição de nutrientes à água. A adição de um meio rico em nutrientes à água pretende simular o conteúdo normalmente existente na água que circula na rede de distribuição, mas que neste caso tinha sido removido desta no sistema de preparação de água. Por outro lado, a realização de ensaios de formação de biofilme sem o suplemento de nutrientes para compensar os que tinham sido removidos, pretende averiguar se a remoção da matéria orgânica normalmente presente na água limita, de certa forma, a formação de biofilme.

Pela análise dos gráficos da Figura 3.6 e comparando os ensaios (a) com (b) e (c) com (d), de modo a poder analisar a influência da concentração de nutrientes da água na formação de biofilme, para o regime turbulento e laminar respectivamente, e completando esta análise com o gráfico da Figura 3.7, verifica-se que a presença de nutrientes permite maiores quantificações bacterianas, quer em termos de bactérias totais ou cultiváveis, ou seja, uma maior acumulação de biofilme nas superfícies de adesão em estudo, independente do tipo de regime de escoamento, estando estes resultados de acordo com os obtidos em outros estudos que também verificaram que grandes concentrações de nutrientes no sistema aumenta o número de células no biofilme (Volk e Lechevallier, 1999; Frias *et al.*, 2001).

Foi também verificado aquando da observação ao microscópio de epifluorescência de bactérias coradas com DAPI, de ensaios com e sem nutrientes, que estas apresentam menor fluorescência em ensaios em que não há adição de nutrientes à água. Saby *et al.* (1997)

verificaram que as bactérias quando expostas ao cloro apresentavam uma menor intensidade do sinal para o DAPI, causada pela acção do desinfectante sobre a estrutura do DNA das bactérias. Assim, as observações efectuadas neste trabalho permitem sugerir que os diferentes estados fisiológicos das bactérias causados pela ausência e presença de nutrientes podem também interferir com a intensidade da coloração das bactérias com DAPI.

Assim, pelos resultados obtidos pode-se concluir que quanto maior a concentração de matéria orgânica biodegradável (nutrientes) da água que circula nas condutas da rede de distribuição, maior é a acumulação de biofilme na sua superfície e portanto maior é a deterioração da qualidade da água potável. Conclui-se também que uma forma efectiva de limitar e controlar a formação de biofilme nas condutas do sistema de distribuição de água potável é através da diminuição da concentração de matéria orgânica biodegradável da água nas estações de tratamento (Van de Kooij, 1992).

### **3.3 - Efeito do Meio de Cultura na Quantificação das Bactérias Cultiváveis**

Existem diferentes meios de cultura que podem ser usados para a contagem de microrganismos heterotróficos em amostras de água potável. No entanto, deve-se escolher o meio de cultura que permite o maior desenvolvimento de bactérias a uma determinada temperatura e por um período de tempo adequado.

Segundo estudos efectuados por Reasoner e Geldreich (1985) o meio de cultura, R<sub>2</sub>A, por eles desenvolvido, produz contagens significativamente mais elevadas do que o tradicionalmente usado, PCA, sendo portanto recomendado para a monitorização das populações bacterianas heterotróficas da água durante os processos de tratamento e sua distribuição.

O meio de cultura TSA é um meio básico usado para a cultura de uma grande variedade microrganismos, sendo principalmente usado como meio inicial de crescimento, que permite a recuperação de uma grande variedade de bactérias, podendo também ser usado para a contagem de heterotróficos em placa. Este meio foi seleccionado porque, para além da monitorização do número de bactérias cultiváveis, também se pretendia ao longo deste trabalho, identificar e caracterizar o maior número de espécies bacterianas presentes na água potável usada para a formação de biofilme (Capítulo 4).

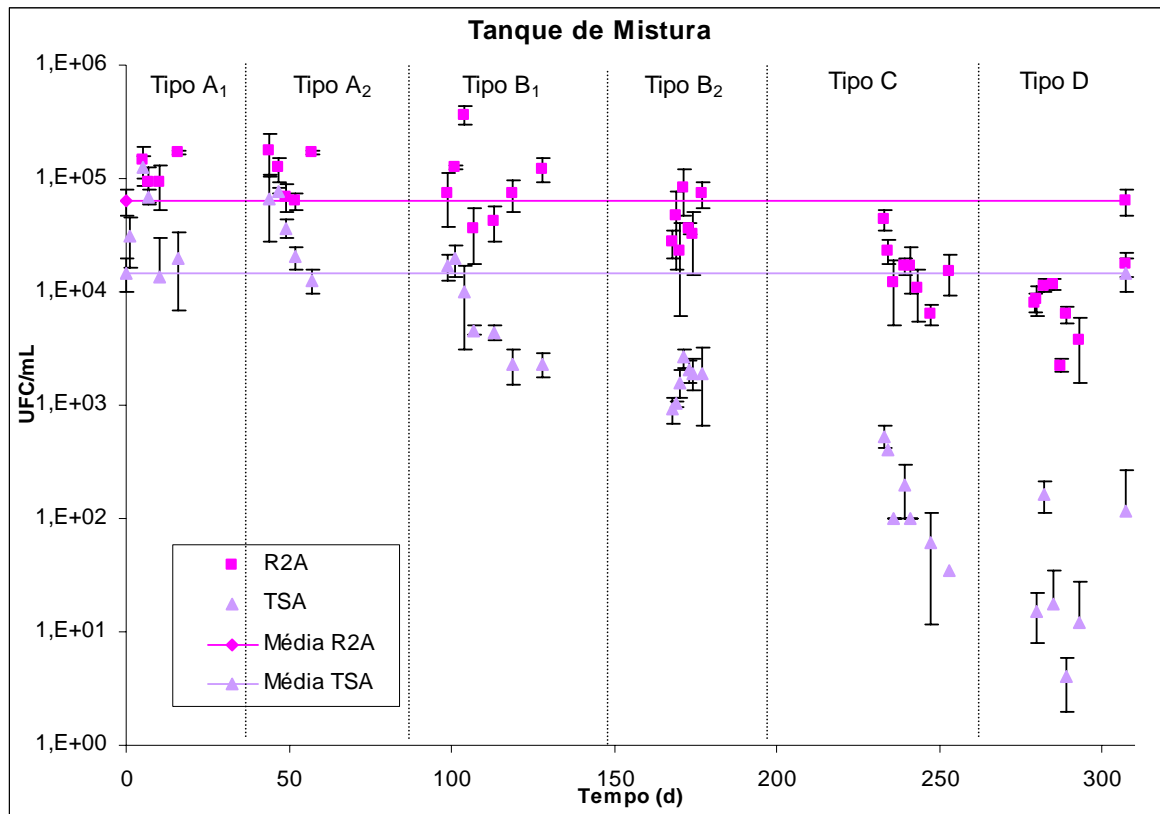
Assim, com o objectivo de verificar a influência do tipo de meio de cultura na quantificação de bactérias cultiváveis na água do tanque de mistura e em amostras de biofilme, efectuou-se a quantificação de bactérias cultiváveis, para os vários ensaios de formação de biofilme, em dois meios de cultura com composições bastante distintas, R<sub>2</sub>A e TSA (como se pode observar nas Tabelas A.1 e A.2 do Anexo A).

### **3.3.1 - Qualidade da Água Potável da Rede Pública e da Água do Tanque de Mistura**

A concentração média de bactérias cultiváveis da água potável no ponto de recolha quando inoculada no meio de cultura TSA é de  $7,36 \times 10^1 \pm 3,27 \times 10^1$  UFC/mL.

Na Figura 3.8 pode-se observar a variação do número de bactérias cultiváveis na água do tanque de mistura, expressa em termos de UFC/mL, para os meios de cultura testados, R<sub>2</sub>A e TSA, e respectivas concentrações médias, ao longo dos 307 d em que este funcionou para alimentar o sistema de células de fluxo e permitir a realização dos vários ensaios de formação de biofilme de água potável.

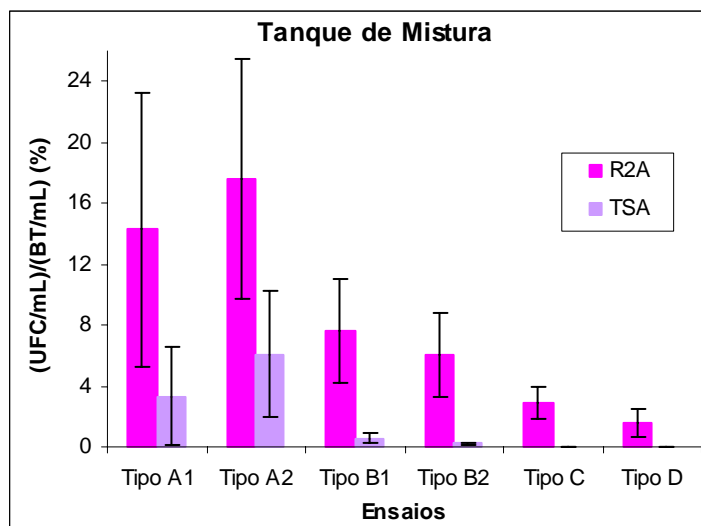




**Figura 3.8** - Variação da concentração de bactérias cultiváveis nos meios de cultura R<sub>2</sub>A e TSA, expressa em termos de UFC/mL e respectivas concentrações médias, da água do tanque de mistura durante o tempo em que se realizaram os ensaios de formação de biofilme.

Pela análise da Figura 3.8 verifica-se que há um decréscimo da concentração de bactérias cultiváveis ao longo do tempo, sendo este mais acentuado para o meio de cultura TSA. Assim, ao longo dos 307 d a concentração de bactérias cultiváveis em TSA variou entre  $4$  e  $1,23 \times 10^5$  UFC/mL, obtendo-se um valor médio de  $1,47 \times 10^4 \pm 4,87 \times 10^3$  UFC/mL e em R<sub>2</sub>A variou entre  $2,25 \times 10^3$  e  $3,68 \times 10^5$  UFC/mL, com valor médio de  $6,36 \times 10^4 \pm 1,65 \times 10^4$ , verificando-se assim uma maior variação ao longo do tempo do número de bactérias cultiváveis no meio TSA do que no R<sub>2</sub>A.

Uma vez que o decréscimo da concentração de bactérias cultiváveis em TSA é maior do que em R<sub>2</sub>A, pode-se concluir que a diminuição da culturabilidade das bactérias da água ao longo do tempo é maior para o TSA do que para o R<sub>2</sub>A, como se pode comprovar pelos resultados apresentados na Figura 3.9. Nesta figura pode-se observar os valores médios da percentagem de bactérias cultiváveis da água do tanque de mistura para os dois meios de cultura, R<sub>2</sub>A e TSA, para os vários ensaios de formação de biofilme.



**Figura 3.9** - Variação da percentagem média de bactérias cultiváveis (em R<sub>2</sub>A e TSA), expressa em (UFC/mL)/(BT/mL) (%), na água do tanque de mistura para os ensaios de formação de biofilme realizados.

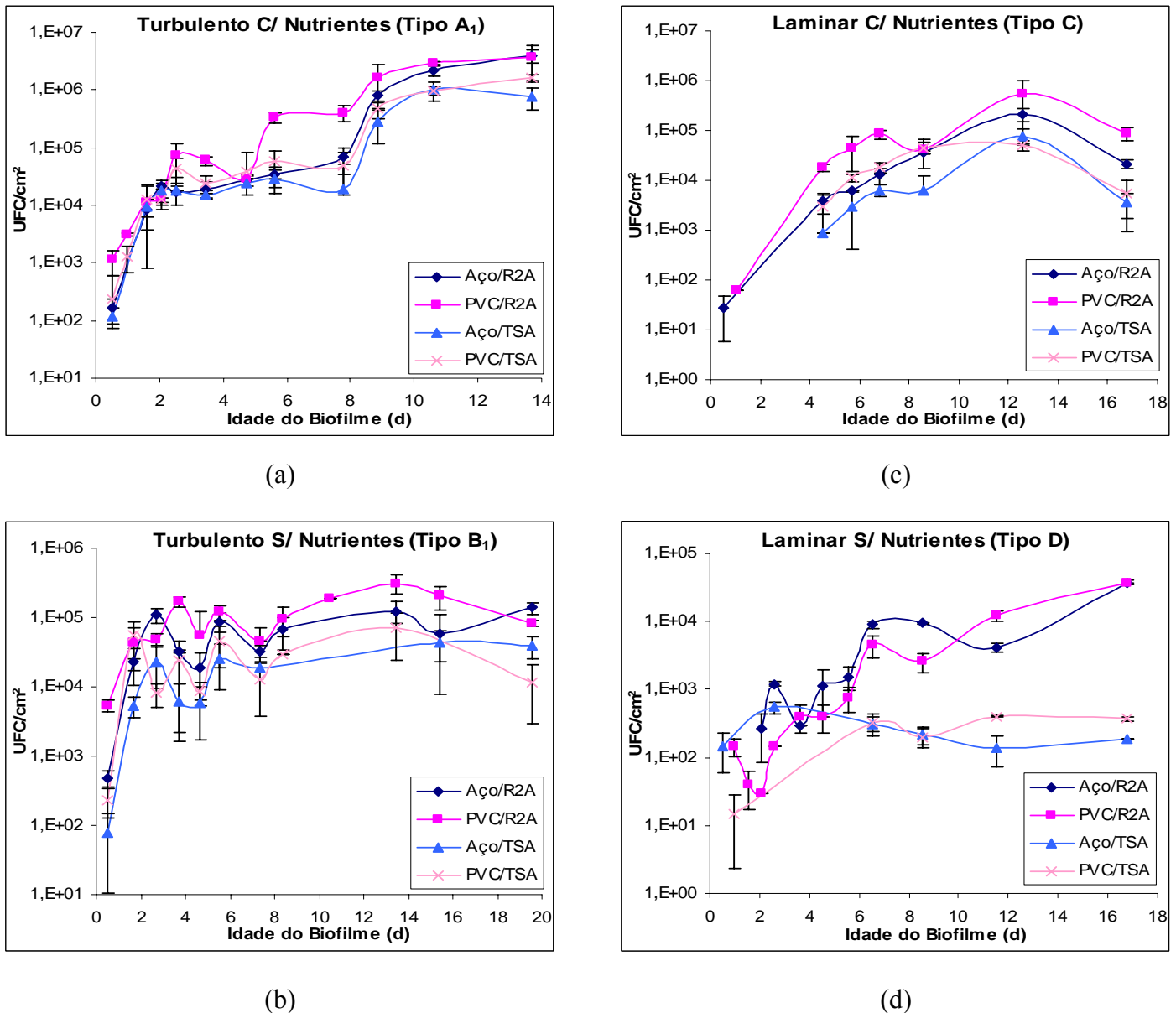
Observando a Figura 3.9 verifica-se que a percentagem de bactérias cultiváveis em TSA é muito inferior à obtida para R<sub>2</sub>A e, tal como para este meio, diminui ao longo do tempo. A percentagem média global de bactérias cultiváveis (relativamente às totais) em R<sub>2</sub>A durante os 307 dias é de 6,91%, enquanto a apresentada pelo meio de cultura TSA é apenas de 1,37%. Isto indica que o meio de cultura R<sub>2</sub>A permite uma maior recuperação das bactérias presentes na água do tanque de mistura.

Analisando os valores médios da concentração de bactérias cultiváveis no meio de cultura TSA na água potável da rede pública ( $7,36 \times 10^1 \pm 3,27 \times 10^1$  UFC/mL) e na água do tanque de mistura ( $1,47 \times 10^4 \pm 4,87 \times 10^3$  UFC/mL), obtém-se um aumento médio do número de bactérias cultiváveis em TSA de  $99,50 \pm 0,22\%$ , através da passagem da água pelo sistema de preparação de água. Ao comparar este valor como o obtido para meio de cultura R<sub>2</sub>A ( $99,54 \pm 0,35\%$ ) verifica-se que são aproximadamente iguais.

### 3.3.2 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Células de Fluxo

Como já foi referido anteriormente, as amostras de biofilme formado sobre as duas superfícies de adesão em estudo e recolhidas ao longo do tempo para os vários tipos de ensaios de formação de biofilme realizados no sistema de células de fluxo, foram analisadas em termos do seu conteúdo bacteriano pela contagem de bactérias cultiváveis nos meios de cultura R<sub>2</sub>A e TSA. Na Figura 3.10 pode-se observar os resultados da acumulação de

biofilme, expressa em termos de UFC/cm<sup>2</sup>, nestes meios de cultura, sobre as superfícies de adesão de aço e PVC, para os vários tipos de ensaios de formação de biofilme.



**Figura 3.10** - Variação da concentração de bactérias cultiváveis nos meios de cultura R<sub>2</sub>A e TSA, expressa em termos de UFC/cm<sup>2</sup>, para a acumulação de biofilme ao longo do tempo sobre as superfícies de adesão de aço e PVC para os ensaios de formação de biofilme realizados. (a) Tipo A<sub>1</sub>; (b) Tipo B<sub>1</sub>; (c) Tipo C e (d) Tipo D.

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 3.10 verifica-se que, de um modo geral, as curvas de acumulação de biofilme expressas em termos de UFC/cm<sup>2</sup> apresentam um comportamento semelhante para os dois meios testados, excepto no ensaio Tipo D em que se verifica uma grande diferença entre os valores de UFC/cm<sup>2</sup> obtidos para os dois meios.

Verifica-se ainda que, para os vários tipos de ensaios com o meio de cultura R<sub>2</sub>A obtiveram-se sempre valores de UFC/cm<sup>2</sup> significativamente superiores aos obtidos com o meio TSA.

Na Tabela 3.7 pode-se observar de uma forma resumida e comparativa a capacidade de recuperação bacteriana dos meios de cultura em estudo (R<sub>2</sub>A e TSA) nos vários pontos de amostragem para as várias amostras recolhidas ao longo do tempo, para os diferentes ensaios de formação de biofilme realizados.

**Tabela 3.7** - Comparação entre os meios de cultura R<sub>2</sub>A e TSA, na capacidade de recuperação de bactérias heterotróficas de amostras de biofilme, água do tanque de mistura (TM) e dos efluentes dos tanques de recirculação (TR), para os vários ensaios de formação de biofilme

Condições Experimentais		Tipo de Material	UFC <sub>R2A</sub> >UFC <sub>TSA</sub> /Amostras Totais			UFC <sub>R2A</sub> >UFC <sub>TSA</sub> (%)		
			Biofilme	TR	TM	Biofilme	TR	TM
Com Nutrientes	Turbulento (Tipo A <sub>1</sub> )	Aço	(9/11)	(5/5)	(4/4)	81,8	100	100
		PVC	(10/12)	(5/6)		83,3	83,3	
	Laminar (Tipo C)	Aço	(6/6)	(3/3)	(7/7)	100	100	100
		PVC	(5/6)	(4/4)		83,3	100	
Sem Nutrientes	Turbulento (Tipo B <sub>1</sub> )	Aço	(9/9)	(8/8)	(7/7)	100	100	100
		PVC	(9/10)	(8/9)		90	88,9	
	Laminar (Tipo D)	Aço	(5/5)	(7/7)	(6/6)	100	100	100
		PVC	(5/5)	(7/7)		100	100	
<b>Total</b>			(58/64)	(47/49)	(24/24)	90,6	95,9	100

Nota: UFC<sub>R2A</sub>>UFC<sub>TSA</sub> refere-se ao número de amostras em que os valores de UFC em R<sub>2</sub>A são maiores do que em TSA.

De um modo geral observando a Tabela 3.7 verifica-se que o R<sub>2</sub>A produz melhores resultados para cerca de 91% das amostras de biofilme, 96% das amostras de efluente do tanque de recirculação e 100% das amostras de água do tanque de mistura. Pela análise dos resultados apresentados nesta tabela para os vários ensaios de formação de biofilme verifica-se que o R<sub>2</sub>A parece ser mais eficiente para os ensaios sem nutrientes do que com nutrientes e para os ensaios em regime de escoamento laminar. Esta observação, pode ser explicada pelo baixo conteúdo em nutrientes do R<sub>2</sub>A que evita o choque de nutrientes e pela sua capacidade

em recuperar bactérias heterotróficas em condições de stress (meios nutricionalmente pobres e/ou com elevadas limitações difusionais).

Por aplicação do teste estatístico “two-way ANOVA” aos resultados obtidos da quantificação de bactérias cultiváveis nos dois meios de cultura, R<sub>2</sub>A e TSA, para amostras de água do tanque de mistura, efluente do tanque de recirculação e de biofilme recolhidas ao longo do tempo, para os vários ensaios de formação de biofilme comprovou-se que o tipo de meio de cultura usado para a contagem de bactérias em amostra de água ou de biofilme formado em qualquer das superfícies de adesão em estudo é um factor que influencia os valores da quantificação obtidos ( $P < 0,05$ ). Pela análise dos gráficos anteriormente apresentados e da Tabela 3.7 pode-se concluir, como já era esperado, que o R<sub>2</sub>A é o meio de cultura que permite obter melhores resultados, ou seja, recuperar um maior número de bactérias heterotróficas e por isso obter maiores contagens quer em amostras de água e biofilme para qualquer um dos ensaios, sendo por isso o meio seleccionado para a quantificação de bactérias cultiváveis em água potável. Estes resultados estão de acordo com vários artigos publicados nos últimos vinte anos (Reasoner e Geldreich, 1985; Zacheus *et al.*, 1997).

Esta conclusão poderá ser, possivelmente, explicada pela diferente composição dos meios de cultura: o meio R<sub>2</sub>A é um meio em termos de nutrientes muito mais pobre que o meio TSA, pelo que as bactérias da água se podem adaptar mais facilmente a meios pobres uma vez que o ambiente natural que as suporta também é um meio com baixa concentração de nutrientes. Assim, as bactérias das amostras de água quando plaqueadas num meio mais rico, como o TSA, sofrem, possivelmente, um choque de nutrientes que poderá limitar o seu crescimento, originando assim menores contagens.

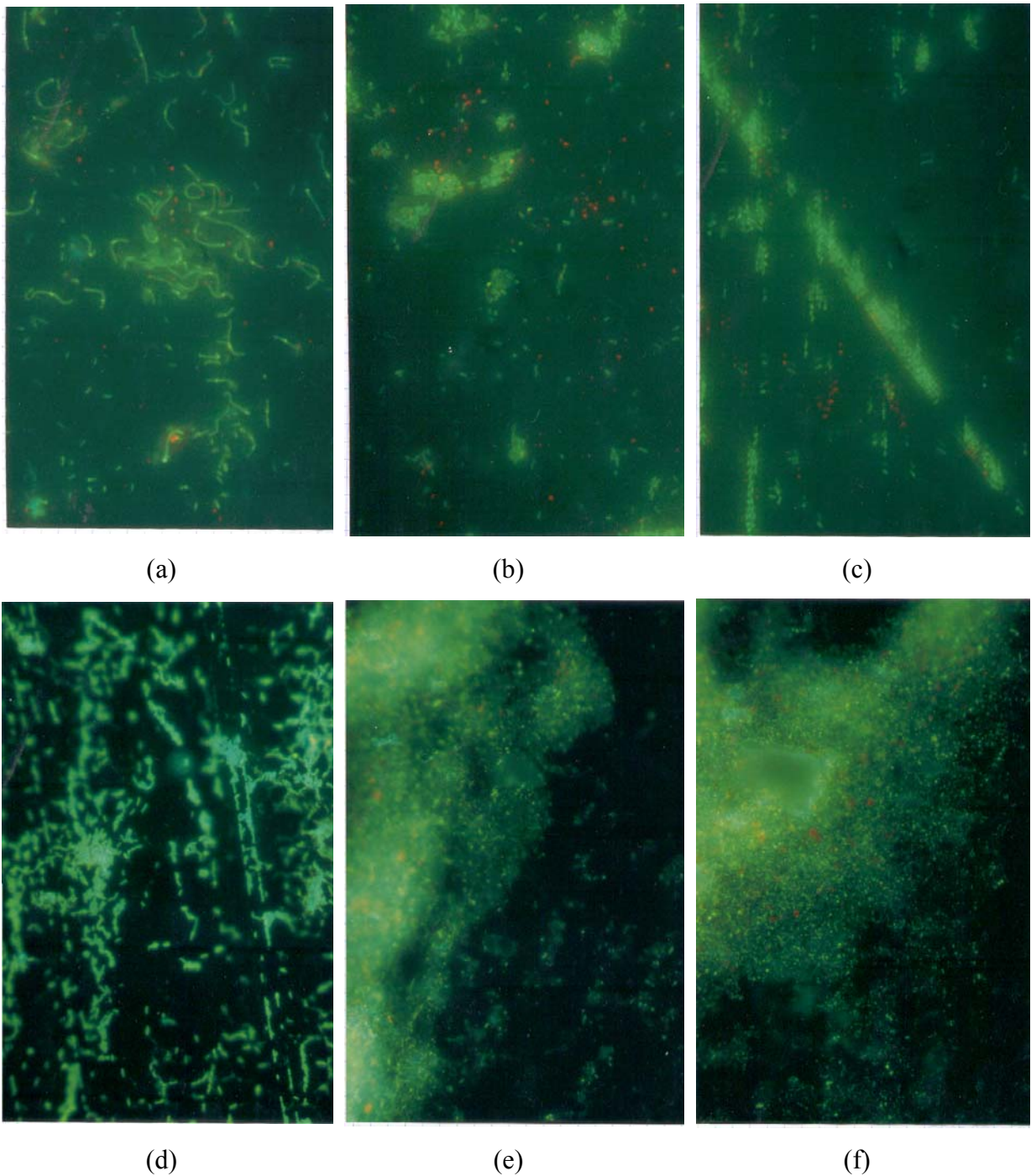
### **3.4 - Visualizações Microscópicas de Biofilme de Água Potável**

Com o objectivo inicial de verificar a influência dos diferentes factores em estudo na arquitectura do biofilme, o biofilme formado no sistema de células de fluxo sobre as superfícies de adesão de aço e PVC em diferentes condições experimentais foi visualizado microscopicamente usando várias técnicas microscópicas já vastamente utilizadas para o estudo de biofilmes (Walker & Keevil, 1994 e Surman *et al.*, 1996).

As técnicas microscópicas utilizadas foram a microscopia de epifluorescência com a utilização de diferentes fluorocromos, a microscopia electrónica de varrimento (SEM) e a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Os procedimentos aplicados para cada uma destas técnicas encontram-se descritos no Capítulo 2.

Devido à falta de disponibilidade dos equipamentos (alguns destes equipamentos encontram-se na Universidade de Southampton, UK) não foi possível analisar amostras de biofilme desenvolvido em todas as condições experimentais testadas, pelo que os resultados aqui apresentados são muito preliminares e não permitem tirar grandes conclusões quanto à influência dos diferentes factores na arquitectura do biofilme.

Nas figuras a seguir apresentadas pode-se observar biofilme formado nas superfícies de aço e PVC em diferentes condições experimentais, utilizando os métodos microscópicos acima referidos.

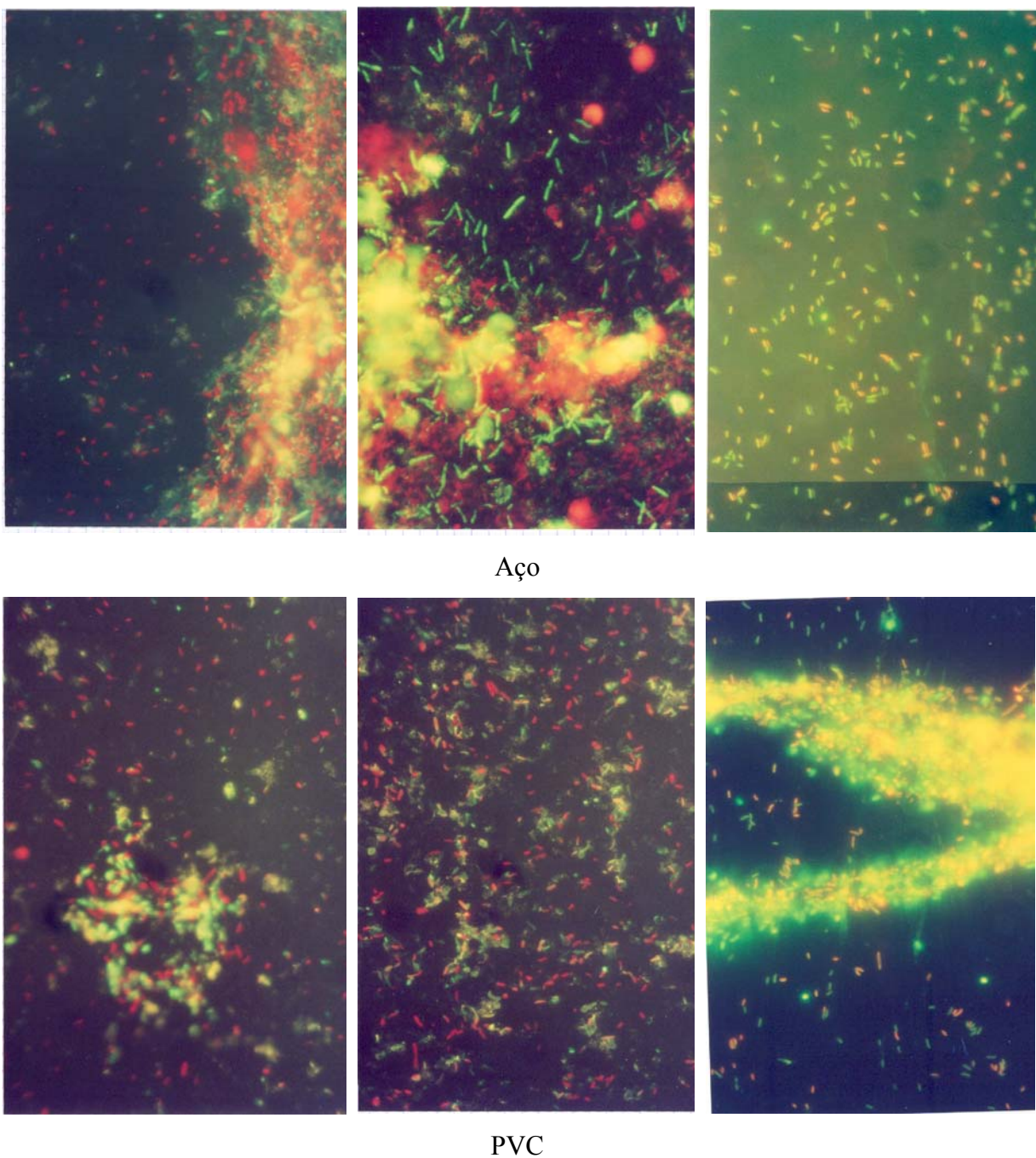


**Figura 3.11** - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água em regime turbulento com nutrientes (Tipo A), por microscopia de epifluorescência com CTC+DAPI. (a)-(d) aço e (e)-(f) PVC; ampliação 1000 $\times$ .

Pela análise da Figura 3.11 verifica-se que existem poucas células coradas de vermelho (viáveis), o que pode dever-se possivelmente ao facto de este corante quando foi utilizado já não se encontrar em boas condições. Verifica-se também que existe uma maior quantidade de bactérias aderidas nas extremidades das placas de adesão, sendo visivelmente maior na amostra de PVC. Como se pode observar em (c) e (d) as células na amostra de aço

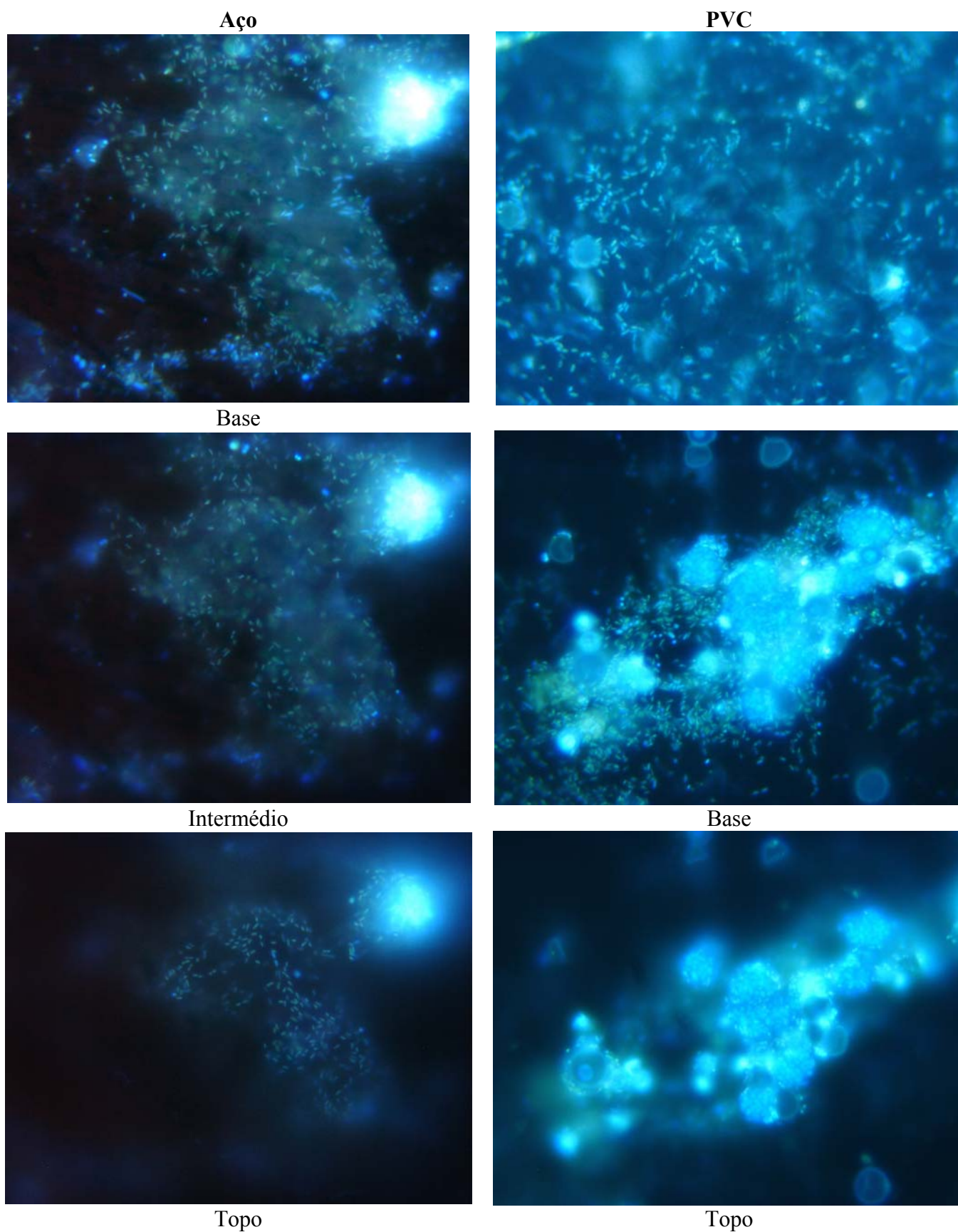


tem uma certa tendência para se agrupar em estrias longitudinais, enquanto em PVC são visíveis grandes aglomerados de bactérias (e) e (f).



**Figura 3.12** - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água em regime turbulento com nutrientes (Tipo A), por microscopia de epifluorescência com L/D; ampliação 1000×.





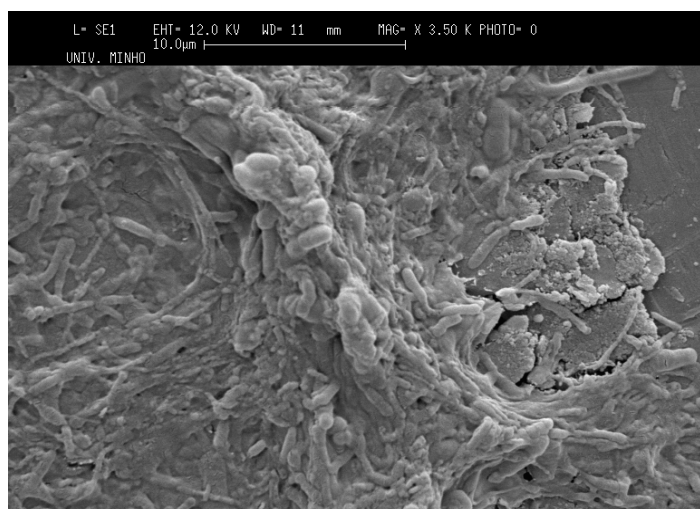
**Figura 3.13** - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água em regime laminar com nutrientes (Tipo C), por microscopia de epifluorescência com DAPI; ampliação 1000×.

Da observação ao microscópio de epifluorescência de amostras de biofilme formado nas superfícies de adesão de aço e PVC em regime laminar e coradas com DAPI, constatou-se que na amostra de aço parece ser visível um maior número de aglomerados de bactérias, sendo estes mais extensos em altura do que os visíveis em PVC. Pelo contrário, na amostra de biofilme formado na superfície de PVC é visível um grande número de células aderidas directamente à superfície. Em ambas as amostras de biofilme foi possível observar hifas de fungos daí que as bactérias não são os únicos constituintes destes biofilmes.

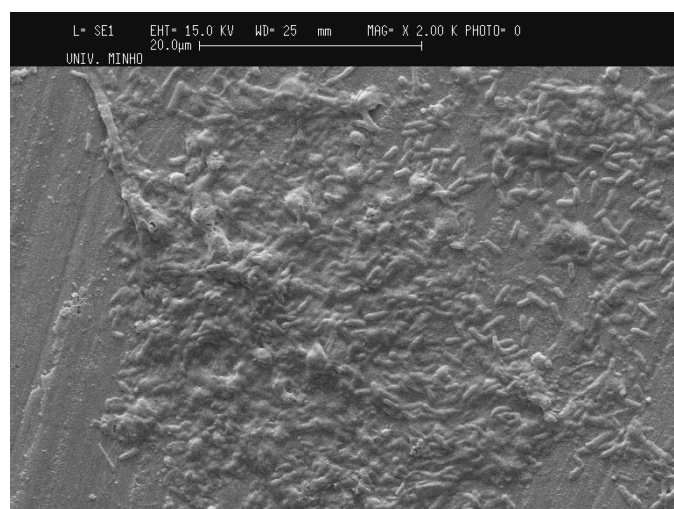
Pela análise da Figura 3.13 verifica-se que as imagens aí representadas reflectem o que anteriormente foi dito. Nas imagens desta figura referentes à superfície de adesão de aço, pode observar-se uma sequência de três planos de focagem da base para o topo de um aglomerado de células, enquanto que, nas imagens referentes à superfície de PVC, a primeira representa a adesão de bactérias directamente à superfície, pouco visível na amostra de aço, e as restantes uma sequência de dois planos de focagem da base para o topo de um aglomerado de células.

Comparando estas imagens com as observadas na Figura 3.11 verifica-se que, na amostra de aço em regime turbulento não eram visíveis grandes aglomerados, havia maioritariamente uma adesão à superfície, ao contrário do que acontece em regime laminar que ao longo de toda a placa de adesão são visíveis grandes aglomerados de células. Isto deve-se possivelmente à influência das condições hidrodinâmicas na formação de biofilme.

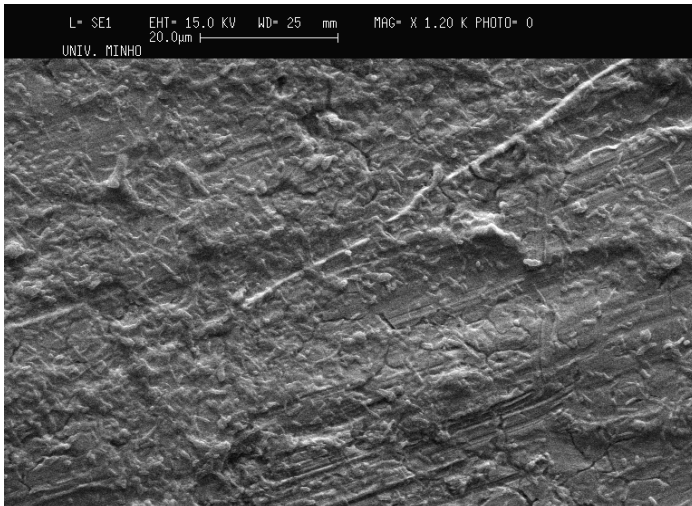
Na figura que se segue pode-se observar imagens da visualização ao microscópio electrónico de varrimento (SEM) de amostras de biofilme formado em regime turbulento e laminar sem nutrientes sobre superfícies de aço e PVC.



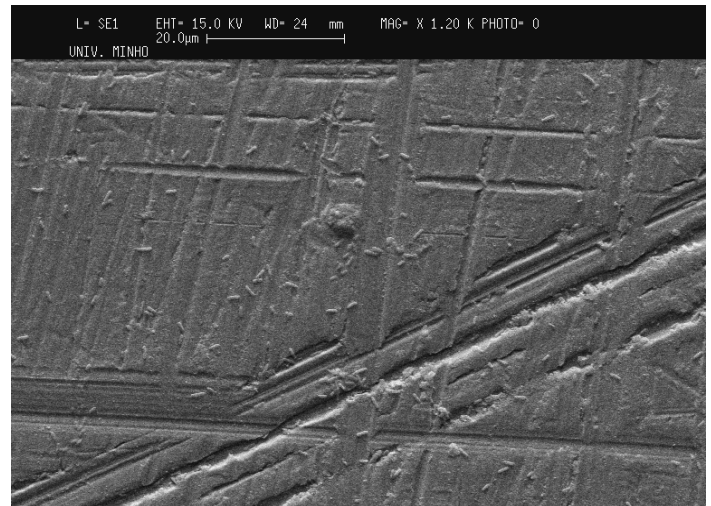
(a)



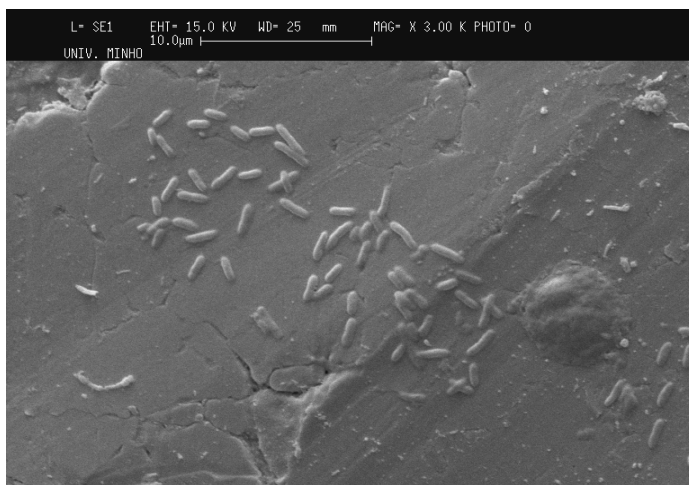
(b)



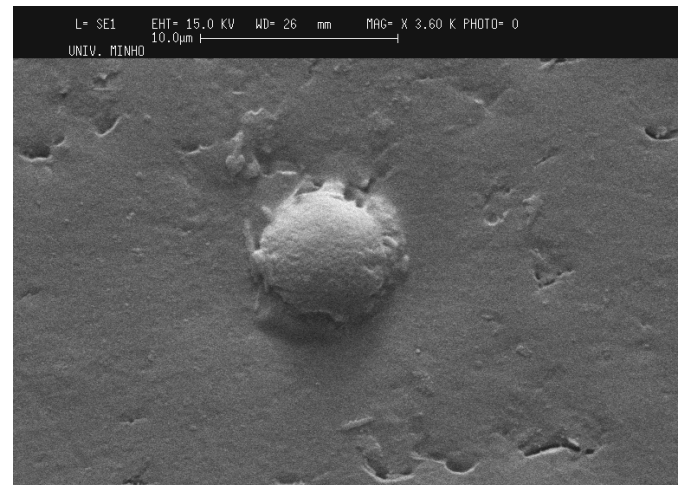
(c)



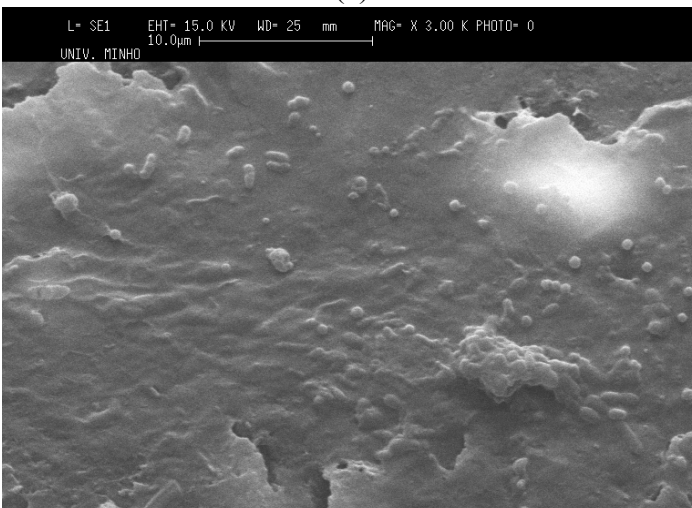
(d)



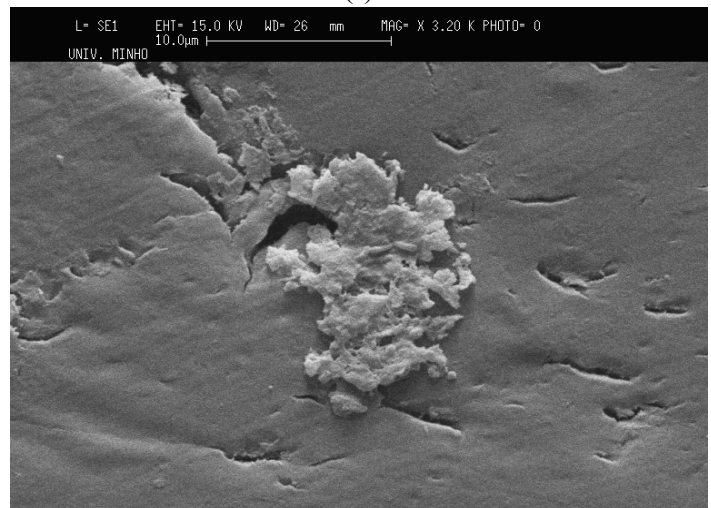
(e)



(f)



(g)



(h)

**Figura 3.14** - Visualização de biofilme, em estado estacionário, formado em superfícies em contacto com a água, por microscopia electrónica de varrimento (SEM). (a) Turbulento sem nutrientes (Tipo B), aço (extremidade da placa); (b) – (h) Laminar sem nutrientes (Tipo D): (b) e (c) aço (extremidade da placa), (d) e (e) aço (centro da placa), (f)-(h) PVC (extremidade da placa).

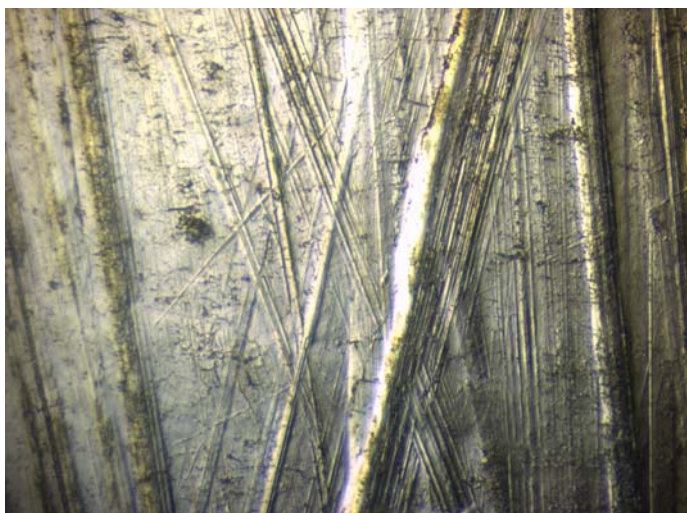
Da análise da Figura 3.14 verifica-se que, nas amostras de aço independentemente do regime são visíveis maiores quantidades de células do que nas de PVC, ao contrário do que até agora se tem verificado. Verifica-se também que, independentemente do tipo de material a quantidade de células aderidas é visivelmente maior nas extremidades do que no centro da placa de adesão, o que também já se comprovou por epifluorescência.

Nas imagens (e) e (f) é possível observar uma estrutura de forma arredondada que pelo tamanho e forma parece ser uma levedura, mais uma vez aqui se comprova que as bactérias não são os únicos constituintes dos biofilmes da água.

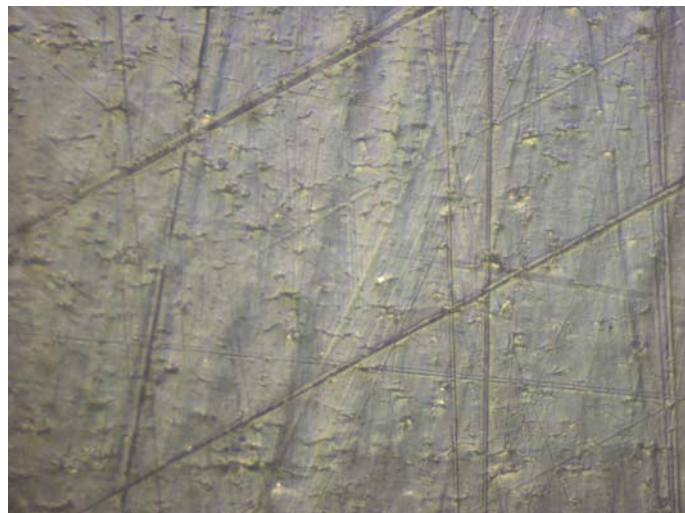
Na placa de adesão de PVC é visível uma certa degradação do material e na imagem (h) é visível uma estrutura de um aglomerado que parece ter colapsado, o que se pode dever ao processo de preparação das amostras, em que a desidratação pode ter afectado a estrutura do biofilme ou então parte deste também se pode ter desprendido.

Na Figura 3.15 encontram-se representadas várias imagens da visualização ao microscópio de contraste de interferência diferencial (DIC), de amostras de biofilme com diferentes idades formados em regime turbulento sem nutrientes sobre superfícies de aço e PVC.

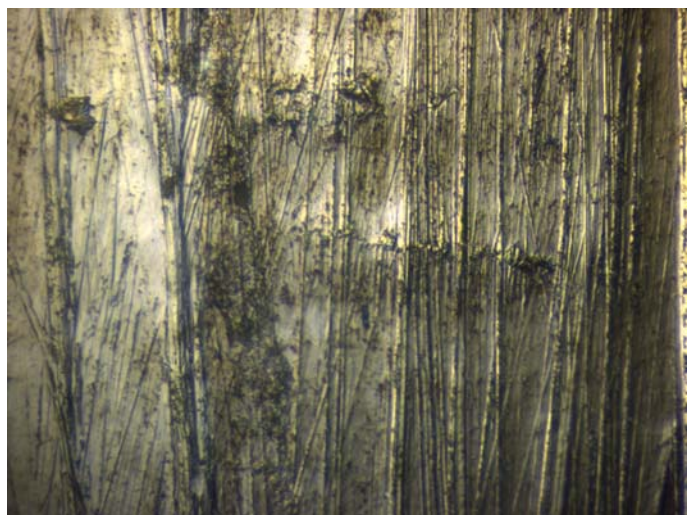




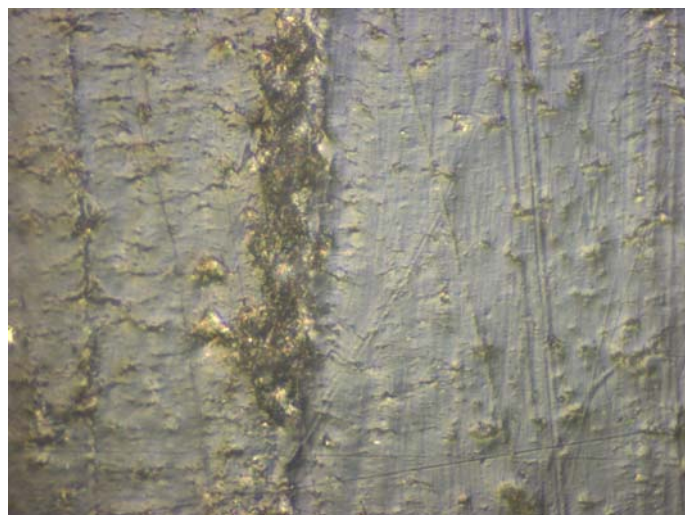
Aço 2 d 400×



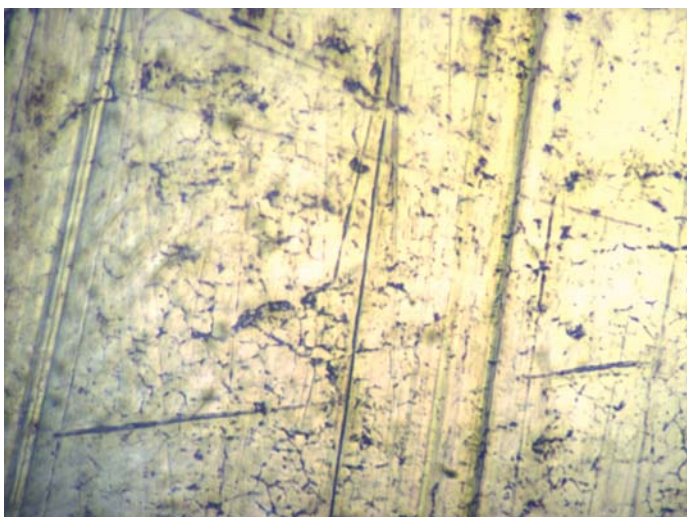
PVC 2 d 400×



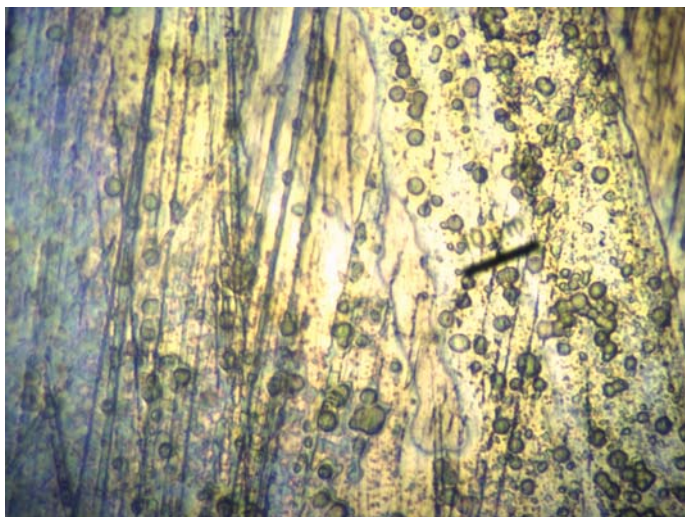
Aço 28 d 400×



PVC 28 d 400×

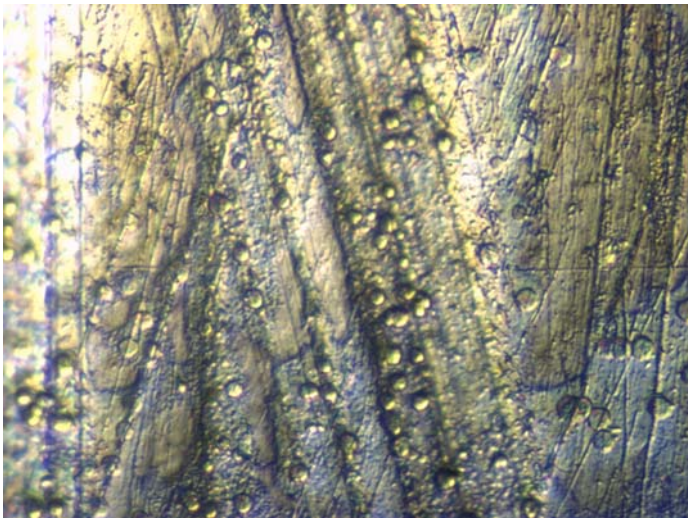


Aço 2 d 1000×

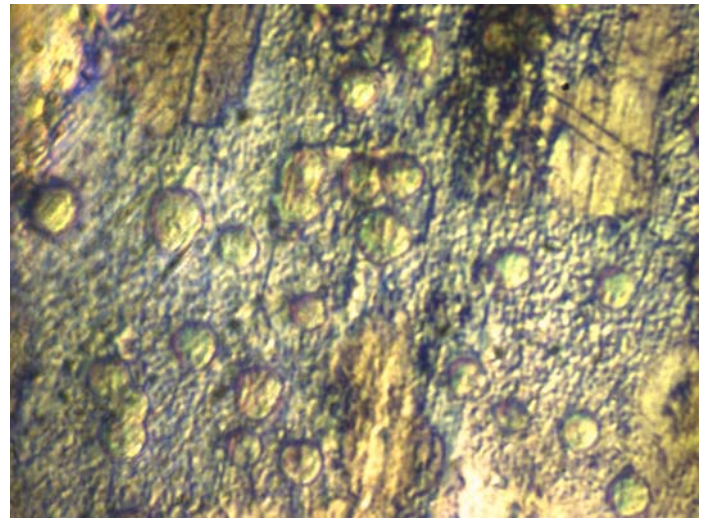


Aço 28 d 1000×

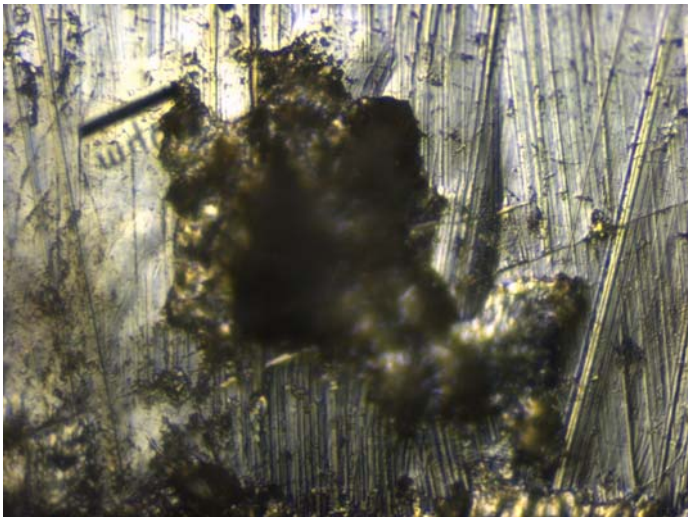




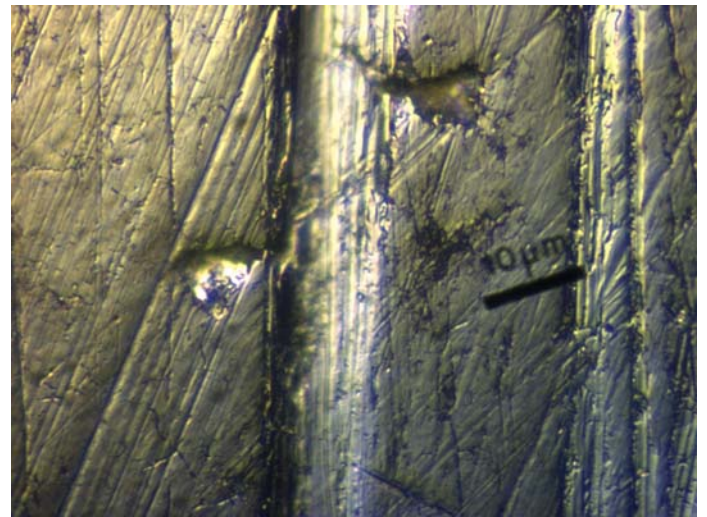
Aço 28 d 1000×



Aço 28 d 1000×



Aço 28 d 1000×



Aço 28 d 1000×

**Figura 3.15** - Visualização de biofilme formado em superfícies em contacto com a água em regime turbulento sem nutrientes (Tipo B) com diferentes idades (2 e 28 d), por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC); as ampliações encontram-se assinaladas junto de cada figura e a barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

A observação de biofilme utilizando o microscópio de contraste de interferência diferencial, permite verificar a presença de protozoários com cerca de 5-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro aderidos à superfície do material e sobre o biofilme, o que pode indicar que estes se possam alimentar das bactérias do biofilme.

Pode-se também observar na última imagem desta figura o que resta de parte do biofilme se ter desprendido da superfície, o que poderá dever-se às elevadas velocidades a que o biofilme estava sujeito neste ensaio.

### 3.5 - Conclusões

O sistema de preparação de água que fornece água em condições adequadas ao sistema de células de fluxo para permitir o desenvolvimento das cinéticas de formação de biofilme de água potável, é alimentado por água potável proveniente do sistema de distribuição da rede pública de Braga. Assim conclui-se que este sistema teve um bom desempenho obtendo-se uma eficiência média de remoção de cloro de  $91,13 \pm 2,39\%$  e um aumento médio do número de bactérias cultiváveis na água de  $94,54 \pm 0,35\%$ , que serão responsáveis pela formação de biofilme no sistema de células de fluxo sobre superfícies de aço e PVC.

À semelhança do que acontece nas redes de tratamento, armazenamento e distribuição de água potável, a concentração de bactérias, pH e temperatura na água do tanque de mistura não foram constantes ao longo do tempo, estando portanto sujeitas às variações da qualidade da água da rede e das condições ambientais entre Setembro de 2001 e Julho de 2002, período em que se desenvolveram as várias cinéticas, verificou-se um decréscimo da concentração de bactérias e uma diminuição da sua culturabilidade ao longo do tempo.

As várias cinéticas de formação de biofilme realizaram-se a uma temperatura aproximadamente constante,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , temperatura normalmente encontrada nos sistemas de distribuição de água potável, o que foi apenas possível pelo eficiente desempenho do sistema de refrigeração no controlo da temperatura no sistema de células de fluxo. Pelo contrário, o pH como não sofreu qualquer tipo de controlo e manifestou uma tendência para aumentar com o aumento do número de bactérias aderidas. Também se verificou que, à medida que aumentava a acumulação de biofilme nas superfícies, o número de bactérias à saída do sistema também aumentava, verificando-se um acréscimo considerável da concentração de bactérias na água à saída do sistema de células de fluxo em relação à concentração à entrada deste. Assim pode-se concluir que a presença de biofilme nas condutas da rede de distribuição conduz à deterioração da qualidade da água potável que chega aos consumidores, pela actividade metabólica das bactérias do biofilme e pela sua contínua erosão e desprendimento.

A realização dos vários tipos de ensaios de formação de biofilme, com diferentes condições experimentais permitiu concluir que a acumulação de biofilme na superfície das condutas da rede de distribuição de água potável é influenciada pelos seguintes factores: tipo

de material das condutas, regime de escoamento hidráulico, concentração de matéria orgânica biodegradável (nutrientes) e pela variação da qualidade da água que entra no sistema.

Embora a variabilidade das características da água potável à entrada do sistema, tal como o perfil microbiológico, tenha provado influenciar as cinéticas de formação de biofilme, o impacte sobre o potencial de crescimento de biofilme (quantidade de biofilme depois do sistema alcançar o estado quase estacionário) foi muito limitado permitindo obter conclusões sobre a importância relativa de cada um dos outros factores. Assim, do factor mais importante para o menos importante, a acumulação de biofilme nas superfícies aumenta devido à adição de nutrientes à água, o uso de condições turbulentas em vez de laminares e o uso de PVC em vez de aço inoxidável como material suporte.

Como foram analisadas unicamente duas condições diferentes por cada parâmetro estudado, as conclusões foram limitadas uma vez, que por exemplo, se fossem testados outros materiais suporte com características menos semelhantes, talvez se pudesse aumentar a importância relativa deste factor. Contudo este estudo fornece uma base de trabalho preliminar que pode ser utilizada e com a qual se podem comparar futuros trabalhos.

Assim conclui-se que, de entre as condições experimentais testadas, aquelas que conduzem a uma menor acumulação de biofilme nas condutas da rede de distribuição e como tal uma menor deterioração da qualidade da água que chega aos consumidores, são: quanto ao tipo de material das condutas, apesar das diferenças serem pouco significativas a utilização de aço inoxidável 316 em vez de PVC; quanto ao regime de escoamento, o uso de menores velocidades de escoamento da água e quanto à concentração de nutrientes, reduzidas concentrações de nutrientes limitam a formação de biofilme nas condutas.

Do estudo do efeito do meio de cultura na quantificação de bactérias cultiváveis em amostras de água e biofilme verificou-se que o tipo de meio de cultura usado para a quantificação é um factor que influencia os valores obtidos. Concluindo-se que de entre os meios estudados, o meio de cultura R<sub>2</sub>A é aquele que permite obter melhores resultados, ou seja, recuperar um maior número de bactérias e por isso obter maiores contagens em amostras de água e biofilme, sendo seleccionado como o melhor para quantificar bactérias em água potável.

Constatou-se também que na água do tanque de mistura ao longo do tempo que este funcionou, a percentagem média de bactérias cultiváveis em R<sub>2</sub>A foi de 6,91% e em TSA de 1,37%, ou seja, só uma pequena percentagem das bactérias presentes na água deste tanque foram capazes de crescer num dos meios de cultura mais indicados para a monitorização de



bactérias em água potável, o meio R<sub>2</sub>A. Assim, o método tradicional de contagem de heterotróficos em placa é pouco representativo do número de bactérias realmente presentes na água, estando actualmente a ser substituído por métodos que recorrem ao uso de marcadores químicos específicos de estruturas celulares que tem a capacidade de fluorescer quando iluminados com luz de um determinado comprimento de onda e assim poderem ser facilmente enumerados.

A visualização microscópica do biofilme de água potável com recurso a vários tipos de microscopia permitiu verificar que as bactérias não são os únicos constituintes dos biofilmes, também podemos encontrar fungos, leveduras e protozoários.

No entanto, devido ao número limitado de observações de biofilme que foi possível realizar utilizando as várias técnicas microscópicas, não se podem tirar conclusões sobre a influência dos vários factores em estudo na arquitectura do biofilme.

---

## **Capítulo 4 - Identificação e Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão**

---

Neste capítulo apresentam-se os resultados da identificação das bactérias presentes na água do tanque de mistura, que são responsáveis pela formação de biofilme no sistema de células de fluxo. São também apresentados os resultados da caracterização destas bactérias, bem como das superfícies de adesão usadas para a formação do biofilme, no que respeita às propriedades superficiais, nomeadamente tensões superficiais e hidrofobicidade, obtidos através da técnica de medição de ângulos de contacto. Os resultados desta caracterização permitem ainda fazer uma previsão teórica da adesão bacteriana a superfícies em contacto com a água potável por aplicação da teoria termodinâmica da adesão.

### 4.1 Identificação das Bactérias Colonizadoras

### 4.2 Caracterização das Bactérias e Caracterização das Superfícies de Adesão

### 4.3 Estudo Teórico de Previsão da Adesão Bacteriana a Superfícies

### 4.4 Conclusões

---

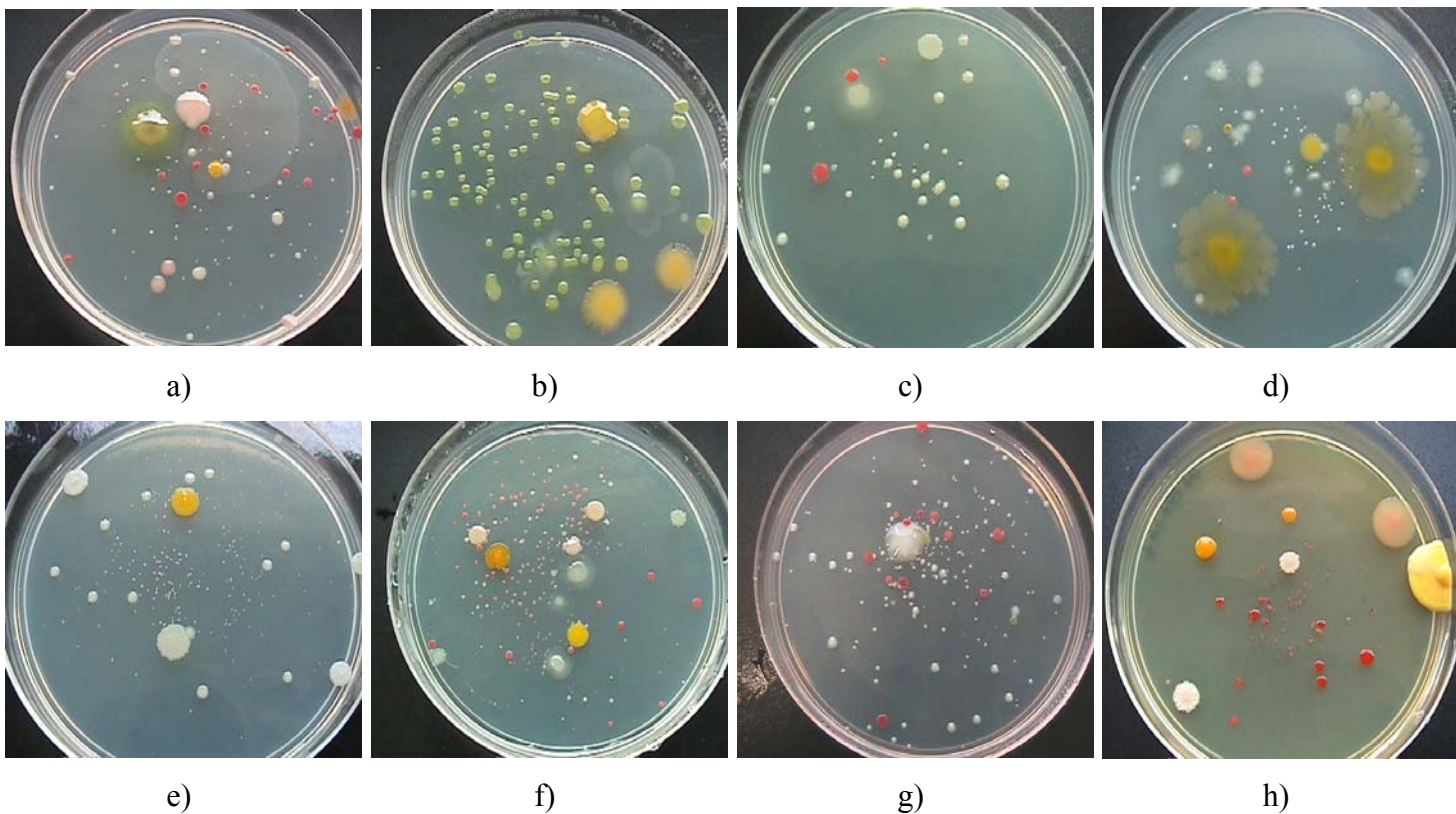
## 4.1 - Identificação das Bactérias Colonizadoras

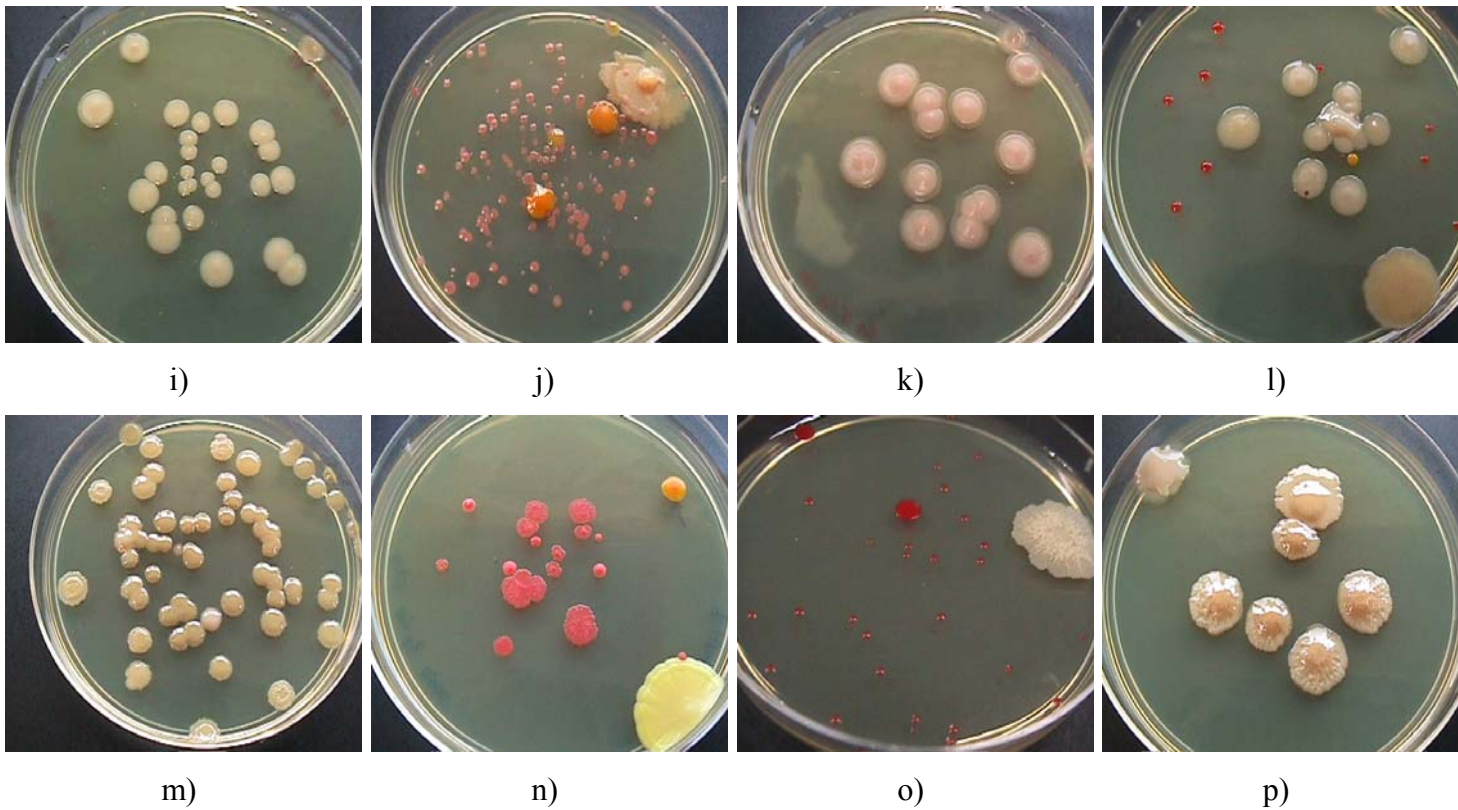
A água potável proveniente do sistema de distribuição de água da rede pública de Braga é preparada no sistema experimental descrito em 2.2.1, sendo depois recolhida no tanque de mistura. A água deste tanque contém as bactérias que colonizam o sistema de células de fluxo usado para a formação de biofilme sobre diferentes superfícies de adesão (Capítulo 3).

### 4.1.1 - Isolamento das Bactérias da Água

Com o objectivo de identificar as várias espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura recolheram-se amostras desse tanque, que foram plaqueadas em placas de Petri segundo o descrito em 2.3.1.

Como resultado deste procedimento obtiveram-se placas de Petri com diferentes tipos de colónias como se pode observar na Figura 4.1.



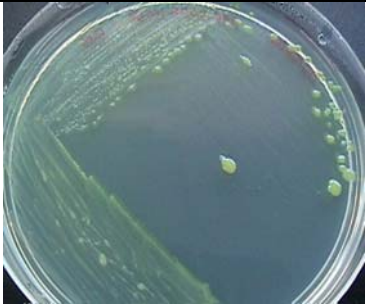

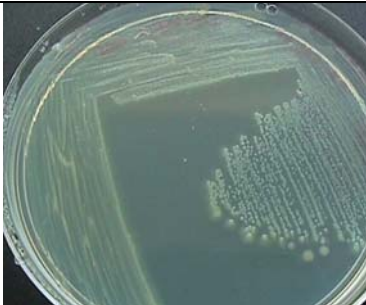
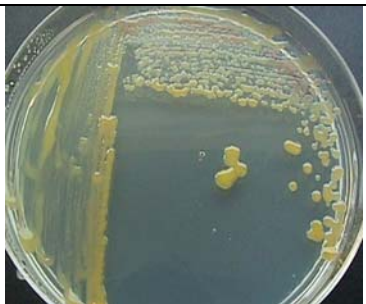



**Figura 4.1** - Placas com diferentes tipos de colônias provenientes da água do tanque de mistura. a) a g), colônias crescidas em meio de cultura R<sub>2</sub>A; h) a p), colônias crescidas em meio de cultura TSA.

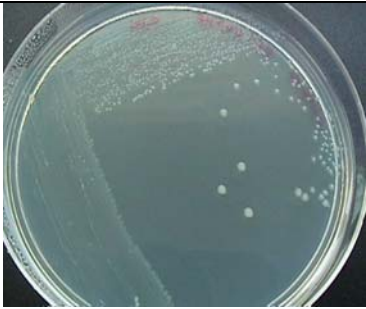
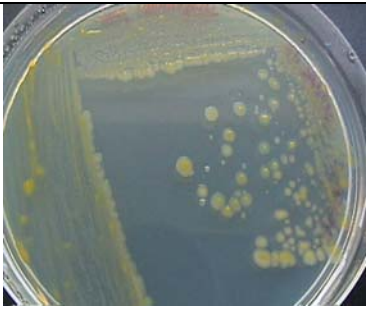

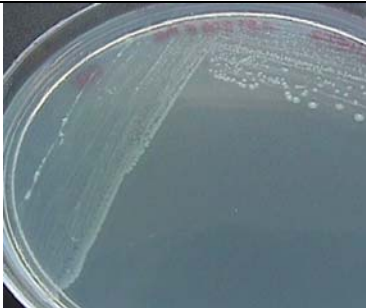

Pela observação da Figura 4.1, verifica-se que as colônias crescidas nos dois meios de cultura, R<sub>2</sub>A e TSA, apresentam uma grande variedade de morfologias e cores, o que pressupõem a existência de uma grande diversidade bacteriana na água do tanque de mistura.

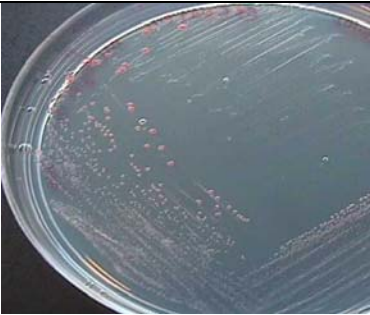
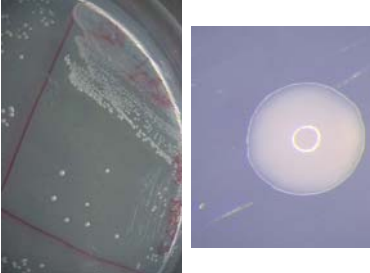
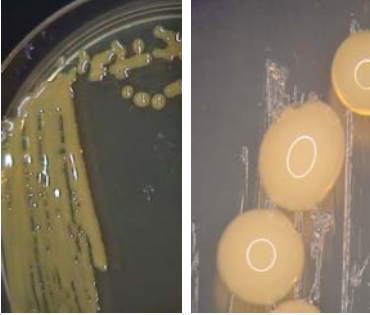
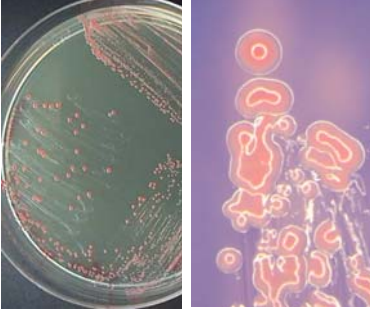

Assim, de acordo com a cor e tipo de morfologia das colônias foram isolados diferentes tipos de bactérias presentes na água do tanque de mistura. Na Tabela 4.1 observa-se uma caracterização preliminar de alguns dos isolados bacterianos, assim como as fotografias do seu crescimento em placa e a observação à lupa de algumas colônias isoladas.

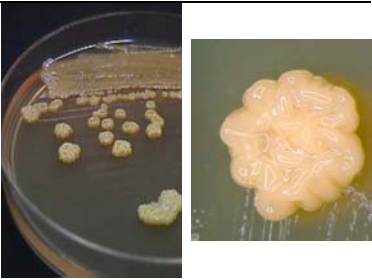


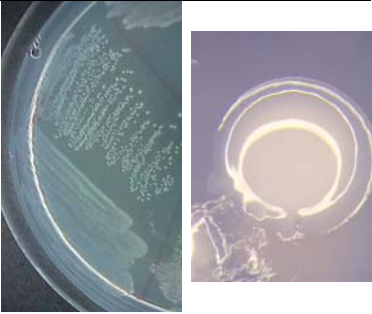

**Tabela 4.1** - Caracterização de alguns dos isolados bacterianos quanto ao meio de isolamento, à morfologia das colônias e fotografias do crescimento em placa e da observação de colônias isoladas à lupa

Referência do Isolado	Meio de Isolamento	Morfologia das Colônia	Fotografias
001 (1)	R <sub>2</sub> A	Amarela fluorescente leitosa e halo trasparente rugoso	
001 (2)	R <sub>2</sub> A	Amarela esbranquiçada transparente	
002	R <sub>2</sub> A	Amarela esbranquiçada transparente	
003	R <sub>2</sub> A	Amarela leitosa	
004	R <sub>2</sub> A	Laranja	

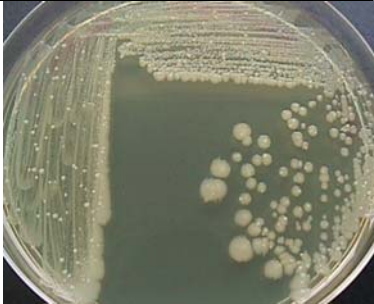


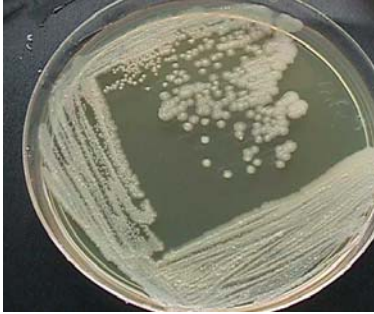








005	R <sub>2</sub> A	Branca transparente	
006	R <sub>2</sub> A	Centro amarelo e halo esbranquiçado	
008	R <sub>2</sub> A	Amarela fluorescente leitosa	
009	R <sub>2</sub> A	Branca transparente	
010	R <sub>2</sub> A	Branca leitosa	


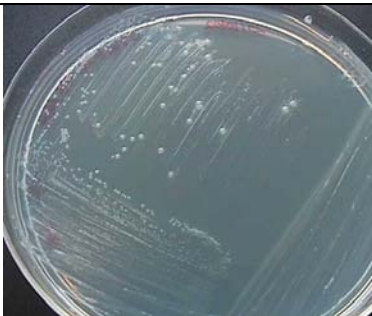


011	R <sub>2</sub> A	Rosa claro	
014	R <sub>2</sub> A	Rosa muito claro	
015	TSA	Mostarda leitosa	
016	TSA	Rosa encarnada	
017	TSA	Branca rugosa	

018	TSA	Creme refringente	
025	R <sub>2</sub> A	Amarela concêntrica rugosa e halo branco	
026 (2)	R <sub>2</sub> A	Amarela leitosa esbranquiçada	
028	R <sub>2</sub> A	Branca leitosa	
029	R <sub>2</sub> A	Rosa encarnada	



031	TSA	Branca opaca estriada	
032	TSA	Vermelha seca	
041	R <sub>2</sub> A	Branca pérola transparente	
045	TSA	Branca rugosa e seca	
046	R <sub>2</sub> A	rosa	

047	TSA	Vermelha húmida	
052	TSA	Branca opaca	
054	TSA	Salmão estrias concêntricas	
061	TSA	Branca rugosa mamilar	
065	TSA	Branca opaca cremosa	

068	R <sub>2</sub> A	Branca rosada	
075	R <sub>2</sub> A	Branca transparente pequena	
076	R <sub>2</sub> A	Amarela fluorescente	
077	R <sub>2</sub> A	Salmão claro	

#### 4.1.2 - Identificação das Bactérias da Água

Aos isolados da água, apresentados na Tabela 4.1, foi efectuado um estudo preliminar de identificação através do uso de meios de cultura selectivos (TBX, PIA e meio mínimo com metanol (MMM)) e da coloração de Gram. Na Tabela 4.2 encontram-se os resultados desse estudo, em que os sinais mais e menos representam respectivamente os resultados do crescimento ou não dos isolados nos meios selectivos em estudo. Para o meio TBX e MMM o

resultado + refere-se apenas ao crescimento quando este apresenta uma coloração azul esverdeada e rosa, respectivamente.

**Tabela 4.2** - Resultados do crescimento de alguns dos isolados bacterianos nos meios selectivos TBX, PIA e MMM e da coloração de Gram

Referência do Isolado	Meios Selectivos			Coloração de Gram
	TBX	PIA	MMM	
001 (1)	-	+	-	Gram negativa
001 (2)	-	+	-	Gram negativa
002	-	+	-	Gram negativa
003	+	-	-	Gram negativa
004	-	-	-	Gram negativa
005	-	-	-	Gram negativa
006	-	-	-	Gram negativa
008	-	+	-	Gram negativa
009	-	-	-	Gram negativa
010	-	+	-	Gram negativa
011	-	-	+	Gram negativa
014	-	-	+	Gram negativa
015	-	+	-	Gram negativa
016	-	-	+	Gram negativa
017	-	+	-	Gram negativa
018	-	+	-	Gram negativa
025	-	-	-	Gram negativa
026 (2)	-	+	-	Gram negativa
028	-	+	-	Gram negativa
029	-	-	+	Gram negativa
031	-	-	-	Gram negativa
032	-	-	+	Gram negativa
041	-	+	-	Gram negativa
045	-	+	-	Gram negativa
046	-	-	+	Gram negativa
047	-	-	+	Gram negativa
052	-	-	-	Gram negativa
054	-	+	-	Gram negativa
061	-	+	-	Gram negativa
065	-	+	-	Gram negativa
068	-	-	-	Gram negativa
075	-	-	-	Gram negativa
076	-	+	-	Gram negativa
077	-	+	-	Gram negativa

Pela observação da Tabela 4.2 verifica-se que as diferentes bactérias isoladas da água do tanque de mistura são todas Gram negativas. Pode-se verificar, também, pelos resultados do crescimento dos diferentes isolados no meio de cultura TBX que apenas um destes (003) apresenta um crescimento com uma coloração azul esverdeada, o que indica tratar-se da espécie bacteriana *Escherichia coli*, uma vez que este meio é usado para a detecção deste tipo de microrganismos na água. Relativamente ao meio PIA verifica-se que existem vários isolados bacterianos assinalados com +. Comparando estes resultados com os da sua caracterização apresentados na Tabela 4.1, verifica-se que os diferentes isolados apresentam cores e morfologias pouco semelhantes, pelo que se conclui que, possivelmente, existem na água diferentes géneros bacterianos pertencentes à família das *Pseudomonadaceae*. Observando na Tabela 4.2 os resultados do MMM verifica-se que existem sete isolados que cresceram neste meio, e que, portanto, devem pertencer ao género *Methylobacterium*. Pela observação das fotografias destes isolados na Tabela 4.1 verifica-se que estes apresentam todos uma coloração rosa mas com tonalidades e morfologias um pouco diferentes o que leva a supor que se pode tratar de diferentes espécies bacterianas pertencentes a este género.

Uma vez que os testes preliminares de identificação efectuados não permitem, de um modo geral, identificar as espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura, os isolados bacterianos foram posteriormente identificados pelo sistema de identificação Programa API (ID32 GN) no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, apresentando-se na Tabela 4.3 os resultados desta identificação.

**Tabela 4.3** - Resultados da identificação de alguns dos isolados bacterianos da água do tanque de mistura pelo sistema de identificação Programa API (ID 32 GN)

Referência do Isolado	Programa API (ID 32 GN)	
	Identificação	Classificação
001 (1)	<i>CDC gr.IV C-2</i>	Excelente identificação
001 (2)	<i>Comamonas acidovorans</i>	Identificação aceitável
002	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Excelente identificação
003	<i>Escherichia coli</i>	- *
004	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Muito boa identificação
005	<i>CDC gr.IV C-2</i>	Boa identificação
006	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Boa identificação
008	<i>Comamonas acidovorans</i>	Identificação aceitável
009	<i>CDC gr.IV C-2</i>	Boa identificação
010	<i>Burkholderia cepacia</i>	Boa identificação
011	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Boa identificação
014	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Muito boa identificação
015	<i>Comamonas acidovorans</i>	Boa identificação
016	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Excelente identificação
017	<i>Comamonas acidovorans</i>	Identificação aceitável
018	<i>Comamonas acidovorans</i>	Muito boa identificação
025	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Muito boa identificação
026 (2)	<i>Comamonas acidovorans</i>	Muito boa identificação
028	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Excelente identificação
029	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Excelente identificação
031	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Boa identificação
032	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Excelente identificação
041	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Boa identificação
045	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Boa identificação
046	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Identificação aceitável
047	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Excelente identificação
052	<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i>	Muito boa identificação
054	<i>Moraxella lacunata</i>	Boa identificação
061	<i>Moraxella lacunata</i>	Boa identificação
065	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Boa identificação
068	<i>Moraxella lacunata</i>	Boa identificação
075	<i>CDC gr.IV C-2</i>	Muito boa identificação
076	<i>Comamonas acidovorans</i>	Muito boa identificação
077	<i>Moraxella lacunata</i>	Boa identificação

Nota: \* - Este isolado bacteriano não foi identificado pelo sistema de identificação Programa API, mas através do meio selectivo TBX.

Na Tabela 4.4 apresentam-se novamente os resultados da identificação das várias espécies bacterianas pelo programa API, mas por ordem alfabética, assim como as referências de alguns dos isolados que lhe correspondem, aos quais se dá uma nova designação que é posteriormente utilizada na caracterização das propriedades superficiais das bactérias no ponto 4.2.1.

**Tabela 4.4** - Nova designação para as bactérias isoladas e identificadas que é posteriormente usada na caracterização das bactérias no ponto 4.2.1

<b>Espécie Bacteriana</b>	<b>Referência do Isolado</b>	<b>Nova Designação</b>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	031	<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i>	052	<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>
<i>Brevundimonas diminuta</i>	045	<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	065	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>
<i>Burkholderia cepacia</i>	010	<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>
CDC gr. IV C-2	005	CDC gr. IV C-2 <u>SP1</u>
	009	CDC gr. IV C-2 <u>SP2</u>
	001 (1)	CDC gr. IV C-2 <u>SP3</u>
<i>Comamonas acidovorans</i>	015	<i>Comamonas acidovorans</i> <u>SP1</u>
	018	<i>Comamonas acidovorans</i> <u>SP2</u>
	017	<i>Comamonas acidovorans</i> <u>SP3</u>
	008	<i>Comamonas acidovorans</i> <u>SP4</u>
	001 (2)	<i>Comamonas acidovorans</i> <u>SP5</u>
<i>Escherichia coli</i>	003	<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	025	<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	016	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP1</u>
	029	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP2</u>
	046	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP3</u>
	032	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP4</u>
	011	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP5</u>
	014	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP6</u>
	047	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <u>SP7</u>
<i>Moraxella lacunata</i>	077	<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	041	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	006	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	028	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <u>SP1</u>
	002	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <u>SP2</u>

Neste estudo foram isoladas e identificadas 14 diferentes espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura, todas elas aeróbias e Gram negativas, como se referiu anteriormente.

Na sua grande maioria as espécies bacterianas isoladas são eubactérias quimioheterotróficas que utilizam como fonte de carbono e energia os compostos orgânicos com mais de um átomo de carbono, com a excepção das pertencentes ao género *Methylobacterium* que são eubactérias metilotróficas facultativas, ou seja, utilizam como fonte de carbono e energia compostos orgânicos de apenas um átomo de carbono, ou então dois ou mais átomos de carbono que não estão unidos um ao outro (por exemplo éter dimetilico, dimetilamina, etc.) (Stanier *et al.*, 1991).

O facto de todas as espécies bacterianas isoladas serem aeróbias e heterotróficas deve-se ao tipo de meios de cultura usados, visto que são selectivos para este tipo de microrganismos.

As 14 diferentes espécies isoladas da água do tanque de mistura pertencem a diferentes famílias do reino das Eubactérias, sendo a família mais bem representada a das *Pseudomonadaceae*. No entanto, estão também presentes espécies bacterianas da família das *Neisseriaceae*, *Aeromonadaceae* e *Enterobacteriaceae*.

Os membros da família das *Pseudomonadaceae* possuem as seguintes características: bastonetes direitos ou ligeiramente curvos, com 0,5 – 1,0 µm por 1,5 – 4,0 µm, não formam endósporos, tem flagelos de inserção polar simples ou múltiplos, metabolismo respiratório nunca fermentativo, não utilizam compostos orgânicos poliméricos, apresentam exigências nutricionais muito simples, crescem a pH neutro e a temperaturas na gama mesofílica, elevada versatilidade metabólica, não produzem gás a partir da glucose, em condições anaeróbias não formam ácido a partir da glucose, são oxidase positivas (estas últimas duas características permitem a sua distinção das bactérias entéricas), catalase positivas, índole negativas, vermelho de metilo negativas e Voges-Proskauer negativas (Ferreira e Sousa, 2000).

Assim, das espécies bacterianas encontradas na água do tanque de mistura, as pertencentes à família das *Pseudomonadaceae*, anteriormente consideradas do género *Pseudomonas*, mais tarde agrupadas com base na homologia do RNA ribossómico (RNAr) e recentemente algumas transferidas para novos géneros (Holloway, 1996), são: *Pseudomonas fluorescens* (Grupo I), *Burkholderia cepacia* (Grupo II), *Comamonas acidovorans* (Grupo III), *Brevundimonas diminuta* e *Brevundimonas vesicularis* (Grupo IV), *Stenotrophomonas maltophilia* (Grupo V), *Sphingomonas paucimobilis*, *Flavimonas oryzae* e *Methylobacterium mesophilicum* (Ferreira e Sousa, 2000).



A espécie bacteriana *Burkholderia cepacia* é uma espécie patogénica oportunista emergente de animais e plantas, resistente a muitos antibióticos e capaz de sobreviver e se multiplicar em ambientes nutricionalmente limitados, em particular, em ambientes hospitalares húmidos. Nas últimas décadas, o número de infecções causadas por esta espécie bacteriana, conhecida inicialmente como uma espécie fitopatogénica responsável pela podridão da cebola, aumentou marcadamente (Govan e Deretic, 1996). Este microrganismo parece ter uma predileção pelo tracto respiratório, causando infecções que podem colocar em perigo de vida doentes que necessitam de ventilação mecânica, doentes com granulomatose crónica e doentes com fibrose quística. Clinicamente, a colonização por *B. cepacia* pode levar a um lento e continuado declínio da função pulmonar, culminado na rápida e fatal deterioração do pulmão (Ferreira e Sousa, 2000).

As bactérias da família das *Neisseriaceae* presentes na água do tanque de mistura são o *Acinetobacter lwoffii* e a *Moraxella lacunata*. A espécie *Acinetobacter lwoffii* possui as seguintes características: é aeróbia estrita, coco-bacilar, imóvel, oxidase negativa, catalase negativa, cresce a temperaturas mesofílicas, é capaz de usar uma grande variedade de substratos metabólicos como fonte de carbono, não fermenta a glucose, é cultivável em meios de cultura relativamente simples (TSA ou nutriente agar), encontra-se presente na natureza e em ambientes hospitalares nas unidades de cuidados intensivos e é um organismo de baixa virulência mas capaz de causar infecções, sendo responsável por muitos casos de meningite. A espécie *Moraxella lacunata* caracteriza-se por: apresentar a forma de pequenos bastonetes que ocorrem aos pares ou em pequenas cadeias, é imóvel, não fermenta a glucose, apresenta uma temperatura óptima de crescimento de 37°C e é uma espécie extremamente rara, que afecta unicamente humanos causando infecções dos olhos e do tracto respiratório.

A espécie bacteriana *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*, também isolada da água do tanque de mistura, pertence à família das *Aeromonadaceae*. Esta espécie apresenta forma bacilar, não é móvel, é causadora de uma doença nos peixes chamada furunculose e como patogénica em humanos suspeita-se que possa causar gastroenterites, meningites, doenças do tracto respiratório, infecções oculares e entre outras.

Da família das *Enterobacteriaceae* foi isolada da água do tanque de mistura a espécie bacteriana *Escherichia coli*. Esta apresenta as seguintes características: forma bacilar, móvel, com flagelos peritricos, fermenta a lactose e a glucose, oxidase e citrato negativa, acetato e lisina positiva, indol e vermelho de metilo positiva, possui uma elevada resistência a antibióticos e crescimento fácil em meios de cultura líquidos e sólidos não exigindo qualquer tipo de suplemento. A *E. coli* vulgarmente designada por coli-bacilo, é das espécies de maior

importância clínica, ocasionando frequentemente infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicemias, abscessos, etc.. É também um habitante indígena do tracto intestinal dos mamíferos e, por essa razão, a sua presença em água de consumo é indicadora de poluição fecal. Embora a *E. coli* seja um habitante indígena do tracto intestinal, algumas estirpes podem causar perturbações entéricas graves (Ferreira e Sousa, 2000).

Foram também isoladas da água do tanque de mistura bactérias classificadas pelo Centers of Disease Control and Prevention (CDC) como prejudiciais para a saúde pública, que pertencem ao grupo IV e são de classe 2.

Para algumas das espécies bacterianas identificadas, como por exemplo a *CDC gr. IV C-2*, *Comamonas acidovorans*, *Methylobacterium mesophilicum* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram determinadas as propriedades superficiais dos diferentes isolados. Isto porque, apesar de estarem classificados como espécies iguais, os diferentes isolados apresentam características morfológicas distintas, o que leva a pensar tratarem-se de diferentes subespécies. Pelo contrário, no caso das espécies *Moraxella lacunata* e *Sphingomonas paucimobilis*, foram apenas determinadas as propriedades superficiais de um dos isolados bacterianos, apesar de estes também apresentarem morfologias pouco semelhantes.

#### **4.1.3 - Estudo do Crescimento das Bactérias da Água nos Dois Meios de Cultura de Isolamento**

Como resultado do estudo de verificação da capacidade de crescimento das várias espécies bacterianas encontradas na água do tanque de mistura nos dois meios de cultura, R<sub>2</sub>A e TSA, usados para o isolamento bacteriano e para a contagem de heterotróficos em placa (bactérias cultiváveis) nos ensaios de formação de biofilme, verificou-se que todos os isolados bacterianos crescem à temperatura ambiente em ambos os meios de cultura. Desta observação poderia à primeira vista concluir-se que os resultados da contagem de bactérias cultiváveis fosse semelhante nos dois meios, mas como foi constatado pela análise dos resultados das bactérias cultiváveis nos ensaios de formação de biofilme (Capítulo 3), verificou-se que com o meio de cultura R<sub>2</sub>A obtiveram-se sempre valores de UFC significativamente superiores aos obtidos com TSA. A explicação para as baixas contagens obtidas com o meio de cultura TSA não se deve portanto à incapacidade de certas bactérias crescerem neste meio de cultura, mas devido à elevada quantidade de substrato presente neste meio que causa um choque de

nutrientes às bactérias da água, fisiologicamente adaptadas a ambientes com baixa concentração de nutrientes, o que poderá possivelmente limitar o seu crescimento. Em estudos recentes verificou-se a utilização de meios de cultura com baixo conteúdo em nutrientes, com o objectivo de tentar melhorar a capacidade de recuperação de bactérias patogénicas de amostras de água potável (Azevedo *et al.*, 2003).

#### 4.2 - Caracterização das Bactérias e Caracterização das Superfícies de Adesão

Segundo Busscher *et al.* (1995), a fase inicial da adesão bacteriana a superfícies é determinante para a formação de biofilme. Vários estudos têm mostrado que adesão bacteriana depende por uma lado da natureza da superfície inerte e por outro das propriedades da superfície bacteriana (Chamberlain e Johal, 1988; Carballo *et al.*, 1992; Hood e Zottola, 1995).

Com o objectivo de melhor compreender a adesão bacteriana a superfícies em contacto com a água potável, determinaram-se as propriedades superficiais das diferentes espécies bacterianas isoladas da água do tanque de mistura e das superfícies usadas neste trabalho para o crescimento de biofilme. As propriedades superficiais, nomeadamente as tensões superficiais e hidrofobicidade, das duas entidades envolvidas na adesão foram determinadas por medição de ângulos de contacto.

Para ser possível a determinação das três componentes da tensão superficial da superfície de um suporte de adesão ou célula é necessário determinar nessa superfície os ângulos de contacto formados por pelo menos três líquidos de polaridade diferentes, sendo um deles apolar. Por outro lado, os líquidos utilizados devem apresentar uma tensão superficial superior à tensão da superfície da qual se quer fazer esta determinação, caso contrário, criam-se vapores de baixa energia que se espalham rapidamente sobre a superfície pré condicionando-a, resultando numa sobrevalorização da tensão superficial (Fowkes *et al.*, 1980). Os resultados finais são dependentes do conjunto de líquidos utilizados, o que implica que só se possam comparar as propriedades superficiais se forem utilizados os mesmos líquidos nas determinações dos ângulos de contacto, uma vez que líquidos distintos formam ângulos distintos (van Oss *et al.*, 1988; Costanzo *et al.*, 1990).

Assim, os líquidos seleccionados para as medições dos ângulos de contacto das superfícies de adesão e das bactérias foram o  $\alpha$ -bromonaftaleno (apolar), água e formamida (polares). As tensões destes líquidos encontram-se na Tabela 2.3 do Capítulo 2.

A hidrofobicidade das superfícies é uma das propriedades superficiais que desempenha um papel fundamental no fenómeno de adesão (Azeredo *et al.*, 2000), existindo várias formas e métodos para a avaliar.

O critério primário de avaliação qualitativa da hidrofobicidade permite avaliar o carácter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície através do valor do ângulo de contacto da superfície formado com a água ( $\theta_w$ ). Assim, para ângulos superiores a  $50^\circ$  a superfície é considerada hidrofóbica. Caso contrário, se o ângulo é inferior a  $50^\circ$  a superfície será hidrofílica (Azeredo, 1998).

É também possível estimar o carácter hidrofóbico ou hidrofílico das superfícies a partir das componentes da tensão superficial: quanto maior for o valor da componente LW mais apolar é a superfície e portanto, menor afinidade terá para líquidos polares; quanto maior for o valor da componente AB, mais água de hidratação tem a superfície e logo será mais hidrofílica. Tendo em conta o estudo efectuado por Azeredo (1998) com intuito de verificar a importância relativa de cada uma das componentes da tensão superficial na hidrofobicidade, pode verificar-se que: - a hidrofobicidade de uma substância é pouco dependente da sua componente apolar, mas quanto maior for o valor desta componente mais hidrofóbica, ou menos hidrofílica, se torna a superfície; - o parâmetro  $\gamma^-$  exerce uma grande influência na hidrofobicidade das superfícies, sendo o seu valor determinante para avaliar o seu carácter hidrofóbico ou hidrofílico. Assim, conclui-se que a hidrofobicidade de uma superfície é determinada por forças de interacção polares. Conclui-se, também, neste estudo, que o parâmetro  $\gamma^-$  pode ser um indicador semi quantitativo do grau de hidrofobicidade. Para valores de  $\gamma^- \leq 25,5 \text{ mJ/m}^2$  a superfície é hidrofóbica, independentemente do valor da componente apolar. Quando  $25 < \gamma^- < 35 \text{ mJ/m}^2$  a hidrofobicidade é dependente da componente apolar e, neste caso, a superfície é hidrofílica quando  $\gamma^{LW} \leq 45 \text{ mJ/m}^2$  e hidrofóbica quando  $\gamma^{LW} \geq 46 \text{ mJ/m}^2$ .

Estudos recentes demonstraram que a componente polar da tensão superficial desempenha um papel muito importante nas interações entre superfícies (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

A hidrofobicidade das superfícies pode ainda ser quantificada pelo cálculo da energia hidrofóbica de atracção ( $\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}}$ ) através das componentes da tensão superficial, segundo a metodologia de cálculo desenvolvida por van Oss e Giese (1995). Segundo estes autores, a hidrofobicidade é expressa em termos da energia hidrofóbica de atracção e define o grau de interacção entre as moléculas de um material imerso em água. Quando a energia livre global de interacção entre as moléculas de uma superfície imersa em água é atractiva ( $\Delta G^{\text{TOT}} < 0$ ), significa que as moléculas da superfície têm menor afinidade para a água do que entre si, e neste caso é considerada hidrofóbica. Quando a energia livre global de interacção entre as moléculas de uma superfície imersa em água é suficientemente repulsiva ( $\Delta G^{\text{TOT}} > 0$ ) a superfície é considerada hidrofílica. Quanto maior for o valor absoluto de  $\Delta G^{\text{TOT}}$  mais hidrofóbica (valores negativos) ou mais hidrofílica (valores positivos) é a superfície.

#### **4.2.1 - Propriedades Superficiais das Bactérias Colonizadoras**

##### **4.2.1.1 - Quantificação Bacteriana das Suspensões Celulares**

As bactérias isoladas e identificadas que foram seleccionadas para a caracterização das suas propriedades superficiais encontram-se na Tabela 4.4.

A determinação da concentração das suspensões celulares, usadas para preparar os filmes bacterianos sobre os quais se determinou os ângulos de contacto das superfícies das bactérias com os três líquidos de polaridade diferente, foi efectuada por leitura da densidade óptica a um comprimento de onda determinado e pela contagem de bactérias cultiváveis no meio de cultura R<sub>2</sub>A. Os resultados desta quantificação bacteriana encontram-se na Tabela I.1 do Apêndice I.

Pela análise da Tabela I.1, verifica-se que a densidade óptica das suspensões celulares das diferentes espécies varia entre 0,227 e 0,287 e o número de bactérias cultiváveis varia entre  $5,20 \times 10^4$  e  $2,56 \times 10^8$  UFC/mL.

### 4.2.1.2 - Tensão Superficial das Células

Para se obter os valores da tensão superficial para cada uma das diferentes espécies presentes na água do tanque de mistura, foram medidos os ângulos de contacto das superfícies celulares com os três líquidos de polaridade diferente, anteriormente referidos. Os resultados obtidos destas medições encontram-se na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** - Valores médios dos ângulos de contacto ( $\theta$ ) determinados à temperatura ambiente sobre os filmes celulares das bactérias colonizadoras, com água ( $\theta_W$ ), formamida ( $\theta_F$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_B$ )

Espécie Bacteriana	Ângulos de Contacto (°)			
	$\theta_W$	$\theta_F$	$\theta_B$	
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	50,9 ± 2,6	45,5 ± 3,5	64,4 ± 2,4	
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	24,9 ± 1,9	22,9 ± 2,9	78,6 ± 1,4	
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	125,0 ± 4,3	118,3 ± 2,4	22,4 ± 2,3	
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	15,1 ± 1,8	21,5 ± 1,8	36,5 ± 2,0	
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	22,8 ± 1,3	37,2 ± 4,5	54,2 ± 3,0	
<i>CDC</i> gr. <i>IV C-2</i>	<u>SP1</u>	19,2 ± 1,6	39,2 ± 3,3	51,9 ± 4,7
	<u>SP2</u>	21,8 ± 3,2	34,8 ± 4,1	56,7 ± 2,4
	<u>SP3</u>	35,8 ± 2,1	38,0 ± 1,5	66,6 ± 1,5
<i>Comamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	52,0 ± 3,6	100,2 ± 8,2	51,2 ± 2,6
	<u>SP2</u>	52,5 ± 4,4	57,8 ± 4,7	39,2 ± 2,6
	<u>SP3</u>	37,4 ± 3,2	71,4 ± 2,9	62,5 ± 3,6
	<u>SP4</u>	40,0 ± 2,0	50,0 ± 2,1	75,5 ± 2,0
	<u>SP5</u>	28,2 ± 2,3	38,9 ± 2,0	57,9 ± 1,4
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	47,7 ± 2,6	47,1 ± 4,5	51,3 ± 7,9	
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	56,0 ± 2,0	63,8 ± 2,5	88,4 ± 2,1	
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	23,1 ± 3,3	30,3 ± 3,15	34,6 ± 4,5
	<u>SP2</u>	14,0 ± 3,6	25,9 ± 3,5	47,0 ± 3,3
	<u>SP3</u>	26,6 ± 3,4	36,9 ± 3,7	46,3 ± 2,1
	<u>SP4</u>	16,8 ± 3,1	24,5 ± 2,9	48,4 ± 2,3
	<u>SP5</u>	35,0 ± 2,3	44,3 ± 3,3	54,9 ± 2,4
	<u>SP6</u>	16,8 ± 1,9	27,8 ± 1,7	48,4 ± 2,2
	<u>SP7</u>	30,7 ± 2,5	33,4 ± 1,5	55,8 ± 2,3
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	41,9 ± 2,5	44,7 ± 2,4	78,3 ± 1,9	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	28,0 ± 2,1	36,2 ± 2,4	63,3 ± 2,9	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	40,4 ± 1,9	46,5 ± 1,7	86,9 ± 1,7	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	48,8 ± 1,8	47,0 ± 2,8	53,6 ± 3,2
	<u>SP2</u>	32,8 ± 3,0	32,0 ± 1,6	72,0 ± 2,1

Os valores da Tabela 4.5 mostram que, de um modo geral, os líquidos polares (água e formamida) formam ângulos menores sobre a superfície celular do que o líquido apolar ( $\alpha$ -bromonaftaleno), com a exceção das espécies bacterianas *Brevundimonas diminuta* SP1 e *Comamonas acidovorans*, estirpes SP1, SP2 e SP3, em que com o  $\alpha$ -bromonaftaleno obtém-se um menor ângulo. Estes resultados poderão indicar que estas espécies bacterianas são menos polares do que a maioria das espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura.

A partir dos valores dos ângulos de contacto determinados para cada espécie bacteriana (Tabela 4.5) é possível calcular as tensões superficiais através da metodologia de cálculo descrita no ponto 2.5.3.1. Na Tabela 4.6 estão representados os valores da tensão superficial e das suas componentes para cada uma das bactérias presentes na água do tanque de mistura.

Como se pode observar pelos valores da Tabela 4.6 as espécies bacterianas *Brevundimonas diminuta* SP1, *Comamonas acidovorans* SP1, SP2 e SP3, são apenas capazes de estabelecer interacções apolares, já que o valor da sua componente  $\gamma_b^{AB}$  é nulo. Isto vem comprovar o que anteriormente foi dito acerca destas espécies, considerando-as como menos polares pelos valores dos seus ângulos de contacto. Verifica-se, ainda, pelos valores apresentados nesta tabela, que os valores do parâmetro  $\gamma_b^-$  são muito superiores aos valores do parâmetro  $\gamma_b^+$ , para todas as espécies bacterianas. Deste modo, pode afirmar-se que todas as espécies bacterianas da água do tanque de mistura são predominantemente dadoras de electrões.

**Tabela 4.6** - Valores das componentes apolar ( $\gamma_b^{LW}$ ), polar ( $\gamma_b^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma_b^+$  e  $\gamma_b^-$ ) da tensão superficial ( $\gamma_b^{TOT}$ ) das bactérias colonizadoras

Espécie Bacteriana	Tensão superficial (mJ/m <sup>2</sup> )					
	$\gamma_b^{LW}$	$\gamma_b^+$	$\gamma_b^-$	$\gamma_b^{AB}$	$\gamma_b^{TOT}$	
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	22,8	3,1	31,2	19,7	42,5	
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	15,9	10,6	46,2	44,3	60,3	
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	41,1	0,0	2,0	0,0	41,1	
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	36,1	1,3	55,9	17,0	53,1	
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	27,9	1,4	60,9	18,2	46,1	
CDC gr. IV C-2	<u>SP1</u>	29,0	0,8	66,6	14,3	43,3
	<u>SP2</u>	26,7	2,0	59,5	21,9	48,5
	<u>SP3</u>	21,8	4,0	45,6	27,0	48,7
<i>Comamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	29,4	0,0	117,1	0,0	29,4
	<u>SP2</u>	35,0	0,0	42,1	0,0	35,0
	<u>SP3</u>	23,7	0,0	89,4	0,0	23,7
	<u>SP4</u>	17,4	3,0	51,2	24,6	42,0
	<u>SP5</u>	26,0	1,8	56,5	20,0	46,0
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	29,3	0,8	38,0	11,0	40,3	
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	11,7	3,0	40,4	21,9	33,6	
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	36,9	0,6	55,6	11,5	48,4
	<u>SP2</u>	31,4	1,8	58,9	20,7	52,1
	<u>SP3</u>	31,7	0,8	57,1	13,5	45,2
	<u>SP4</u>	30,7	2,3	56,0	22,5	53,3
	<u>SP5</u>	27,5	0,9	53,7	13,8	41,3
	<u>SP6</u>	30,7	1,8	58,3	20,6	51,4
	<u>SP7</u>	27,1	2,6	48,8	22,6	49,7
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	16,1	5,5	42,6	30,6	46,6	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	23,3	3,1	53,9	26,0	49,3	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	12,3	7,1	46,0	36,2	48,6	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	28,2	1,1	36,2	12,5	40,7
	<u>SP2</u>	19,0	6,8	44,1	34,6	53,6

#### 4.2.1.3 - Hidrofobicidade das Células

Utilizando o critério primário de avaliação qualitativa da hidrofobicidade, atrás referido, e pela análise dos valores de  $\theta_w$  da Tabela 4.5, verifica-se que a grande maioria das espécies bacterianas possui ângulos de contacto com a água inferiores a 50°, pelos que neste



caso são consideradas hidrofílicas, com a exceção das seguintes estirpes: *Acinetobacter lwoffii* SP1, *Brevundimonas diminuta* SP1, *Comamonas acidovorans* SP1, SP2 e *Flavimonas oryzihabitans* SP1, que apresentam ângulos superiores a 50°, sendo neste caso consideradas hidrofóbicas. No entanto, a única espécie que é claramente hidrofóbica é *Brevundimonas diminuta* SP1, pois as restantes têm apenas ângulos de contacto com a água ligeiramente superiores a 50°.

Recorrendo aos valores das componentes da tensão superficial calculados a partir da técnica de medição de ângulos de contacto (Tabela 4.6) para análise da hidrofobicidade, verificou-se que a única espécie que por este tipo de análise é considerada hidrofóbica é a *Brevundimonas diminuta* SP1, uma vez que o seu valor de  $\gamma_b^-$  é 2,0 mJ/m<sup>2</sup> e portanto muito inferior a 25,5 mJ/m<sup>2</sup>. Todas as outras espécies bacterianas são consideradas por este critério hidrofílicas, sendo a espécie *Comamonas acidovorans* (SP1 e SP3) de todas a mais hidrofílica.

Na Tabela 4.7 encontram-se os valores da energia livre de atracção hidrofóbica, que permitem quantificar a hidrofobicidade. Estes valores foram calculados através das equações apresentadas no ponto 2.5.3.2.

Analisando os valores da energia livre de atracção hidrofóbica apresentados na Tabela 4.7, verifica-se que, por este critério de avaliação da hidrofobicidade, a única espécie bacteriana considerada hidrofóbica é a *Brevundimonas diminuta* SP1 ( $\Delta G_{bwb}^{TOT} < 0$ ). Todas as outras espécies são hidrofílicas ( $\Delta G_{bwb}^{TOT} > 0$ ). No entanto, destas espécies as que mais se destacam pelo seu carácter mais hidrofílico são a *Comamonas acidovorans* SP1 e SP3 (maiores valores de  $\Delta G_{bwb}^{TOT}$ ) e menos hidrofílico a *Acinetobacter lwoffii* SP1 e *Aeromonas salmonicida spp. salmonicida* SP1.

Assim, pelos resultados apresentados na Tabela 4.7 da energia livre de atracção hidrofóbica, pode-se dispor as diferentes espécies bacterianas por ordem decrescente de hidrofobicidade da seguinte forma: *Brevundimonas d.* SP1 > *Acinetobacter l.* SP1 > *Aeromonas s.* SP1 > *Sphingomonas p.* SP1 > *Flavimonas o.* SP1 > *Stenotrophomonas m.* SP1 > *Moraxella l.* SP1 > *Stenotrophomonas m.* SP2 > *Escherichia c.* SP1 > *CDC gr. IV C-2* SP3 > *Methylobacterium m.* SP7 > *Comamonas a.* SP2 > SP4 > *Pseudomonas f.* SP1 > *Methylobacterium m.* SP4 > *Brevundimonas v.* SP1 > *Comamonas a.* SP5 > *Methylobacterium m.* SP6 > SP5 > SP2 > SP1 > *CDC gr. IV C-2* SP2 > *Methylobacterium m.* SP3 > *Burkholderia c.* SP1 > *CDC gr. IV C-2* SP1 > *Comamonas a.* SP3 > SP1.

**Tabela 4.7** - Valores das componentes apolar ( $\Delta G_{bwb}^{LW}$ ) e polar ( $\Delta G_{bwb}^{AB}$ ) da energia livre de atracção hidrofóbica das bactérias colonizadoras ( $\Delta G_{bwb}^{TOT}$ )

Espécie Bacteriana	Energia Livre de Atracção Hidrofóbica (mJ/m <sup>2</sup> )		
	$\Delta G_{bwb}^{LW}$	$\Delta G_{bwb}^{AB}$	$\Delta G_{bwb}^{TOT}$
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	-0,0	7,0	7,0
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	-0,9	12,5	11,6
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	-6,1	-73,4	-79,4
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	-3,6	38,0	34,4
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	-0,8	42,8	42,0
<i>CDC gr. IV C-2</i>	<u>SP1</u>	-1,0	52,0
	<u>SP2</u>	-0,5	38,7
	<u>SP3</u>	-0,0	20,8
<i>Comamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	-1,1	116,5
	<u>SP2</u>	-3,1	29,1
	<u>SP3</u>	-0,1	89,0
	<u>SP4</u>	-0,5	28,0
	<u>SP5</u>	-0,4	36,7
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	-1,1	18,6	17,5
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	-3,1	17,4	14,3
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	-4,0	41,2
	<u>SP2</u>	-1,8	38,9
	<u>SP3</u>	-1,9	41,7
	<u>SP4</u>	-1,5	34,5
	<u>SP5</u>	-0,7	37,4
	<u>SP6</u>	-1,5	38,2
	<u>SP7</u>	-0,6	26,6
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	-0,9	16,0	15,2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	-0,1	30,1	30,0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	-2,7	16,5	13,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	-0,8	15,5
	<u>SP2</u>	-0,2	15,6

Pode-se também observar por análise desta tabela que a componente apolar da energia livre de interacção entre as moléculas da superfície celular imersa em água é sempre atractiva ( $\Delta G_{bwb}^{LW} < 0$ ), sendo para algumas espécies desprezável ( $\Delta G_{bwb}^{LW} \cong 0$ ), enquanto a componente polar pode ser atractiva ou repulsiva ( $\Delta G_{bwb}^{AB} < 0$  ou  $\Delta G_{bwb}^{AB} > 0$ ) sendo neste caso para a maioria

das espécies bacterianas repulsiva. Portanto, também aqui a hidrofobicidade é predominantemente determinada pelas forças polares de atracção. A componente  $\Delta G_{\text{bwb}}^{\text{AB}}$  representa o grau de hidratação da superfície, ou seja quanto maior for o seu valor menor será a hidrofobicidade que a superfície apresenta.

Observando-se os valores de  $\Delta G_{\text{bwb}}^{\text{TOT}}$  para os diferentes isolados pertencentes à mesma espécie bacteriana verifica-se que, para as espécies *Methylobacterium mesophilicum* e *Stenotrophomonas maltophilia* não se verificam diferenças significativas entre os diferentes isolados destas espécies. Pelo contrário para as espécies *CDC gr. IV C-2* e *Comamonas acidovorans* as diferenças entre os isolados são significativas, sendo para esta última bastantes acentuadas. Isto poderá indicar como já foi anteriormente referido, que os diferentes isolados possam representar diferentes subespécies com características superficiais diferentes (van der Mei e Busscher, 1998).

Pode-se concluir que os critérios de avaliação da hidrofobicidade permitem chegar ao mesmo resultado quanto ao carácter hidrofóbico ou hidrofílico das superfícies celulares das várias espécies bacterianas, ou seja, a *Brevundimonas diminuta* SP1 é a única espécie claramente hidrofóbica.

## 4.2.2 - Propriedades Superficiais das Superfícies de Adesão

### 4.2.2.1 - Tensão Superficial

Para determinar a tensão superficial para as duas superfícies de adesão em estudo neste trabalho, foram medidos os ângulos de contacto das superfícies com os três líquidos de polaridade diferente, anteriormente referidos. Na Tabela 4.8 encontram-se os resultados destas medições.

**Tabela 4.8** - Valores médios dos ângulos de contacto ( $\theta$ ) determinados à temperatura ambiente sobre as superfícies de adesão, com água ( $\theta_{\text{W}}$ ), formamida ( $\theta_{\text{F}}$ ) e  $\alpha$ -bromonaftaleno ( $\theta_{\text{B}}$ )

Superfícies de Adesão	Ângulos de Contacto (°)		
	$\theta_{\text{W}}$	$\theta_{\text{F}}$	$\theta_{\text{B}}$
Aço 316	112,3 ± 1,6	91,1 ± 1,6	55,6 ± 1,6
PVC	117,9 ± 1,7	101,2 ± 1,6	48,9 ± 1,9

Pela análise dos valores médios dos ângulos de contacto da Tabela 4.8 verifica-se que os líquidos polares formam ângulos maiores sobre a superfície do PVC do que sobre a superfície do aço, o que poderá indicar que o aço apresenta uma maior afinidade para líquidos polares do que o PVC e, portanto, poderá ser considerado um suporte mais polar do que o PVC. Esta hipótese pode ser comprovada pelos valores das componentes da tensão superficial do aço e PVC (Tabela 4.9).

**Tabela 4.9** - Valores das componentes apolar ( $\gamma_s^{LW}$ ), polar ( $\gamma_s^{AB}$ ) e respectivos parâmetros ( $\gamma_s^+$  e  $\gamma_s^-$ ) da tensão superficial das superfícies de adesão ( $\gamma_s^{TOT}$ )

Superfícies de Adesão	Tensão superficial (mJ/m <sup>2</sup> )				
	$\gamma_s^{LW}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$	$\gamma_s^{AB}$	$\gamma_s^{TOT}$
Aço 316	27,2	0,0	0,2	0,0	27,2
PVC	30,5	0,0	0,4	0,0	30,5

Pelos valores apresentados na tabela anterior da tensão superficial e suas componentes para cada superfície de adesão, pode-se verificar que o parâmetro  $\gamma_s^-$  é superior ao parâmetro  $\gamma_s^+$  para ambas as superfícies de adesão, o que significa que estas superfícies de adesão são predominantemente dadoras de electrões, tal como a maioria das superfícies sólidas (Giese *et al.*, 1996).

#### 4.2.2.2 - Hidrofobicidade

Apresentam-se, a seguir, na Tabela 4.10 os valores da energia livre de atracção hidrofóbica, que permitem quantificar a hidrofobicidade das superfícies de adesão.

**Tabela 4.10** - Valores das componentes apolar ( $\Delta G_{sws}^{LW}$ ) e polar ( $\Delta G_{sws}^{AB}$ ) da energia livre de atracção hidrofóbica das superfícies de adesão ( $\Delta G_{sws}^{TOT}$ )

Superfícies de Adesão	Energia Livre de Atracção Hidrofóbica (mJ/m <sup>2</sup> )		
	$\Delta G_{sws}^{LW}$	$\Delta G_{sws}^{AB}$	$\Delta G_{sws}^{TOT}$
Aço 316	-0,6	-93,9	-94,5
PVC	-1,5	-88,6	-90,1

Analisando a hidrofobicidade das superfícies de adesão, aço e PVC, pelos diferentes critérios verifica-se que estas superfícies são consideradas hidrofóbicas. No entanto, pelos resultados da Tabela 4.10 pode-se concluir que a superfície de aço é ligeiramente mais hidrofóbica do que a de PVC. Estes resultados, contrariam o que anteriormente foi dito aquando da selecção dos dois materiais em estudo (Capítulo 2), uma vez que pela determinação das propriedades superficiais conclui-se que estes possuem propriedades de superfície muito semelhantes.

### 4.3 - Estudo Teórico de Previsão da Adesão Bacteriana a Superfícies

#### 4.3.1 - Capacidade de Adesão

A hidrofobicidade da superfície celular é um factor bastante importante na adesão de microrganismos a superfícies. Vários autores verificaram que um aumento da hidrofobicidade traduz-se num aumento da adesão (Masuoka *et al.*, 1997; Sinde *et al.*, 2000). Segundo estudos efectuados com bactérias em vários tipos de suportes, por Pereira *et al.* (2000), verificou-se uma relação directa entre o decréscimo de hidrofiliabilidade e o aumento da capacidade de adesão. As interacções hidrofóbicas representam uma força predominante durante o contacto inicial entre o microrganismo e a superfície, pelo que, quanto mais fortes forem estas interacções, maior é a capacidade de adesão (Ghannoum, 1992).

Assim, pelos resultados obtidos e tendo em conta os estudos já efectuados poderá dizer-se que, a espécie bacteriana *Brevundimonas diminuta* SP1 determinada como a mais hidrofóbica de entre todas as espécies presentes na água do tanque de mistura seria aquela que teria mais capacidade para aderir às superfícies. Pelo contrário, a espécie *Comamonas acidovorans* SP1 considerada como a mais hidrofílica seria a que menos probabilidades teria de aderir.

O estudo a seguir apresentado permite comprovar estas suposições à luz da teoria termodinâmica da adesão.

### 4.3.2 - Teoria Termodinâmica da Adesão

Fazendo uma abordagem termodinâmica do fenómeno de adesão entre um microrganismo, neste caso uma bactéria, e uma superfície sólida em solução aquosa e admitindo que a barreira de energia imposta pelas interacções repulsivas é ultrapassada, passando as interacções de curto alcance a assumir um papel dominante na interacção total, a variação da energia livre total de adesão considera apenas as interacções polares e apolares (Absolom *et al.*, 1983). Segundo a teoria termodinâmica a adesão será favorável se a interacção conduzir a uma diminuição da energia livre global, traduzida pela equação de Dupré (equação 2.15). Ou seja, quando a energia livre de interacção é negativa a adesão é favorável.

A partir dos valores das componentes da tensão superficial das entidades envolvidas na adesão é possível calcular a energia livre total de adesão,  $\Delta G_{\text{adesão}}$ , entre duas superfícies imersas em água recorrendo à teoria termodinâmica.

Nas Tabelas 4.11 e 4.12 são apresentados os valores de  $\Delta G_{\text{adesão}}$  entre as várias espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura e as duas superfícies de adesão em estudo neste trabalho, em meio aquoso. Estes valores foram calculados de acordo com as equações apresentadas no ponto 2.5.4 do Capítulo 2.

**Tabela 4.11** - Valores da energia livre total de interação ( $\Delta G_{adesão}$ ) entre as células bacterianas (b) e a superfície de adesão de **aco 316** (s) em meio aquoso (l) e as suas componentes apolares ( $\Delta G_{bls}^{LW}$ ) e polares ( $\Delta G_{bls}^{AB}$ )

Espécie Bacteriana	Energia Livre Total de Interação (mJ/m <sup>2</sup> )		
	$\Delta G_{bls}^{LW}$	$\Delta G_{bls}^{AB}$	$\Delta G_{adesão}$
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	-0,1	-25,2	-25,3
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	0,7	1,0	1,8
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	-1,9	-83,6	-85,5
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	-1,5	-11,9	-13,4
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	-0,7	-8,3	-9,0
<i>CDC gr. IV C-2</i>	<u>SP1</u>	-0,8	-7,4
	<u>SP2</u>	-0,5	-6,9
	<u>SP3</u>	0,0	-11,1
<i>Comamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	-0,8	11,3
	<u>SP2</u>	-1,4	-32,4
	<u>SP3</u>	-0,2	-2,4
	<u>SP4</u>	0,5	-9,7
	<u>SP5</u>	-0,5	-9,6
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	-0,8	-27,4	-28,2
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	1,4	-17,8	-16,4
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	-1,5	-15,5
	<u>SP2</u>	-1,0	-7,9
	<u>SP3</u>	-1,1	-13,4
	<u>SP4</u>	-1,0	-8,4
	<u>SP5</u>	-0,6	-15,2
	<u>SP6</u>	-1,0	-8,3
	<u>SP7</u>	-0,6	-12,4
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	0,7	-10,3	-9,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	-0,2	-7,3	-7,5
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	1,3	-4,6	-3,3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	-0,7	-27,5
	<u>SP2</u>	0,3	-6,6

**Tabela 4.12** - Valores da energia livres total de interação ( $\Delta G_{ades\tilde{a}o}$ ) entre as células bacterianas (b) e a superfície de adesão de **PVC** (s) em meio aquoso (l) e as suas componentes apolares ( $\Delta G_{bls}^{LW}$ ) e polares ( $\Delta G_{bls}^{AB}$ )

Espécie Bacteriana	Energia Livre Total de Interação (mJ/m <sup>2</sup> )		
	$\Delta G_{bls}^{LW}$	$\Delta G_{bls}^{AB}$	$\Delta G_{ades\tilde{a}o}$
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	-0,2	-23,4	-23,6
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	1,2	2,0	3,1
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	-3,0	-81,0	-84,0
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	-2,3	-9,8	-12,1
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	-1,0	-6,3	-7,3
CDC gr. IV C-2	<u>SP1</u>	-1,2	-5,2
	<u>SP2</u>	-0,8	-5,0
	<u>SP3</u>	0,0	-9,5
<i>Comamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	-1,3	14,0
	<u>SP2</u>	-2,1	-29,8
	<u>SP3</u>	-0,3	0,2
	<u>SP4</u>	0,9	-7,9
	<u>SP5</u>	-0,7	-7,7
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	-1,3	-25,2	-26,5
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	2,1	-16,0	-13,9
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	-2,4	-13,2
	<u>SP2</u>	-1,6	-6,0
	<u>SP3</u>	-1,6	-11,2
	<u>SP4</u>	-1,5	-6,5
	<u>SP5</u>	-1,0	-13,1
	<u>SP6</u>	-1,5	-6,4
	<u>SP7</u>	-0,9	-10,6
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	1,1	-8,8	-7,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	-0,3	-5,6	-5,9
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	2,0	-3,4	-1,4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	-1,1	-25,4
	<u>SP2</u>	0,5	-5,4

Analisando os valores de  $\Delta G_{ades\tilde{a}o}$  apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12 verifica-se que tanto para o aço como para o PVC as únicas espécies que apresentam uma adesão termodinamicamente desfavorável ( $\Delta G_{ades\tilde{a}o} > 0$ ) são a *Comamonas acidovorans* SP1 e a



*Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* SP1, uma vez que neste caso a adesão não conduz a uma diminuição da energia livre total. Pelo contrário, para todas as restantes espécies bacterianas a adesão a qualquer uma das superfícies é termodinamicamente favorável ( $\Delta G_{\text{adesão}} < 0$ ), sendo a espécie *Brevundimonas diminuta* SP1, a considerada como mais hidrofóbica, aquela que possui uma adesão mais favorável de acordo com a teoria termodinâmica.

Pela observação destes resultados verifica-se, também, que para qualquer das espécies bacterianas isoladas da água do tanque de mistura a adesão é mais favorável para o aço do que para o PVC, apesar das diferenças não serem muito significativas. Isto poderá ser explicado pelos diferentes valores de hidrofobicidade apresentados por estas superfícies, em que o aço foi considerado ligeiramente mais hidrofóbico do que o PVC.

Estes resultados vêm confirmar a relação entre a hidrofobicidade e a capacidade de adesão das espécies bacterianas a superfícies. Portanto, quanto mais hidrofóbicas ou menos hidrofílicas forem as superfícies interactuantes, mais favorável é a adesão. A importância do carácter hidrofóbico da superfície das células na adesão foi explicada por Busscher *et al.* (1990), que consideram que para se estabelecer uma adesão efectiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies contribui para a facilidade dessa remoção.

#### 4.4 - Conclusões

Na água potável do tanque de mistura, que contém as bactérias que colonizam o sistema de células de fluxo usado para a formação de biofilme, foi possível identificar 14 diferentes espécies bacterianas, todas elas aeróbias, Gram negativas, quimioheterotróficas e capazes de crescer em qualquer um dos meios (R<sub>2</sub>A e TSA) usados para o isolamento e quantificação bacteriana.

Da caracterização das diferentes espécies bacterianas e de alguns isolados da mesma espécie segundo as propriedades superficiais, pode-se concluir que a única espécie bacteriana da água do tanque de mistura considerada hidrofóbica foi a *Brevundimonas diminuta* SP1. Todas as restantes espécies são hidrofílicas. Destas, as consideradas como mais hidrofílicas são a *Comamonas acidovorans* SP1 e SP3 e como menos hidrofílicas a *Acinetobacter lwoffii*

SP1 e *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* SP1. Para a espécie bacteriana *Comamonas acidovorans* verificaram-se diferenças acentuadas nas propriedades superficiais dos vários isolados, o que poderá indicar que os diferentes isolados podem representar diferentes subespécies com características superficiais diferentes.

As superfícies de adesão, aço 316 e PVC, usadas para a formação de biofilme neste trabalho foram caracterizadas de acordo com as suas propriedades superficiais como hidrofóbicas, verificando-se, no entanto, que o aço 316 é ligeiramente mais hidrofóbico que o PVC.

Do estudo da previsão teórica da adesão bacteriana a superfícies verificou-se que, para qualquer das espécies bacterianas isoladas da água, a adesão é termodinamicamente mais favorável para o aço do que para o PVC. Verificou-se também que, para qualquer das superfícies de adesão, a espécie *Brevundimonas diminuta* SP1 considerada como mais hidrofóbica é aquela que possui uma adesão mais favorável de acordo com as leis da termodinâmica. Pelo contrário, a *Comamonas acidovorans* SP1, considerada como a espécie mais hidrofílica, apresenta uma adesão termodinamicamente desfavorável. Estes resultados confirmam a relação entre a hidrofobicidade e a capacidade de adesão defendida por vários autores.

## Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

---

Neste capítulo, apresenta-se um resumo das principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho experimental e algumas sugestões para futuros trabalhos.

### 5.1 Conclusões

### 5.2 Sugestões para Trabalho Futuro

---

## 5.1 - Conclusões

O estudo desenvolvido ao longo desta dissertação fornece uma ferramenta de trabalho preliminar que pode ser utilizada e comparada com trabalhos futuros. Assim, encontram-se a seguir enumeradas as principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho.

### 5.1.1 - Cinéticas de Formação de Biofilme em Sistemas de Fluxo

- O sistema de preparação de água utilizado para a formação de biofilmes nos sistemas de fluxo teve um eficiente desempenho, uma vez que possibilitou o aumento do número de bactérias cultiváveis da água conseguido em grande parte devido à remoção do cloro, permitindo desta forma que o estado estacionário nas cinéticas de formação de biofilme seja rapidamente atingido, quer sob as superfícies de aço ou PVC.

- À semelhança do que acontece em sistemas reais, as características químicas e microbiológicas da água que alimenta o sistema de células de fluxo não foram constantes ao longo do tempo, estando sujeitas às variações da qualidade da água da rede pública, pelo que a variação da qualidade da água que entra no sistema é outro factor a ter em conta no estudo das cinéticas de formação de biofilme.

- A presença de biofilme nas condutas da rede de distribuição conduz, como já era esperado, à deterioração da qualidade da água potável que chega aos consumidores, quer pela actividade metabólica das bactérias do biofilme, quer possíveis desprendimentos de parte do biofilme.

- A acumulação de biofilme na superfície das condutas da rede de distribuição de água potável é influenciada pelos vários factores em estudo neste trabalho e pela variação da qualidade da água que entra no sistema. Contudo, embora a variabilidade das características da água potável à entrada do sistema, tal como o perfil microbiológico, influencie as cinéticas de formação de biofilme, o impacte sobre o potencial de crescimento do biofilme é muito limitado, permitindo obter conclusões sobre a importância relativa de cada um dos outros factores em estudo neste trabalho. Assim, do factor mais importante para o menos importante, a acumulação de biofilme nas superfícies aumenta devido à adição de nutrientes à água, ao

uso de condições turbulentas em vez de laminares e ao uso de PVC em vez de aço inoxidável como material suporte.

- Do efeito do meio de cultura na quantificação de bactérias cultiváveis, verificou-se que o tipo de meio de cultura usado para a quantificação é um factor que influencia os valores obtidos, concluindo-se que de entre os estudados o R<sub>2</sub>A é o melhor meio de cultura para quantificação de bactérias em água potável. No entanto, mesmo este apenas permite recuperar uma pequena percentagem das bactérias presentes.

- A utilização de várias técnicas microscópicas para a visualização do biofilme “maduro” (em estado estacionário) permitiu verificar que as bactérias não são os únicos constituintes dos biofilmes. Fungos, leveduras e protozoários também podem ser encontrados. Devido ao número limitado de observações que foi possível realizar, não se podem tirar conclusões sobre a influência dos vários factores em estudo na arquitectura do biofilme.

### **5.1.2 - Identificação e Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão**

- Na água potável que alimenta o sistema de células de fluxo foi possível identificar 14 diferentes espécies bacterianas, todas elas aeróbias, Gram negativas, quimioheterotróficas e capazes de crescer em qualquer um dos meios usados (R<sub>2</sub>A e TSA) para o isolamento e quantificação bacteriana nas cinéticas de formação de biofilme.

- Da caracterização das diferentes espécies bacterianas isoladas da água segundo as propriedades superficiais pode-se concluir que, a única espécie bacteriana considerada hidrofóbica foi a *Brevundimonas diminuta* SP1. Todas as restantes espécies identificadas são hidrofílicas. Destas, as consideradas como mais hidrofílicas são a *Comamonas acidivorans* SP1 e SP3 e como menos hidrofílicas a *Acinetobacter lwoffii* SP1 e *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* SP1. As superfícies de adesão usadas neste trabalho, aço 316 e PVC, foram caracterizadas de acordo com as suas propriedades superficiais como hidrofóbicas, sendo, no entanto, o aço 316 ligeiramente mais hidrofóbico que o PVC.

- Do estudo da previsão teórica da adesão bacteriana a superfícies por aplicação da teoria termodinâmica da adesão pode-se concluir que, para qualquer das espécies bacterianas isoladas da água potável, a adesão é termodinamicamente mais favorável para o aço do que para o PVC. A espécie *Brevundimonas diminuta* SP1 considerada como mais hidrofóbica é aquela que possui uma adesão mais favorável de acordo com as leis da termodinâmica, para

qualquer das superfícies de adesão. Pelo contrário, a *Comamonas acidivorans* SP1, considerada como a espécie mais hidrofílica, apresenta uma adesão termodinamicamente desfavorável, confirmando estes resultados a relação entre a hidrofobicidade e a capacidade de adesão defendida por vários autores.

## 5.2 - Sugestões para Trabalho Futuro

Ao longo da execução experimental deste trabalho foi-se notando a necessidade e o interesse pela recolha crescente de informação sob o tema abordado nesta dissertação. Contudo, devido a limitações de tempo e de material disponível, não foi possível a sua concretização. Assim, pensa-se que seria de todo o interesse:

- Estudar a influência da concentração de nutrientes da água na intensidade do sinal, aquando da detecção e enumeração de bactérias por microscopia de epifluorescência por coloração com DAPI.
- Aprofundar o estudo da arquitectura dos biofilmes “maduros” (em estado estacionário) formados em diferentes condições experimentais pelas técnicas microscópicas abordadas neste trabalho e outras vulgarmente utilizadas para o estudo dos biofilmes.
- Estudar a influência da acção biocida de vários desinfectantes na prevenção e eliminação de biofilmes em sistemas de distribuição de água potável.
- Avaliar o potencial de crescimento do biofilme após desinfecção.
- Estudar o comportamento de microrganismos com potencial patogénico para o homem quando inoculados em sistemas com biofilmes de água potável previamente formados.
- Identificação das espécies bacterianas, por técnicas de biologia molecular (PCR - Polimerase Chain Reaction e Sequenciação de rDNA 16S).
- Fazer ensaios de adesão estática das várias espécies bacterianas identificadas a diferentes superfícies de adesão por forma a seleccionar superfícies menos propícias à adesão bacteriana.
- Estudar o efeito de diferentes condicionantes de superfície na formação de biofilme.
- Estudar as interacções inter-espécies no processo de formação de biofilme.

## Bibliografia

Absolom, D. R.; Lamberti, F. V.; Policova, Z.; Zing, W.; van Oss, C. J. and Neuman; A. W. (1983). "Surface Thermodynamics of Bacterial Adhesion". *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 90-97.

Adamson, A. W. (1982). "Physical Chemistry of Surfaces". Wiley-Interscience, New York.

Alcantra, F.; Cunha, M. A.; Almeida M. A., (1996). "Microbiologia – Práticas Laboratoriais". Universidade de Aveiro, Portugal.

Alegre, Helena (1994). "Estatística Aplicada ao Controle de Qualidade da Água em Redes de Distribuição"; Recursos Hídricos, vol. 16 n.º2.

Antunes, F. (1999). "Biofilmes em Sistemas de Distribuição de Água Potável". Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal.

APHA, AWWA, WEF, (1995). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 19<sup>th</sup> edition, Eaton, A. D.; Clesceri L. S. e Greenberg, A. E.. American Public Health Association, Washington DC, USA.

Azeredo, J. (1998). "Adesão de Microrganismos e Composição da Matriz de Bioagregados. Desenvolvimento de Técnicas e Estudo da Influência de Exopolímeros". Tese de Doutoramento, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal.

Azeredo, J.; Lazarova, V. e Oliveira, R. (1999). "Methods to Extract the Exopolymeric Matrix from Biofilms: a Comparative Study". *Water Science and Technology*, **39** (7), 243-250.

Azeredo, J. and Oliveira R. (1999). "Exopolymers in Bacterial Adhesion: Interpretation in Terms of DLVO and XDLVO Theories". *Coll Surf B: Biont*, **14**, 141-148.

Azeredo, J. and Oliveira, R. (2000). "The Role of Exopolymers Produced by *Sphingomonas paucimobilis* in Biofilm Formation and Composition". *Biofouling*, **16** (1), 17-27.

Azeredo, J. and Oliveira R. (2000). "The Role of Exopolymers in the Attachment of *Sphingomonas paucimobilis*". *Biofouling*, **16**, 59-67.

Azevedo, N. F.; Vieira, M. J. and Keevil, C. W (2003). "Establishment of a Continuous Model System to Study *Helicobacter pylori* Survival in Potable Water Biofilms". *Water Science and Technology*, **47** (5), 155–160.

Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1986). "Biochemical Engineering Fundamentals". New York: McGraw-Hill Book Company.

Bakke, R.; Trulear, M. G.; Robinson, J. A. and Characklis, W. G. (1984). "Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Steady State". *Biotech. and Bioeng.*, **26**, 1418-1424.

Bellon-Fontaine, M.; Rault, J. and van Oss, C. J. (1996). "Microbial Adhesion to Solvents: a Novel Method to Determine the Electron-donor/Electron-Acceptor or Lewis Acid-Base Properties of Microbial Cells". *Coll. Surf. B: Bioint.*, **7**, 47-53.

Boe-Hansen, R.; Albrechtsen, H. J.; Arvin, E. and Jorgensen, C. (2002). "Bulk Water Phase and Biofilm Growth in Drinking Water at Low Nutrient Conditions". *Water Res*, Vol. **36**, Nº 18, 4477-4486.

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.

Brex, M.; Theilade, J. and Attstrom, R., (1983). "An Ultrastructural Quantitative Study of the Significance of Microbial Multiplication During Early Dental Plaque Growth". *J. Periodontal Res.*, **18**, 177-186.

Bryers, J. D. (1983). "Modelling Biofilm Accumulation". In: Bazin, M. Y. and Prosser, J. I. eds. *Physiological Models in Microbiology*, Boca Raton: CRC, **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. and 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. and 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.

Buckman (1997). Página da Buckman da Internet (webmaster@buckman.com).

Busscher, H. J. (1984). "Surface Free Energies and the Adhesion of Oral Bacteria". PhD Thesis, Groningen University, Netherlands.

Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H.; van der Mei, H. C.; van Pelt, A. W.; De Jong, H. P.; Arends, J. (1984). "Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surface and its Relevance for Adhesion". *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 980-983.

Busscher, H. J.; Sjollem, J. and van der Mei, H. (1990). "Relative Importance of Surface Free Energy as a Measure of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion to Surfaces". *In: Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (Eds). Microbial cell surface hydrophobicity*. American Society of Microbiology, Washington, D. C..

Busscher, H. J.; Bos, R. and van der Mei, H. C. (1995). "Initial Microbial Adhesion is a Determinant for the Strength of Biofilm Adhesion". *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 229-234.

Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lawrence, J. R. (1992). "Imaging of Bacterial Cells by Fluorescence Exclusion Using Confocal Laser Microscopy". *J. Microbiol. Methods*, **15**, 249.

Camper, A. C.; Jones, W. L. and Hayes, J. T. (1996). "Effect of Growth Conditions and Substratum Composition on the Persistence of Coliforms in Mixed Population Biofilms". *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4014-4018.

- Carballo, J.; Ferreirós, C. M. and Criado, M. T. (1992). "Factor Analysis in the Evaluation of the Relationship Between Bacterial Adherence to Biomaterials and Changes in Free Energy". *J. Biomater. Appl.*, **7**, 130-141.
- 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.
- Chamberlain, A. H. L. and Johal, S. (1988). "Biofilms on Meat Processing Surfaces". In *Biodeterioration*, **7**, 57-61. London. Elsevier Applied Science.
- Characklis, W. G. (1981). "Fouling Biofilm Development: a Process Analysis". *Biotech. Bioeng.*, **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. and Cooksey, K. E. (1983). "Biofilms and Microbial Fouling". *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 93-138.
- Characklis, W. G. and Wilderer, P. A. (1989). "Structure and Function of Biofilms". John Wiley & Sons, Chichester.
- Characklis, W. G. and Marshall, K. C. (1989). "Biofilms". *Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, N. Y., 642, 655, 659, 662.
- Characklis, W. G. and 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. and 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. and 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.

Chaves, L (1999). “Controlo da Qualidade da Água para Abastecimento Público”. Relatório de Estágio, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal.

Christensen, B. E.; Characklis, W. G. (1990). “Physical and Chemical Properties of Biofilms”. In: Characklis, W. G, Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: Jonh Wiley and Sons, Inc, 93-130.

Connell, G.F. (1996). “The Chlorination/Cloramination Handbook”. Water Desinfection Series, 28-29 e 33-34.

Costanzo, P. M.; Giese, R. F. and van Oss, C. J. (1990). “Determination of the Acid-Base Characteristics of Clay Mineral Surfaces by Contact Angle Measurements-Implications for the Adsorption of Organics Solutes from Aqueous Media”. *J. Adh. Sci. Technol.*, **4**, 267-275.

Costerton, J. W.; Irving, R. T. and Chen, K. J. (1981). “The Bacterial Glycocalix in Nature and Disease”. *Annu Rev. Microbiol.*, **35**, 299-304.

Cruickshank, R. (1985). “Microbiologia Médica”. Gulbenkian, Lisboa, 1016-1031.

Derjaguin, B. V. and Landau, L. (1941). *Acta Physicochemistry URSS*, 14, 633-662. Referido por Oliveira (1990).

Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (1990). “Microbial Cell Surface Hydrophobicity”. American Society of Microbiology, Washington, D. C..

Duddriege, J. E.; Cent, C. A.; Laws, J. E. (1982). “Effect of Surface Shear Stress on the Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to Stainless Steel under Defined Flow Conditions”. *Biotech. Bioeng.*, **24**, 153-164.

Dunsmore, B. C.; Jacobsen, A.; Hall-Stoodley, L.; Bass, C. J.; Lappin-Scott, H. M. and Stoodley, P. (2002). “The Influence of Fluid Shear on the Structure and Material Properties of Sulphate-Reducing Bacterial Biofilms”. *J Ind Microbiol Biot*, Vol. **29**, Nº 6, 347-353.

- Elimelech, M.; Gregory, J.; Jia, X. and Williams, R. (1995). "Particle Deposition and Aggregation-Measurements, Modelling and Simulation". Colloid and Surface Engineering Series, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford.
- Erner, B. and Douglas L. J. (1992). "Correlation Between Cell-Surface Hydrophobicity of *Candida albicans* and Adhesion to Buccal Epithelial Cells". FEMS Microbial Lett, **78**, 37-42.
- Evans, R. C. and Holmes, C. J. (1987). "Effect of Vancomycin Hydrochloride on *Staphylococcus epidermis* Biofilm Associated with Silicone Elastomer". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **31**, 889-894.
- Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. (1998). "Microbiologia Volume I". Lidel, Edições Técnicas Lda..
- Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. (2000). "Microbiologia Volume II". Lidel, Edições Técnicas Lda..
- Flemming, H-C., (1991). "Biofouling in Water Treatment". In: Flemming, H-C and 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 and Geesey, G. G. eds. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems, Heidelberg, Springer-Verlag, 1-7.
- Flemming, H-C., (1993). "Biofilms and Environmental Protection". Water Science and Technology, **27** (7-8), 1-10.
- Flemming, H-C.; Wingender, J. (1999). "Extracellular Polimeric 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. and Capdeville, B. eds. Biofilms – Science and Technology. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 113-124.

- Fletcher, M. and Loeb, G. I. (1979). "Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of Marine *Pseudomonas* to Solid Surfaces". *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 62-72.
- Flint, S. H.; Brooks, J. D. and Bremer, P. J. (1997). "The Influence of Cell Surface Properties of Thermophilic Streptococci on Attachment to Stainless Steel". *J. Appl. Microbiol.*, **83**, 508-517.
- Foschino, R.; Nervegna, I.; Motta, A. and Galli, A. (1998). "Bactericidal Activity of Chlorine Dioxide against *Escherichia coli* in Water and on Hard Surfaces". *Journal of Food Protection*, **61**, 668-672.
- Fowkes, F. M. (1964). "Contact Angle – Wettability and Adhesion". American Chemical Society, Washington.
- Fowkes, F. M.; McCarth W. A. and Mostafa M. A. (1980). *J. Colloid Int. Sci.*, **78**, 200. Referido por van Oss (1994).
- Fowkes, F. M. (1987). *J. Adhesion Science Technology*, **1**, 7. Referido por van Oss (1994).
- Frias, J.; Ribas, F. and Lucena, F. (2001). "Effects of Different Nutrients on Bacterial Growth in a Pilot Distribution System". *Anton Leeuw Int J G*, **80** (2), 129-138.
- Frolund, B.; Palmgren, R.; Keiding, K.; Nielsen, P. H. (1996). "Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange". *Water Research*, **30**, 1749-1758.
- Geldreich, Edwin E. (1990). "Microbiological Quality of Source Waters for Water Supply, In: *Drinking Water Microbiology*", Gordon A. McFeters Editor, Springer-Verlag, N. Y. Inc.; 15.
- Ghannoum, M. A.; Filler, S. C.; Ibrahim, A. S.; Fu Y. and Edwards J. J. E. (1992). "Modulation of Interactions of *Candida albicans* and Endothelial Cells by Fluconazole and Amphotericin B". *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 2239-2244.
- Giese Jr., R. F.; Wu, W.; van Oss, C. J. (1996). "Surface and Electrokinetics Properties of Clay and Other Mineral Particles, Untreated and Treated with Organic Solvents". *J. Dispersion Science and Technology*, **17**, 527-547.

Gilbert, P. and 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). "Biofilm Development: Growth versus Detachment". Dissertação de Doutorado. Delft: Technische Universiteit Delft, Netherlands.

Goodwin, J. A. and Foster, C. F. (1985). "A Further Examination into the Composition of Activated Sludge Surfaces in Relation to their Settlement Characteristics". *Water Research*, **19**, 527-533.

Govan, J. R. W. e Deretic, V. (1996). "Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*". *Microbiological Reviews*, **60**, 539-574.

Harkes, G.; Dankert, J. and Feijen, J. (1992). "Growth of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains at Solid Surfaces". *Journal of Biomaterial Science – Polymer Edition*, **3**, 403-418.

Haudidier, K.; Paquin, J. L.; Frabcais, T. *et al.* (1988). "Biofilm Growth in a Drinking Water Network: a Preliminary Industrial Pilot Plant Experiment". *Water Science and Technology*, **20**, 109-115.

Holden, B.; Greetham, M.; Croll, B. T. and Scutt, J. (1995). "The Effect of Changing Inter Process and Final Disinfection Reagents on Corrosion and Biofilm Growth in Distribution Pipes". *Water Science and Technology*, **32** (8), 213-220.

Holloway, B. W. (1996). "*Pseudomonas* Genetics and Taxonomy". Em: *Molecular Biology of Pseudomonads* (T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas, S. Silver, eds), ASM Press, Washington DC, 22-32.

Hood, S. K. and Zottola, E. A. (1995). "Biofilms in Food Processing". *Food Contr.*, **6**, 9-18.

Horan, N. J. and Eccles. C. R. (1986). "Purification and Characterization of Extracellular Polysaccharide from Activated Sludges". *Water Research*, **20**, 1427-1432.

Huang, C-T.; Peretti, S. W. and Bryers, J. D. (1992). "Use of Flow Cell Reactors to Quantify Biofilm Formation Kinetics". *Biotechnology Techniques*, **6**, 193-198.

- Hunter, R. J. (1988). "Zeta Potencial". In: Ottewill, R. and Rowell, R. (Eds). Colloid Science, Principles and Applications. Colloid Science Academic Press, London.
- Jahn, A. and Nielsen, P. H. (1995). "Extraction of Extracellular Polymeric Substances from Biofilme Using a Cation Exchange Resin". Water Science and Technology, **32**, 157-164.
- Johnson, R. E.; Dettre, R. H. and Brandeth, D. A. (1977). J. Colloid Interface Sci., **62**, 205. Referido por van Oss (1994).
- Jones, C. R.; Handley, P. S.; Robson, G. D.; Eastwood, I. M. and Greenhalgh, M. (1996). "Biocides Incorporated into Plasticized Polyvinylchloride Reduce Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* BL146 and Substratum Hydrophobicity". Journal of Applied Bacteriology, **81**, 553-560.
- Jones, C. R.; Adams, M. R.; Zhdan, P. A. and Chamberlain, A. H. L. (1999). "The Role of Surface Physicochemical Properties in Determining the Distribution of the Autochthonous Microflora in Mineral Water Bottles". Journal of Applied Microbiology, **86**, 917-927.
- Keevil, C. W. and Walker, J. T. (1992). "Nomarski DIC Microscopy and Image Analysis of Biofilms". Binary, **4**, 93-95.
- Kerr, C. J; Osborn, K. S.; Robson G. D. and Handley, P. S. (1999). "The Relationship Between Pipe Material and Biofilm Formation in a Laboratory Model System". Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, **85**, 29S-38S.
- Kiéne, L.; Lu, W.; Lévi, Y. (1998). "Relative Importance of the Phenomena Responsible for Chlorine Decay in Drinking Water Distribution Systems". Water Science Technology, **38** (6), 219-227.
- Kim, S. W.; Kim, P. and Kim, J. H. (1999). "Production of Poly(3-hidroxybutyrate-co-3-hidroxyvalerate) from *Methylobacterium organophilum* by Potassium-Limited Fed-Batch Culture". Enzyme and Microbial Technology, **24** (8-9), 555-560.
- Lappin-Scott, H. M.; Jass, J. and 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.

- LeChevallier, M. W.; Babcock, T. M. and Lee, R. G. (1987). "Examination and Characterisation of Distribution System Biofilms". *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2714-2724.
- LeChevallier, M. W.; Hassenauer, T. S.; Camper, A. L. and McFeters, G. A. (1984). "Disinfection of Bacteria Attached to Granular Activated Carbon". *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 918-923.
- LeChevallier, M. W. e McFeters, G. A. (1985). "Interactions between Heterotrophic Plate Count Bacteria and Coliform Organisms". *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1338-1341.
- MacNab, R. M. (1987). *E. coli* and *Salmonella typhimurim*. In: Neidhardt, F. C. (Ed). *Cellular and Molecular Biology*. American Society of Microbiology, Washington D. C., 70-83.
- Marshall, K. C. (1976). "Interfaces in Microbial Ecology". Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.
- Marshall, K. C. (1980). "Adsorption of Microorganisms to Surfaces". John Wiley & Sons, New York.
- Marshall, K. C. and 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, 29-45.
- Masuoka, J. and Hazen, K. C. (1997). "Cell Wall Protein Mannosylation Determines *Candida albicans* Cell surface Hydrophobicity". *Microbiology*, **143**, 3015-3021.
- Mattila-Sandholm, T. and Wirtanen, G. (1992). "Biofilm Formation in the Industry: a Review. *Food Ver. Int.*, **8**, 573-603.
- Maul, A.; Vagost, D.; Block J. C. (1989). "Stratégies d'Échantillonnage pour Analyse Microbiologique sur Réseaux de Distribution d'Eau – Méthodes et Programmes Informatiques"; *Technique et Documentation – Lavoisier*.
- McEldowney, S. and Fletcher, M. (1986). "Effect of Growth Conditions and Surface Characteristics of Aquatic Bacteria on their Attachment to Solid Surfaces". *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 417-423.



- McCoy, W. F.; Bryers, J. D.; Robbins, J. and Costerton, J. W. (1981). "Observations in Fouling Biofilm Formation". *Canadian Journal of Microbiology*, **27**, 910-917.
- Melo, L. F.; Bott, T. R. and Bernardo, C. A. (1988). "Fouling Science and Technology". NATO ASI Series. Series E: Applied Sciences – Vol. 145, 125-140. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Melo, L. F. (1994). "Biofilmes e o Controlo da Poluição". *Boletim de Biotecnologia*, **48**, 16-25.
- 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. and White, D. C. (1992). "Multipurpose Laminar-Flow Adhesion Cells for the Study of Bacterial Colonization and Biofilm Formation. *Biofouling*, **6**, 39-51.
- Miyake, Y.; Fujita, Y.; Minagi, S. and Suginaka, H. (1986). "Surface Hydrophobicity and Adherence of *Candida* to Acrylic Surfaces". *Microbios*, **46**, 7-14.
- Morin, P.; Camper, A.; Jones, W.; Gatel, D. and Goldman, J. C. (1996). "Colonization and Disinfection of Biofilms Hosting Coliform-Colonized Carbon Fines". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **62**, Nº 12, 4428-4432.
- Morin, P. and Camper, A. K. (1997). "Attachment and Fate of Carbon Fines in Simulates Drinking Water Distribution System Biofilms". *Wat. Res.*, Vol. **31**, Nº 3, 399-410.
- 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.; Marshall, K. C. (1990). "Bacterial Polymers: Physicochemical Aspects of their Interactions at Interfaces". *J. Biomater. Appl.*, **5**, 107-133.
- Neu, T. R.; van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. (1992). "Biofilms Associated with Health". In: Melo, L. F. *et al.* (Eds). *Biofilms-Science and Technology*. NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 21-34.

- Nickel, J. C.; Ruseska, I.; Wright, J. B. and 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. (1996). "Conceptual Model for Production and Composition of Exopolymers in Biofilms". Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International IAWQ Special Conference on Biofilm Systems. Copenhagen, Denmark.
- Nikawa, H.; Sadamori, S.; Hamada, T.; Satou, N. and Okuda, K. (1989). "Non-Specific Adhesion of Candida Species to Surface-Modified Glass". *J. Med. Vet. Mycol.*, **27**, 269-271.
- Niquette, P.; Servais, P. and Savoie, R. (2000). "Impacts of Pipe Materials on Densities of Fixed Bacterial Biomass in a Drinking Water Distribution System". *Water Research*, Vol. **34**, N° 6, 1952-1956.
- Nivens, D. E.; Palmer, R. J. Jr and White, D. C. (1995). "Continuous Nondestructive Monitoring of Microbial Biofilms: a Review of Analytical Techniques". *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 263-276.
- Oliveira, D. R. (1990). "Sujamento por Partículas em Solução Aquosa – Interações Superficiais". Tese de Doutorado, Universidade do Minho, Portugal.
- Ollos, P. J.; Slawson, R. M. and Huck, P. M. (1997). "Modelling of Biofilm Accumulation in Drinking Water distribution Systems". In Proceedings of AWWA Water Quality Technology Conference, 9-12 November. Denver: American Waterworks Association.
- Pallant, Julie (2001). "SPSS Survival Manual – A step by step guide to data analysis using SPSS for Windows (Versions 10 and 11)". Open University Press, Buckingham, Philadelphia.
- Panagoda, G. J.; Ellepola, A. N. and Samaranayake, L. P. (1998). "Adhesion to Denture Acrylic Surfaces and Relative Cell Hydrophobicity of *C. parapsilosis* and *C. albicans*". *APMIS*; **106**, 736-742.
- Pashley, R. M. and Israelachvili, J. N. (1984). "DLVO and Hidratation Forces Between Mica Surfaces in Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> Chloride Solutions". *J. Coll. Int. Sci.*, **97**, 446-455.

- Pedersen, K. (1990). "Biofilm Development on Stainless Steel and PVC Surfaces in Drinking Water". *Wat. Res.*, Vol. **24**, Nº 2, 239-243.
- Percival, S. L.; Knapp, J. S.; Edyvean, R. G. J.; Wales, D. S. (1998). "Biofilms, Mains Water and Stainless Steel". *Wat. Res.*, Vol. **32**, Nº 7, 2187-2201.
- Pereira, M. A.; Alves, A. A.; Azeredo, J.; Mota, M. and Oliveira, R. (2000). "Influence of Físico-chemical Properties of Porous Microcarriers on the Adhesion of a Anaerobic Consortium". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **24**, 181-186.
- Pereira, M. O. (2001). "Comparação da Eficiência de Dois Biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em Sistemas de Biofilme". Tese de Doutoramento, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal.
- Pereira, M. O.; Kuehn, M.; Wuertz, S.; Neu, T. and Melo, L. F. (2002a). "Effect of Flow Regime on the Architecture of a *Pseudomonas fluorescens* Biofilm". *Biotechnol. Bioeng.* **78**(2), 164-171.
- Pereira, M. O.; Morin, P.; Vieira, M. J. and Melo, L. F. (2002b). "A Versatile Reactor for Continuous Monitoring of Biofilm Properties in Laboratory and Industrial Conditions". *Letters in Applied Microbiology*, **34**(1), 22-26.
- Quirynen, M.; Marechal, M.; Busscher, H. J. *et al.* (1990). "The Influence of Surface-Free Energy and Surface Roughness on Early Plaque Formation – an *in vivo* Study in Man". *Journal of Clinical Periodontology*, **17**, 138-144.
- Quirynen, M.; van der Mei, H. C.; Bollen, C. M. L.; Geertsema-Doornbusch, G. I.; Busscher, H. J.; van Steenberghe, D. (1994). "Clinical Relevance of the Influence of Surface Free Energy and Roughness on the Supragingival and Subgingival Plaque Formation in Man". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2**, 25-31.
- Quirynen, M. and Bollen, C. M. L. (1995). "The Influence of Surface Roughness and Surface-Free Energy on Supra- and Subgingival Plaque Formation in Man". *Journal of Clinical Periodontology*, **22**, 1-14.

- Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E. (1985). "A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **49**, N° 1, 1-7.
- Reid, G., Lam, D.; Bruce, A. W.; van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. (1994). "Adhesion of Lactobacilli to Urinary Catheters and Diapers: Effect of Surface Properties". *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 731-734.
- Rittmann, B. E. (1989). "Detachment from Biofilms". In: Characklis, W. G. and Wilderer, P. A. eds. *Structure and Function of Biofilms*. Dahlem Workshop, John Wiley and Sons, Inc, 49-58.
- Rogers, J.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V. and Keevil, C. W. (1994a). "Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella-Pneumophila* in Potable Water-Systems". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **60**, N° 6, 1842-1851.
- Rogers, J.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V. and Keevil, C. W. (1994b). "Influence of Temperature and Plumbing Material Selection on Biofilm Formation and Growth of *Legionella-Pneumophila* in a Model Potable Water-System Containing Complex Microbial-Flora". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **60**, N° 5, 1585-1592.
- Saby, S.; Sibille, I.; Mathieu, L.; Paquin, J. L. and Block, J. C. (1997). "Influence of Water Chlorination on the Counting of Bacteria with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **63**, N° 4, 1564-1569.
- Sinde, E. and Carballo, J. (2000). "Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Rubber and Polytetrafluorethylene: the Influence of Free Energy and the Effect of Commercial Sanitizers". *Food Microbiology*, **17**, 439-447.
- Sousa, M.; Azeredo, J.; Feijó, J. and Oliveira R. (1997). "Polymeric Supports for the Adhesion of a Consortium of Autotrophic Nitrifying Bacteria". *Biotech. Techn.*, **11**, 755-758.
- Stanier, R. Y; Adelberg, E. A. and Ingraham, J. L. (1983). "General Microbiology". MacMillan Press, London.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis M. L.; Painter, P. R. (1991). "Microbiologia 2ª Ed.". Editorial Reverté, S. A..

Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis M. L.; Painter, P. R. (1995). "General Microbiology, 5<sup>th</sup> Edition". MacMillan Press, London, 207-209.

Stenstrom, T. A. (1989). "Bacterial Hydrophobicity, an Overall Parameter for the Measurement of Adhesion Potential to Soil Particles". *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 142-147.

Surman, S. B.; Walker, J. T.; Goddard, D. T.; Morton L. H. G.; Keevil, C. W.; Weaver, W.; Skinner, A.; Hanson, K.; Caldwell, D.; Kurtz J. (1996). "Comparison of Microscope Techniques for the Examination of Biofilms". *Journal of Microbiological Methods*, **25**, 57-70.

Taylor, R. L.; Verran, J.; Lees, G. C. and Ward, A. J. P. (1998). "The Influence of Substratum Topography on Bacterial Adhesion to Polymethylmethacrylate" *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, **9**, 17-22.

Teixeira, P.; Azeredo, J.; Oliveira, R. and Chibowski (1998). "Interfacial Interactions Between Nitrifying Bacteria and Mineral Carriers in Aqueous Media Determined by Contact Angle Measurements and Thin Layer Wicking". *Colloids and Surface B. Biointerfaces*, **12**, 69-75.

Teixeira; P. and Oliveira, R. (1999). "Influence of Surface Characteristics on the Adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to Polymeric Substrates". *J. Adhesion Sci. Technol.*, **13**, 1243-1362.

Van der Kooij, D. (1992). "Assimilable Organic-Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth". *J Am Water Works Ass*, **84** (2), 57-65.

van der Mei, H. C.; Weerkamp, A. H.; Busscher, H. J. (1987). "A Comparison of Various Methods to Determine Hydrophobic Properties of Streptococcal Cell surfaces". *J. Microbiol. Methods*, **6**, 277-285.

van der Mei, H. C.; Bos, R.; Busscher, H. J. (1998). "A Reference Guide to Microbial Cell Surface Hydrophobicity Based on Contact Angles". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **11**, 213-221.

Van der Wende, E.; Characklis, W. G. and Smith, D. B. (1989). "Biofilms and Bacterial Drinking Water Quality". *Water Research*, **23**, 1313-1322.

- Van der Wende, E. and Characklis, W. G. (1990). "Biofilms in Potable Water Distribution Systems". In: Drinking Water Microbiology, Gordon A. McFeters Editor, Springer-Verlag, N. Y. Inc.; 250-268.
- Vandevivere, P. and Kirchman, D. L. (1993). "Biofilm Development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-N Rubber". Food Prot.. **56**, 750-758.
- van Loosdrecht, M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Scraa, G. and Zehnder, A. (1987). "The Role of Bacterial Cell Hydrophobicity in Adhesion". Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1893-1897.
- van Loosdrecht, M. (1988). "Bacterial Adhesion". PhD Thesis, Agriculture University of Wageningen, Wageningen, Netherlands.
- van Loosdrecht, M.; Lyklema, J.; Norde, W. and Zehnder, A. (1989). "Bacterial Adhesion: a Physicochemical Approach". Microbial Ecology, **17**, 1-15.
- van Loosdrecht, M.; Norde, W.; Lyklema, L. and Zehnder, J. (1990). "Hydrophobic and Electrostatic Parameters in Bacterial Adhesion". Aquatic Sci., **51**, 103-114.
- van Oss, C. J.; Chaudhury, M. K.; Good, R. J. (1987). "Monopolar Surfaces". Adv. Coll. Int. Sci.; **28**, 35-64.
- van Oss, C. J.; Good, R. J.; Chaudhury, M. K. (1988). "Additive and Nonadditive Surface Tension Components and the Interpretation of Contact Angles". Langmuir, **4**, 884-891.
- van Oss, C. J. and Good, R. J. (1989). "Surface Tension and the Solubility of Polymers and Biopolymers; the Role of Polar and Apolar Interface Free Energy". J. Macromol. Sci. Chem. **A26** (8), 1183-1203.
- van Oss, C. J.; Ju, L.; Chaudhury, M. K. and Good, R. J. (1989). "Estimation of the Polar Parameters of the Surface Tension of Liquids by Contact Angle Measurements on Gels". J. Coll. Int. Sci., **128**, 313-319.
- van Oss, C. J.; Giese, R. F.; Li, Z.; Murphy, K.; Norris, J.; Chaudhury, M. K. and Good, R. J. (1992). J. Adh. Sci. Tech., **6**,413. Referido por van Oss (1994).

- van Oss, C. J. (1994). "Interfacial Forces in Aqueous Media". Marcel Dekker, Inc., New York.
- van Oss, C. J. and Giese, R. F. (1995). "The Hydrophilicity and Hydrophobicity of Clay Minerals". *Clay Minerals*, **43**, 474-477.
- van Oss, C. J. (1997). "Hydrophobicity and Hydrophilicity of Biosurfactants". *Curr. Opinion Coll. Int. Sci.*, **2**, 503-512.
- Verran, J. and Taylor, R. (1995). "The Effect of Surface Roughness and Conditioning on Adhesion." In: *The Life and Death of a Biofilm*. Ed. Wimpenny, J., Handley, P., Gilbert and Lappin-Scott, H.. pp 53-59. Cardiff: Bioline.
- Verran, J. and Maryan, C. J. (1997). "Retention of *Candida albicans* on Acrylic Resin and Silicone of Different Surface Topography". *Journal of Prosthetic Dentistry*, **77**, 535-539.
- Verwey, E. J. and Overbeek, J. (1948). "Theory of the Stability of Lyophobic Colloids". Elsevier, Amsterdam.
- Vieira, M. J. (1995). "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". Dissertação de Doutoramento. Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Vieira, M. J.; Melo, L. F. and Pinheiro, M. M. (1993). "Biofilm Formation: Hydrodynamic Effects on Internal Diffusion and Structure". *Biofouling*, **7**, 67-80.
- Volk, C. J. and LeChevallier, M. W. (1999). "Impacts of the Reduction of Nutrient Levels on Bacterial Water Quality in Distribution Systems". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **65** N° 11, 4957-4966.
- Walker, J. T. & Keevil, C. W. (1994). "Study of Microbial Biofilms Using Light Microscope Techniques". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 223-236.

Walker, J. T.; Mackerness, C. W.; Rogers, J.; Keevil, C. W. (1995). "Heterogeneous Mosaic Biofilm – A Haven for Waterborne Pathogens". In: Microbial Biofilms, Series Editor J. M. Lynch, Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, 196-204.

Wasche, S.; Horn, H. and Hempel, D. C. (2002). "Influence of Growth Conditions on Biofilm Development and Mass Transfer at the Bulk/Biofilm Interface". Water Research, Vol. **36**, N° 19, 4775-4784.

Wilcox, M. H. (1993). "Medical Devices-Associated Adhesion". In: Denyer and Gorman (Eds). Microbial Biofilms Formation and Control. Blackwell Scientific Publications, London, 113-146.

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.

Yamauchi, M.; Yamamoto, K.; Wakabayashi, M. and Kawano, J. (1990). "In vitro Adherence of Microorganisms to Denture Base Resin with Different Surface Texture". Dental Materials Journal, **9**, 19-24.

Zacheus, O. M. and Martikainen, P. J. (1997). "Efficiency of Medium Containing a Low Concentration of Organic Nutrients in the Enumeration of Thermophilic Bacteria from Hot Water". Cytobios, **92** (370-71), 149-157.

Zacheus, O. M.; Iivanainen, E. K.; Nissinen, T. K., Lehtola; M. J. and Martikainen, P. J. (2000). "Bacterial Biofilm Formation on Polyvinyl Chloride, Polyethylene and Stainless Steel Exposed to Ozonated Water". Water Research, Vol. **34** N° 1, 63-70.



## **Apêndices**

---

Apêndice I – Caracterização das Bactérias Colonizadoras e Caracterização das Superfícies de Adesão

---

### I.1 – Quantificação Bacteriana das Suspensões Celulares

Na Tabela I.1 encontram-se os valores da quantificação bacteriana das suspensões celulares usadas para preparar os filmes bacterianos das várias bactérias isoladas do tanque de mistura, que são utilizados posteriormente para efectuar a leitura dos ângulos de contacto com os diferentes líquidos.

**Tabela I.1** - Valores da concentração celular dos filmes de bactérias usados para a determinação dos ângulos de contacto, expressa em termos da densidade óptica (DO) e da contagem de bactérias cultiváveis (UFC/mL)

Espécie Bacteriana		DO (640 nm)	UFC/mL
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>		0,263	$6,68 \times 10^6 \pm 4,60 \times 10^5$
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>		0,239	$5,95 \times 10^6 \pm 4,03 \times 10^6$
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>		0,243	$1,87 \times 10^6 \pm 1,49 \times 10^5$
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>		0,284	$2,27 \times 10^6 \pm 1,53 \times 10^5$
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>		0,240	$1,43 \times 10^8 \pm 2,27 \times 10^7$
CDC gr. IV C-2	<u>SP1</u>	0,274	$1,01 \times 10^8 \pm 3,25 \times 10^7$
	<u>SP2</u>	0,267	$2,56 \times 10^8 \pm 3,11 \times 10^7$
	<u>SP3</u>	0,267	$1,95 \times 10^8 \pm 2,08 \times 10^7$
<i>Commamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	0,227	$9,13 \times 10^7 \pm 8,15 \times 10^6$
	<u>SP2</u>	0,256	$1,16 \times 10^8 \pm 7,07 \times 10^5$
	<u>SP3</u>	0,238	$1,72 \times 10^6 \pm 6,43 \times 10^5$
	<u>SP4</u>	0,271	$3,79 \times 10^7 \pm 9,97 \times 10^6$
	<u>SP5</u>	0,273	$1,77 \times 10^7 \pm 6,36 \times 10^5$
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>		0,256	$2,31 \times 10^5 \pm 1,32 \times 10^5$
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>		0,282	$2,17 \times 10^6 \pm 5,86 \times 10^5$
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	0,262	$1,24 \times 10^8 \pm 8,97 \times 10^6$
	<u>SP2</u>	0,280	$1,13 \times 10^7 \pm 3,24 \times 10^6$
	<u>SP3</u>	0,287	$5,95 \times 10^7 \pm 1,93 \times 10^7$
	<u>SP4</u>	0,270	$6,98 \times 10^7 \pm 3,32 \times 10^7$
	<u>SP5</u>	0,269	$1,06 \times 10^7 \pm 1,42 \times 10^6$
	<u>SP6</u>	0,260	$8,43 \times 10^7 \pm 2,12 \times 10^7$
	<u>SP7</u>	0,243	$1,86 \times 10^8 \pm 6,78 \times 10^7$
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>		0,250	$6,55 \times 10^7 \pm 1,02 \times 10^7$
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>		0,278	$1,25 \times 10^8 \pm 1,64 \times 10^7$
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>		0,255	$5,20 \times 10^4 \pm 6,25 \times 10^3$
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	0,269	$8,83 \times 10^7 \pm 4,82 \times 10^7$
	<u>SP2</u>	0,263	$1,34 \times 10^8 \pm 2,30 \times 10^7$

## I.2 – Estudo Teórico de Previsão da Adesão Bacteriana a Superfícies

Nas Tabelas I.2, I.3 e I.4 encontram-se os valores das tensões interfaciais,  $\gamma_{bs}$ ,  $\gamma_{bw}$  e  $\gamma_{sw}$ , e respectivas componentes apolares e polares, que foram usados para o cálculo da energia livre total de adesão ( $\Delta G_{adesão}$ ), que permite fazer uma previsão teórica da adesão das diferentes espécies bacterianas presentes na água do tanque de mistura, às superfícies de adesão em estudo neste trabalho, aço 316 e PVC.

**Tabela I.2** - Valores das componentes apolar ( $\gamma_{bs}^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_{bs}^{AB}$ ) da tensão interfacial bactéria/superfície de adesão ( $\gamma_{bs}$ ), para as duas superfícies de adesão em estudo neste trabalho

Espécie Bacteriana	Tensão Interfacial Bactéria/Superfície de Adesão (mJ/m <sup>2</sup> )						
	Aço 316			PVC			
	$\gamma_{bs}^{LW}$	$\gamma_{bs}^{AB}$	$\gamma_{bs}$	$\gamma_{bs}^{LW}$	$\gamma_{bs}^{AB}$	$\gamma_{bs}$	
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	0,197	18,279	18,475	0,562	17,356	17,918	
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	1,501	41,734	43,235	2,345	40,027	42,372	
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	1,433	0,000	1,433	0,794	0,000	0,794	
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	0,634	16,069	16,703	0,240	15,475	15,715	
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	0,004	17,275	17,279	0,058	16,664	16,722	
<i>CDC</i> gr. <i>IV C-2</i>	<u>SP1</u>	0,030	13,577	13,606	0,018	13,119	13,137
	<u>SP2</u>	0,003	20,733	20,736	0,129	19,991	20,120
	<u>SP3</u>	0,313	25,431	25,744	0,750	24,384	25,134
<i>Commamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	0,042	0,000	0,042	0,010	0,000	0,010
	<u>SP2</u>	0,487	0,000	0,487	0,154	0,000	0,154
	<u>SP3</u>	0,119	0,000	0,119	0,425	0,000	0,425
	<u>SP4</u>	1,099	23,248	24,347	1,835	22,348	24,182
	<u>SP5</u>	0,013	18,949	18,963	0,178	18,253	18,430
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	0,040	10,281	10,321	0,012	9,815	9,826	
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	3,212	20,483	23,695	4,404	19,583	23,987	
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	0,737	10,863	11,600	0,305	10,460	10,765
	<u>SP2</u>	0,152	19,606	19,758	0,007	18,900	18,908
	<u>SP3</u>	0,175	12,765	12,940	0,012	12,298	12,310
	<u>SP4</u>	0,108	21,321	21,429	0,001	20,533	20,534
	<u>SP5</u>	0,001	13,053	13,054	0,076	12,560	12,635
	<u>SP6</u>	0,108	19,545	19,653	0,000	18,838	18,838
	<u>SP7</u>	0,000	21,261	21,261	0,100	20,416	20,515
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	1,454	28,686	30,140	2,287	27,461	29,748	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	0,149	24,586	24,735	0,479	23,659	24,138	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	2,905	34,090	36,995	4,043	32,693	36,736	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	0,009	11,656	11,665	0,045	11,112	11,157
	<u>SP2</u>	0,730	32,509	33,239	1,347	31,147	32,493

**Tabela I.3** - Valores das componentes apolar ( $\gamma_{bw}^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_{bw}^{AB}$ ) da tensão interfacial bactéria/líquido ( $\gamma_{bw}$ ), sendo o líquido a água

Espécie Bacteriana	Tensão Interfacial Bactéria/Líquido (mJ/m <sup>2</sup> )			
	$\gamma_{bw}^{LW}$	$\gamma_{bw}^{AB}$	$\gamma_{bw}$	
<i>Acinetobacter lwoffii</i> <u>SP1</u>	0,011	-3,519	-3,508	
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i> <u>SP1</u>	0,461	-6,254	-5,794	
<i>Brevundimonas diminuta</i> <u>SP1</u>	3,040	36,676	39,716	
<i>Brevundimonas vesicularis</i> <u>SP1</u>	1,802	-18,993	-17,191	
<i>Burkholderia cepacia</i> <u>SP1</u>	0,375	-21,393	-21,017	
<i>CDC</i> gr. <i>IV C-2</i>	<u>SP1</u>	0,516	-25,997	-25,481
	<u>SP2</u>	0,243	-19,349	-19,106
	<u>SP3</u>	0,000	-10,405	-10,405
<i>Commamonas acidovorans</i>	<u>SP1</u>	0,565	-58,272	-57,707
	<u>SP2</u>	1,549	-14,562	-13,013
	<u>SP3</u>	0,040	-44,515	-44,475
	<u>SP4</u>	0,252	-14,018	-13,766
	<u>SP5</u>	0,186	-18,372	-18,186
<i>Escherichia coli</i> <u>SP1</u>	0,556	-9,301	-8,745	
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> <u>SP1</u>	1,553	-8,709	-7,156	
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>SP1</u>	1,974	-20,622	-18,647
	<u>SP2</u>	0,877	-19,452	-18,575
	<u>SP3</u>	0,929	-20,827	-19,898
	<u>SP4</u>	0,766	-17,235	-16,469
	<u>SP5</u>	0,334	-18,694	-18,360
	<u>SP6</u>	0,766	-19,113	-18,347
	<u>SP7</u>	0,289	-13,289	-13,000
<i>Moraxella lacunata</i> <u>SP1</u>	0,435	-8,017	-7,581	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <u>SP1</u>	0,026	-15,037	-15,012	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <u>SP1</u>	1,341	-8,260	-6,919	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>SP1</u>	0,411	-7,754	-7,342
	<u>SP2</u>	0,095	-7,796	-7,701

**Tabela I.4** - Valores das componentes apolar ( $\gamma_{sw}^{LW}$ ) e polar ( $\gamma_{sw}^{AB}$ ) da tensão interfacial superfície de adesão/líquido ( $\gamma_{sw}$ ), sendo o líquido a água

Superfície de Adesão	Tensão Interfacial Bactéria/Líquido (mJ/m <sup>2</sup> )		
	$\gamma_{sw}^{LW}$	$\gamma_{sw}^{AB}$	$\gamma_{sw}$
Aço 316	0,298	46,955	47,254
PVC	0,727	44,312	45,039

## **Anexos**

---

Anexo A – Composição e Modo de Preparação dos Meios de Cultura

---

**Anexo A – Composição e Modo de Preparação dos Meios de Cultura**

Meio de Cultura R<sub>2</sub>A (Oxoid):

**Tabela A.1** - Composição do meio de cultura R<sub>2</sub>A

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extracto de levedura	0,50
Triptona	0,25
Peptona	0,75
Glucose	0,50
Amido	0,50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30
MgSO <sub>4</sub>	0,024
Piruvato de sódio	0,30
Agar	15,0

Dissolver 12,67 g de R<sub>2</sub>A em 700 mL de água destilada e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Meio de Cultura TSA:

**Tabela A.2** - Composição do meio de cultura TSA

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Triptona	15,0
Peptona de soja	5,0
NaCl	5,0
Agar	15,0

Dissolver 21 g de TSB (Merck) com 10,5 g de agar granulado (Merck) em 700 mL de água destilada e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.



Meio de Cultura TBX (Merck):

**Tabela A.3** - Composição do meio de cultura TBX

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Peptona	20,0
Sais biliares N°3	1,5
X-β-D-glucuronide	0,075
Agar	15,0

Dissolver 36,6 g de TBX em 1 L de água destilada e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

Meio de Cultura PIA (Difco):

**Tabela A.4** - Composição do meio de cultura PIA

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Peptona	20,0
Cloreto de magnésio	1,4
Sulfato de potássio	10,0
Irgasan	0,025
Agar	13,6

Dissolver 45 g de PIA em 980 mL de água destilada e adicionar 20 mL de glicerol 87% (p.a. Merck) e misturar bem. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Meio de Cultura Mínimo com Metanol:

**Tabela A.5** - Composição do meio de cultura Mínimo com Metanol

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,305
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,13
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,45
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	$3,3 \times 10^{-3}$
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	$1,3 \times 10^{-3}$
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	$130 \times 10^{-6}$
ZnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	$40 \times 10^{-6}$
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	$40 \times 10^{-6}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	$40 \times 10^{-6}$
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	$40 \times 10^{-6}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$40 \times 10^{-6}$
Agar	15,0

Sendo suplementado com 1% (V/V) de metanol.

Dissolver todos os componentes em 1 L de água destilada e acertar o pH a 7. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Meio de Cultura Skim Milk powder (Merck):

Dissolver 10 – 11 g em 1 L de água destilada e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.