



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA SÉSSIL E PLANCTÔNICA ASSOCIADA A TORRES
DE RESFRIAMENTO DE UMA FÁBRICA DE FERTILIZANTES NITROGENADOS

ANA LUIZA CORDEIRO

BELO HORIZONTE

2016

ANA LUIZA CORDEIRO

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA SÉSSIL E PLANTÔNICA ASSOCIADA A TORRES
DE RESFRIAMENTO DE UMA FÁBRICA DE FERTILIZANTES NITROGENADOS

Trabalho de conclusão de curso apresentada
ao Centro Federal de Educação Tecnológica
de Minas Gerais como pré-requisito para
obtenção do título de Engenheiro Ambiental
e Sanitarista.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Guadagnin Moravia

Co-orientador: Prof^a. Dr. Vera Lúcia dos Santos

BELO HORIZONTE

2016



Serviço Público Federal – Ministério da Educação
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL E
SANITÁRIA**

**ATA DE DEFESA FINAL
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

Aos **29 (vinte e nove)** dias do mês de **junho** de **2016**, às 14h30min, no *Campus I* do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, reuniram-se os Membros: **PROF. WAGNER GUADAGNIN MORAVIA (ORIENTADOR)**, **PROF^a. VERA LÚCIA DOS SANTOS (CO-ORIENTADORA)**, **ALINE DANIELA LOPES JÚLIO** e **ANDREA LIMA ALVES**, para participarem da banca de avaliação do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA SÉSSIL E PLANCTÔNICA ASSOCIADA A TORRES DE RESFRIAMENTO DE UMA FÁBRICA DE FERTILIZANTES NITROGENADOS.”** de autoria da aluna **ANA LUIZA CORDEIRO – matrícula 201012080285**, do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária.

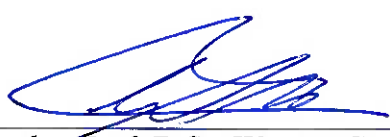
Uma vez avaliado, o trabalho foi declarado:

- ☒ Aprovado.
☐ Aprovado com ressalvas.
☐ Reprovado.

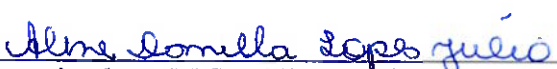
Ressalvas:

Belo Horizonte, 29 de junho de 2016.

Banca Examinadora:


Orientador: Prof. D.Sc. Wagner Guadagnin Moravia


Co-orientadora: Prof^a. D.Sc. Vera Lúcia dos Santos


Examinadora: M.Sc. Aline Daniela Lopes Júlio


Examinadora: M.Sc. Andrea Lima Alves


Coordenação do Curso de
Engenharia Ambiental e Sanitária
CEFET - MG

Coordenação do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Av. Amazonas 5.253 – Nova Suíça – Belo Horizonte – MG – Brasil – CEP: 30.421-169

Telefone: +55 (31) 3319-7120

ANA LUIZA CORDEIRO

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA SÉSSIL E PLANTÔNICA ASSOCIADA A TORRES
DE RESFRIAMENTO DE UMA FÁBRICA DE FERTILIZANTES NITROGENADOS

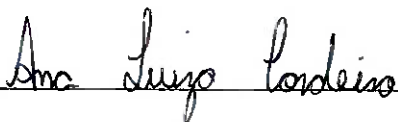
Trabalho de conclusão de curso apresentada
ao Centro Federal de Educação Tecnológica
de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro Ambiental
e Sanitarista.

Data: 04 / 07 / 16

:



Prof. Dr. Wagner Guadagnin Moravia – Cefet-MG - Orientador



Ana Luiza Cordeiro

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre iluminando meu caminho e me conduzindo nas dificuldades.

À meus pais que, com grande esforço e sacrifício, se empenharam em me dar uma educação sem a qual não estaria hoje aqui. Também gostaria de agradecer-lhes por sempre acreditarem no meu potencial, por me fazerem buscar sempre mais e por serem exemplo de bons profissionais.

Aos professores Wagner e Vera, meus orientadores da monografia, por me ajudarem na elaboração do trabalho. Em especial à professora Vera, pela oportunidade que me deu de trabalhar no laboratório de microbiologia aplicada, onde tive a chance de aprender muitas coisas e amadurecer.

À Andrea e Débora, que sempre estiveram dispostas a me ajudar, independente da dúvida e da dificuldade que tivesse. Pude aprender muito nesse período trabalhando com elas.

À Nayara, Cecília e Francielle, minhas amigas desde sempre que, por todos esses anos, permitiram momentos de descontração que faziam com que me esquecesse dos problemas que me importunavam à mente. O mesmo à minhas irmãs Marina e Danielle, por serem as minhas primeiras amigas e à Manuella por ser minha melhor amiguinha.

E à todos que, de alguma forma, contribuíram para que chegasse onde estou hoje.

*“Num bosque amarelo dois caminhos se separavam,
E lamentando não poder seguir os dois*

(...)

Então segui o outro, que me pareceu mais belo,

(...)

*Oh, deixei o primeiro para outro dia!
Embora soubesse como um caminho leva para longe,
E duvidasse que algum dia voltaria novamente.*

*Direi isto suspirando
Em algum lugar, daqui a muito e muito tempo:
Dois caminhos se separaram em um bosque e eu ...
Eu escolhi o menos percorrido
E isso fez toda a diferença”*

Robert Frost, 1916

RESUMO

Torres de resfriamento são equipamentos utilizados para remoção de calor gerado pela realização de algum processo industrial e seu bom funcionamento é condicionado pelo controle de três principais problemas: incrustações, corrosão e desenvolvimento microbiológico. Diversos microrganismos podem estar presentes nos sistemas de resfriamento já que ali são encontradas condições ideais para seu desenvolvimento, se apresentando na forma sésil ou planctônica. Controlar esse parâmetro é importante pois esses organismos representam risco de contaminação à pessoas próximas e, quando associados à biofilmes, podem ocasionar a redução na vida útil dos equipamentos, queda de eficiência, redução na transferência de calor e geração de processos corrosivos. Dessa forma, buscou-se avaliar a densidade bacteriana presente na torre de resfriamento de uma fábrica de fertilizantes nitrogenados localizada no estado da Bahia, avaliando os organismos presentes na forma sésil e planctônica por meio de amostras de água, lâminas de vidro, cupons e biocupons de aço inoxidável. Foram analisados bactérias heterotróficas totais (BHT) e oxidantes de amônia (BOA) e nitrito (BON). Também foram realizados estudos dos parâmetros físico-químicos das amostras de água, comparação dos resultados da densidade bacteriana avaliada pelo método de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e por dois diferentes métodos colorimétricos e a identificação dos microrganismos isolados. Foi observado que a maioria dos parâmetros de qualidade de água estudados se encontram em grande parte dentro do estipulado para sistemas de resfriamento e que os valores recomendados pelo Instituto de tecnologia de resfriamento (*Cooling Technology Institute* – CTI) para presença de microrganismos foram respeitados em todas as avaliações de BHTs, menos para os biocupons que tiveram maior adesão microbiana. Os métodos colorimétricos apresentaram uma correlação com os dados obtidos pela contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Houve divergência nos resultados das lâminas, provavelmente por testes colorimétricos quantificarem a biomassa total de organismos enquanto a contagem de UFC analisa uma faixa restrita de organismos. Foi detectada a presença de BOA e BON no equipamento e foi possível isolar 41 microrganismos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*. Esses gêneros incluem microrganismos que participam da adesão de biofilmes, do ciclo do nitrogênio ou ainda podem ser patogênicos.

Palavras-chave: Torre de resfriamento, densidade bacteriana, métodos alternativos de quantificação de microrganismos, diversidade microbiana.

ABSTRACT

Cooling towers are equipment used for the removal of the heat generated by any industrial process and your proper functioning is conditioned by the control of three major problems: incrustation, corrosion and microbiological development. Several microorganisms may be present in cooling systems since this equipment has ideal conditions for their appearing, and they may be present in sessile or planktonic form. A control of this parameter is important because these organisms can create a risk of contamination to people close the equipment and, when related to biofilms, they can result in reduced equipment life, down efficiency, reduced heat transfer and generation of corrosive processes. Thus, this research sought to evaluate the bacterial density present in the cooling tower of a nitrogenous fertilizer plant located in the state of Bahia, assessing the organisms present in sessile form and planktonic through water samples, glass lamina, stainless steel coupons and biocoupons, total heterotrophic bacteria (THB) and oxidizing ammonia (AOB) and nitrite (NOB) were analyzed. It was also carried out studies of the physicochemical parameters, comparing the results of density evaluated by forming units counting method Cologne (UFC) and two different colorimetric methods and identification of microorganisms. It was observed that the quality of water parameters studied are largely within the stipulated for cooling systems and the values recommended by Cooling Technology Institute (CTI) for the presence of microorganisms were observed in all evaluations of BHTS less for biocoupons that had higher microbial adhesion. The colorimetric methods showed a correlation with the data obtained by counting the colony forming units (CFU), only the results of lamina diverged, probably because the colorimetric methods quantify the total biomass of organisms while the count analyzes a narrow range of organisms. The method for evaluating OAB and NOB showed their presence in the equipment. And the identification allowed 41 isolate microorganisms of the genus *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*. Organisms that are part of the biofilm adhesion, nitrogen cycle or can be pathogenic.

Keywords: Cooling tower, bacterial density, alternative methods of quantification of microorganisms, microbial diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de produção de fertilizantes nitrogenados	16
Figura 2: Tipos de sistemas de resfriamento.	18
Figura 3: Esquema de funcionamento de uma Torre de resfriamento.....	19
Figura 5: Quantidade de corpos de prova usados durante o experimento.	32
Figura 6: Metodologia para utilização do kit Hydrobio®.	43
Figura 7: gráfico com percentual dos gêneros	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do descontrol de pH em torres de resfriamento	20
Tabela 2: Principais microrganismos encontrados em torres de resfriamento	22
Tabela 3: Parâmetros físico-químicos da torre de resfriamento IV.....	38
Tabela 4: Densidade média de bactérias heterotróficas totais	40
Tabela 5: Densidade de bactérias oxidantes de amônia (BOA) e nitrito (BON).....	41
Tabela 6: Índice de aderência das lâminas depositadas na bacia da torre IV	44
Tabela 7: Densidade dos gêneros isolados por coleta e na forma planctônica e sésil	47

SUMÁRIO

1.MOTIVAÇÃO.....	13
2.INTRODUÇÃO.....	14
3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1.Produção de fertilizantes	15
3.2.Tipos de sistemas de resfriamento	16
3.2.1.Sistemas aberto sem recirculação de água.....	17
3.2.2. Sistemas fechados com recirculação de água fria	17
3.2.3. Sistemas abertos com recirculação de água.....	18
3.3.Torres de resfriamento.....	19
3.4.Problemas em torres de resfriamento	20
3.4.1. Depósitos e incrustações.....	21
3.4.2. Corrosão	21
3.4.3. Proliferação de microrganismos	22
3.4.3.1. Biofilmes	24
3.5.Controle de crescimento microbiológico.....	26
4.OBJETIVOS	29
4.1.Objetivo geral.....	29
4.2.Objetivos específicos	29
5.MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1.Local de coleta.....	30
5.2.Amostragem.....	30
5.2.1.Caracterização físico-química de amostras de água da torre.....	30
5.2.2. Preparo dos corpos de prova.....	30
5.2.3. Coleta de amostras e transporte	31

5.3.Determinação da densidade de bactérias sésseis e planctônicas associadas à torre de resfriamento.....	32
5.3.1. Avaliação da microbiota séssil	32
5.3.2.Microbiota planctônica	34
5.3.3.Avaliação da biomassa aderida a cupons de aço inoxidável pelo kit Hidrobio.....	34
5.4.Isolamento e identificação de bactérias sésseis e planctônicas presentes na torre de resfriamento.....	34
5.4.1.Extração de DNA.....	35
5.4.2 Amplificação por reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de regiões do gene do rDNA 16S	36
5.4.3. Purificação dos amplicons.....	36
5.4.4. Reação de sequenciamento	37
6.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
6.1.Caracterização físico-química da água da torre de resfriamento e da água clarificada.....	38
6.2.Avaliação da densidade microbiana associada à torre de resfriamento.....	39
6.3.Avaliação da biomassa aderida aos corpos de prova a partir de métodos colorimétricos..	42
6.4.Isolamento e identificação de bactérias sésseis e planctônicas presentes na torre de resfriamento.....	45
7.CONCLUSÕES	52
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. MOTIVAÇÃO

A existência de microrganismos em sistemas industriais está relacionada a diversos problemas no setor produtivo, tanto pela contaminação de objetos e alimentos, quanto por sua influência sobre eficiência de equipamentos e na saúde humana.

Os equipamentos estão susceptíveis à ação desses organismos devido aos processos celulares, que utilizam certos nutrientes presentes na água e ocasionam em alterações no sistema. Em torres de resfriamento eles podem ocasionar incrustação, corrosão e comprometimento da eficiência do trocador de calor, além de se tornar uma possível fonte de risco aos trabalhadores e comunidades próximas à indústria.

São realizados tratamento na água para o controle da presença microbiana, por meio do uso de desinfetantes com diferentes agentes ativos. Porém, é sabido que cada organismo reage de forma diferenciada à presença de tais compostos, possuindo resistência ao tratamento ou mesmo adquirir essa capacidade devido ao manuseio incorreto dessas substâncias.

Dessa forma, é importante considerar uma avaliação da microbiota presente no sistema para se escolher um biocida que irá garantir uma água segura e de qualidade para os processos e indivíduos ali envolvidos; as análises podem contribuir ainda como uma estratégia de controle e gestão de água.

2. INTRODUÇÃO

A existência do homem está pautada na atividade industrial, a qual, utilizando energia, atividade humana e máquinas, transforma matéria-prima em bens comercializáveis tal como alimentos, instrumentos para realização de trabalho e vestimentas. Alguns dos processos utilizados envolvem a geração de energia térmica a qual deve ser dissipada. Uma das estruturas empregadas com essa finalidade são as torres de resfriamento que operam utilizando um fluido resfriador.

Mesmo quando utilizados adequadamente não se pode esperar que todos os elementos do sistema industrial operem em condições perfeitas e ideais, nos quais toda energia aplicada é transformada em trabalho ou que equipamentos não estejam susceptíveis à falhas e problemas.

O maquinário é submetido à condições extremas ou mesmo propícias para a ocorrência de falhas. Torres de resfriamento possuem falhas relacionadas à ocorrência de três principais problemas: proliferação de microrganismos, incrustações e o processo de corrosão. Todos eles são objetos de preocupações ao empreendedor, pois uma ineficiência no monitoramento de suas causas e origens no tratamento dado à água de circulação pode acarretar em perdas de equipamentos, paradas na produção e queda de lucratividade.

A presença dos microrganismos pode afetar a qualidade da água, diminuindo a eficiência em eliminar o calor do sistema e podendo ocasionar em maiores taxas de incrustações e de corrosão. Em alguns casos pode haver alteração na turbidez da água ou mesmo a produção de substâncias que alterem o odor e a cor na água ou sejam tóxicas para a saúde humana.

Nesse contexto, o presente estudo objetiva investigar a diversidade microbiana encontrada na água de torres de resfriamento de uma fábrica de fertilizantes nitrogenados no estado da Bahia.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

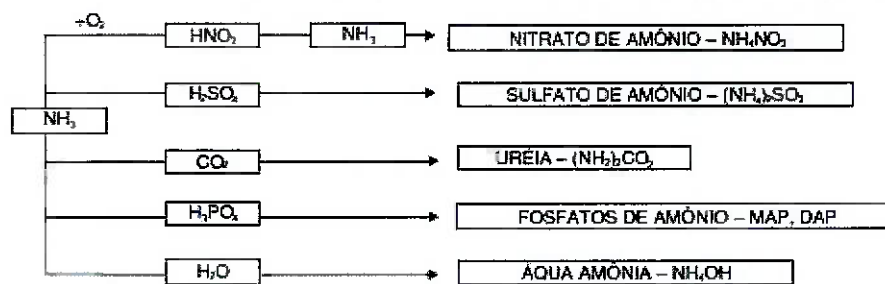
3.1. Produção de fertilizantes

A agricultura é uma atividade produtiva de elevada importância para a sociedade humana, a qual objetiva o desenvolvimento de alimentos que servirão para abastecer a população. É um processo que demanda luz, ar, água, temperatura e nutrientes. O solo é o local onde a planta se fixa e em que tem acesso aos nutrientes e à água. O Brasil possui condições favoráveis para a agricultura, porém uma pobreza de nutrientes. Assim é necessário a aplicação de técnicas agrícolas, como a adubação, que corrige esse problema por meio da adição de fertilizantes (SANTOS, 2012).

A legislação brasileira (Decreto 86.955, de 18 de fevereiro de 1982) define fertilizantes como “substâncias minerais ou orgânicas, naturais ou sintéticas, fornecedoras de um ou mais nutrientes das plantas”. Sua função é repor ao solo elementos que são perdidos a cada colheita, podendo adicionar ou manter um potencial produtivo ao mesmo (DIAS *et al*, 2006). Sua composição básica possui três elementos químicos: nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). E sua cadeia produtiva é composta pelo segmento de extração do mineral, produção de fertilizantes simples (fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos) e empresas que atuam como misturadoras: que elaboram diferentes dosagens de fertilizantes NPK utilizando os fertilizantes básicos (DIAS *et al*, 2006).

Os fertilizantes nitrogenados têm em sua composição o nitrogênio como nutriente principal e se originam da fabricação da amônia anidra (NH_3), gás obtido de uma mistura do nitrogênio presente no ar com o hidrogênio de fontes diversas, sendo o gás natural o mais usado. Dependendo do percentual de nitrogênio, diferentes fertilizantes são obtidos, com variáveis formas de processamento, a figura 1 mostra a rota de produção de alguns fertilizantes nitrogenados (LIMA *et al*, 2007).

Figura 1: Rota de produção de fertilizantes nitrogenados



Fonte: DIAS *et al* (2006)

A produção de fertilizantes em geral envolve diversos passivos ambientais, mas o mais importante é o relacionado com o subproduto gesso (sulfato de cálcio – CaSO_4) gerado na solubilização da rocha fosfática com ácido sulfúrico na fabricação do ácido fosfórico. Também é importante um cuidado especial com os efluentes líquidos e gasosos: podem ser gerados efluentes alcalinos líquidos amoniacais e ácidos ou emitidos óxidos de enxofre, nitrogênio e particulados (DIAS *et al*, 2006).

O processamento de fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos envolve uma série de reações químicas, a maioria demandando níveis de pressão e temperatura elevados. Esses parâmetros devem ser controlados e monitorados por equipamentos específicos. Os sistemas de resfriamento objetivam retirar o calor gerado nesses processos.

3.2. Tipos de sistemas de resfriamento

Os sistemas de resfriamento são utilizados em atividades industriais quando há necessidade de resfriamento de máquinas ou fluidos que geram ou recebem calor durante operação. Eles variam quanto a serem de ciclos fechado ou abertos (Figura 1), e essas diferentes configurações estão relacionadas à recirculação ou não de água no sistema. Nos sistemas abertos, a água passa pelo sistema e é descartada em seguida e nos de ciclo fechado o fluido vai recirculando, sendo aquecido ou resfriado em pontos específicos do sistema (TROVATI, 2004).

Os fatores que determinam a escolha do tipo de sistema de resfriamento a ser utilizado dependerá do processo produtivo da indústria, disponibilidade, qualidade, temperatura e custo da água e as limitações do descarte de efluentes. (VEIGA, 2010)

3.2.1. Sistemas aberto sem recirculação de água

Também conhecido como sistema de passagem única, não possui recirculação de água, a qual é descartada após absorção do calor do equipamento a ser resfriado. Mais utilizada por indústrias localizadas próximas à grandes mananciais com viabilidade econômica de uso (SILVA, 2013).

Possui como desvantagem a dificuldade no controle de corrosão, incrustação e crescimento microbiano, o que torna necessária a utilização de equipamentos e tubulações mais resistentes à esses processos e a limpeza química e mecânica periódica. Outro problema relacionado a este sistema é a poluição térmica que pode ocorrer no corpo receptor, já que a água descartada pode se encontrar a elevadas temperaturas e ocasionar desequilíbrios no ecossistema e nos organismos ali presentes (SENEVIRATNE, 2007; VEIGA, 2010).

3.2.2. Sistemas fechados com recirculação de água fria

Nesse sistema, o resfriamento é feito de forma contínua. A água, que fica completamente confinada em sistemas de encanamentos e de trocas de calor, absorve e perde calor em locais diferentes no sistema, não ocorrendo perdas por evaporação nem respingo. São usados em processos de pequena capacidade, como mancais de bombas, resfriamento de motores diesel, turbinas a gás e sistemas de ar condicionado (SENEVIRATNE, 2007; SILVA, 2013).

Para a dissipação do calor, podem ser utilizados radiadores, trocadores de calor refrigerados por gás ou outro circuito de água, geralmente são sistemas abertos que transferem esse calor para a atmosfera (SENEVIRATNE, 2007).

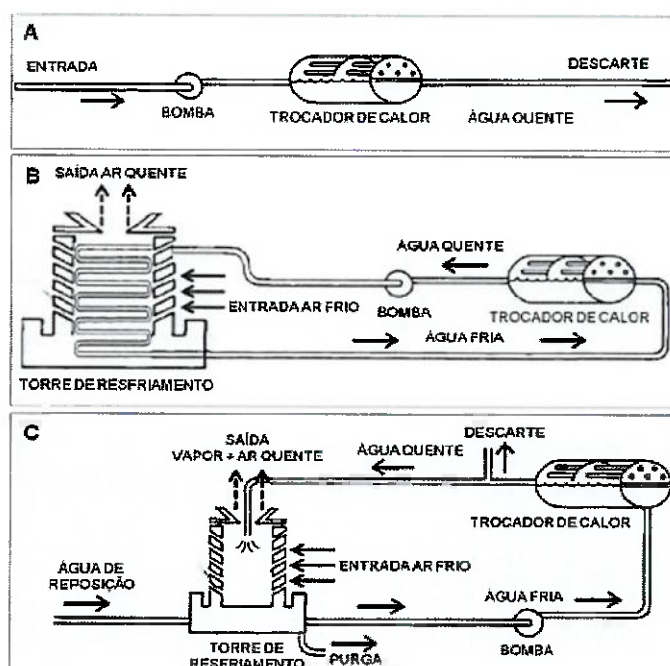
Podem acontecer perdas por vazamento em conexões e gaxetas de bombas, tornando necessária pouca reposição de água e, conseqüentemente, de produtos químicos de tratamento. Por não haver evaporação, as concentrações de sais na água são constantes e não são observados muitos problemas com corrosão e incrustação. E o processo de crescimento de microrganismos aeróbios não ocorre, pois não há contato do ar com a água nesses sistemas (VEIGA, 2010).

3.2.3. Sistemas abertos com recirculação de água

Este sistema também pode ser denominado de semiaberto, nele a água que foi aquecida em trocadores de calor tem seu calor dissipado em torre de resfriamento e retorna ao equipamento de troca térmica para novamente se aquecer e retornar à torre, sendo reaproveitada no sistema (TROVATI, 2000).

Sua vantagem sobre os sistemas abertos consiste no fato da possibilidade de se realizar medidas preventivas sobre processos de corrosão e incrustação, além da necessidade de menor quantidade de água. Esse fato aliado à possibilidade de reuso permite que seja aplicado em situações que requerem elevada vazão e que esse sistema seja incentivado devido à necessidade de redução no consumo de água (VEIGA, 2010).

Figura 2: Tipos de sistemas de resfriamento: (A) passagem única; (B) fechado e (C) aberto.



Fonte: ALVES (2016)

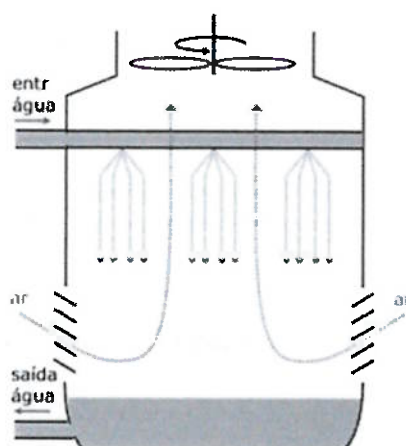
3.3. Torres de resfriamento

As torres de resfriamento são usadas em sistemas fechados ou abertos com recirculação de água. São consideradas a forma mais simples e barata de troca de calor conhecida. Diversos fluidos podem ser utilizados para a remoção do calor, porém a água é o mais utilizado, devido à elevada condutividade térmica, baixa viscosidade, a capacidade de absorver grande quantidade de calor por unidade de volume. Além de custos relativamente baixos e a possibilidade do descarte direto em corpos hídricos (PAGNIER, 2009)

Os componentes dessas torres são sistemas de distribuição de água, sistemas de troca de calor, base para coleta da água resfriada, pulverizadores no topo do equipamento e uma corrente de ar para resfriar a água (PAGNIER, 2009; SILVA, 2013).

Em seu funcionamento, o calor retirado do equipamento é lançado na atmosfera, formando uma pluma. A água, que foi aquecida no contato com o material que necessita de resfriamento, entra na torre por sua parte superior e pulverizadores a distribuem. Seu contato com uma corrente de ar de fluxo ascendente faz com que esfrie novamente e possa ser coletada numa bacia de água fria localizada na base da torre. A figura 2 ilustra o funcionamento de uma torre de resfriamento. Uma pequena parte do resfriamento está relacionado ao contato da água com o ar, mas a maior parte é devida à evaporação, arraste e respingo. Devido à perdas que ocorrem no sistema, uma nova quantidade de água deverá entrar no sistema como água de reposição (CORTINOVIS *et al*, 2005).

Figura 3: Esquema de funcionamento de uma Torre de resfriamento



Fonte: MSPC – Informações técnicas (2008)

3.4. Problemas em torres de resfriamento

Os principais problemas a serem controlados em torres de resfriamento estão relacionadas a incrustações, corrosão e formação de biofilmes. Há uma forte relação entre esses problemas e parâmetros de qualidade da água. (TROVATI, 2004)

Segundo Silva (2013), o pH é um dos principais parâmetros a ser controlado, e o mesmo deve ser mantido na faixa entre 6,5 e 8,5. A tabela 1 mostra prováveis problemas relacionados ao descontrole no pH:

Tabela 1: Efeito do descontrole de pH em torres de resfriamento

pH maior que 8,5	pH menor que 6,5
Aumentam os riscos de incrustações e deposições, tornando o sistema mais sensível a falhas de dosagens dos anti-incrustantes e dispersantes.	Aumentam drasticamente o potencial corrosivo da água do sistema de resfriamento.
Reduzem a eficiência dos tratamentos químicos contra organismos.	Reduzem fortemente a eficiência dos inibidores de corrosão utilizados, dificultando o controle de corrosão.
Tornam incompatível o uso do zinco como inibidor catódico, transformando-o em fonte de depósitos, reduzindo o controle da corrosão.	

Fonte: MACHADO (2005)

Gentil (2011) ainda aponta outros parâmetros que podem ocasionar em problemas no sistema:

- Íons e sais: por estarem relacionados à dureza da água e poderem formar precipitados;
- Temperatura: possui relação com a solubilidade de compostos presentes na água, na presença de microrganismos e como se dará o tratamento por compostos químicos.
- Sólidos suspensos: podem formar depósitos nos equipamentos a jusante da torre;
- Matéria orgânica: pode favorecer o crescimento de microrganismos, formação de biofilmes e todos os problemas relacionados à presença destes.

3.4.1. Depósitos e incrustações

As incrustações ocorrem devido à presença de sólidos suspensos na água fria, que formam depósitos em superfícies do sistema. Esses compostos podem ser materiais oriundos do sistema de circulação de ar, areia, biofilme, flocos de alumínio ou produtos da corrosão. A elevada temperatura da água nesses sistemas favorece as incrustações pois aumenta a precipitação de carbonatos e bicarbonatos da água. (SENEVIRATNE, 2007; SILVA, 2013).

A presença de incrustações ocasiona na redução da taxa de transferência de calor devido à baixa condutibilidade térmica dos depósitos em relação ao metal e faz com que haja redução de vida útil dos equipamentos e/ou aumento no consumo de energia. Isso causa interrupções no processo produtivo para realização de manutenção nos trocadores de calor, levando a prejuízos econômicos (ALVES, 2013; VEIGA, 2010).

Outro aspecto importante a ser considerado é que as incrustações impedem biocidas e inibidores de corrosão de reagirem com biofilmes e com a superfície do material do equipamento.

3.4.2. Corrosão

Corrosão é definida como a deterioração de um material, geralmente metálico, por ação química ou eletroquímica com o ambiente que este interage, associada ou não a esforços mecânicos. Esse processo gera grandes prejuízos em sistemas de resfriamento, por causarem queda de eficiência, vazamentos, redução da resistência mecânica dos materiais, aumento de perda de carga, redução de vazão e da vida útil dos equipamentos. (SENEVIRATNE, 2007; SILVA, 2013; VEIGA, 2010).

Existem diversas formas de corrosão como a galvânica em que dois materiais metálicos estão em contato, havendo transferência de cargas elétricas de um para o outro. Também há a corrosão eletrolítica, o qual ocorre em estruturas metálicas que estão enterradas ou submersas. Outro mecanismo é o da corrosão seletiva, em que ocorre a remoção preferencial de alguns elementos da liga que forma o material, uma situação que ocorre em contato com a água. Dentre os diversos mecanismos ainda existe o de corrosão induzida por microrganismos, que é desencadeada ou acelerada pelo resultado da atividade metabólica desses. Está relacionada a presença de bactérias produtoras de exopolímeros, fungos filamentosos, algas, e,

principalmente, às bactérias redutoras de sulfato, produtoras de ácidos, ferrobactérias, e produtoras de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (FIGUEIREDO *et al*, 2000; SILVA, 2013; VEIGA, 2010).

O controle da corrosão é de difícil execução devido aos diferentes mecanismos envolvidos. Muitas vezes não é possível eliminar completamente sua ocorrência de forma economicamente viável, sendo então utilizadas técnicas que reduzem o processo à níveis aceitáveis. A sua prevenção começa na projeção do sistema, através da escolha de metais não corrosivos para a construção do equipamento ou uso de revestimentos protetores, dentre outros aspectos. Outro fator relevante é a qualidade da água de alimentação do circuito, observando parâmetros como pH (SENEVIRATNE, 2007; TROVATI, 2004).

3.4.3. Proliferação de microrganismos

Torres de resfriamento oferecem condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, como pH, nutrientes e temperatura ideais. Geralmente eles acessam o sistema pelo contato com o ar, por meio da água de alimentação do sistema de resfriamento ou em vazamentos no processo. A tabela 2 mostra os principais microrganismos encontrados nesses sistemas (CORTINOVIS, 2005; PAGNIER *et al*, 2009).

Tabela 2: Principais microrganismos encontrados em torres de resfriamento

Organismo	Classificação	Fontes de energia e nutrientes	Principais problemas
Bactérias anaeróbias ou aeróbias	– Formadoras de biofilme – Depositantes de ferro – Redutoras de sulfato – Anaeróbias corrosivas	Diversos compostos orgânicos e inorgânicos; fazem quimiossíntese	– Depósitos densos e aderentes – Oxidação do ferro e depósitos de óxidos insolúveis – Redução de sulfato a sulfeto, originando a corrosão – Secretam substâncias corrosivas
Fungos	Leveduras e fungos filamentosos	Material orgânico	Obstrução de tubulação e problema em válvulas, degradação de material orgânico e geração de odor.
Algas	Unicelulares e superiores	Luz solar	Obstrução de tubulação e problema de válvulas.

Fonte: TROVATI (2004)

As bactérias podem estar presente em duas diferentes formas nos sistemas de resfriamento. As de forma planctônicas ficam dispersas no líquido e movimentam-se junto com ele, já as sésseis ficam aderidas nas superfícies dos equipamentos, formando os biofilmes e são elas que são responsáveis pelos maiores problemas encontrados nas torres. Acredita-se que as bactérias planctônicas sejam importantes para a dispersão e colonização de novos locais e a forma de vida sésil seja uma estratégia para a preservação da espécie, já que auxilia na sobrevivência desses microrganismos em situações de estresse (TROVATI, 2004).

Nas torres de resfriamento, podem ser encontradas tanto as bactérias autotróficas como as heterotróficas, as quais diferem quanto à forma de obtenção de carbono do ambiente. Enquanto o primeiro grupo capta o CO_2 da atmosfera e o fixa em compostos orgânicos por meio do Ciclo de Calvin, as bactérias heterotróficas não possuem essa capacidade e necessitam obter esse componente através do consumo de compostos orgânicos (ALLEN, 2013).

Águas usadas para resfriamento de torres em fábricas de fertilizantes nitrogenados, além de apresentar compostos orgânicos variados, são propensas ainda à presença de altas concentrações de nitrogênio e, conseqüentemente, de microrganismos relacionados ao ciclo desse elemento químico. A nitrificação é realizada por etapas de oxidação realizadas por diferentes grupos bacterianos. As bactérias oxidantes de amônia (BOA) são responsáveis pela primeira etapa, oxidando o nitrogênio amoniacal (NH_3) em nitrito (NO_2^-) e o grupo das bactérias oxidantes de nitrito (BON) participam da nitração, oxidando nitrito em nitrato (NO_3^-) (OLIVEIRA, 2012).

A presença de microrganismos em sistema de resfriamento é parâmetro que deve ser sempre controlado, pois, além de diminuir a eficiência do equipamento e estar relacionada ao aparecimento de corrosão e incrustação, existe o risco biológico. Isso ocorre porque as torres de resfriamento podem liberar aerossóis contendo microrganismos que podem contaminar trabalhadores e comunidades próximas às plantas industriais (ALVES, 2016; PAGNIER *et al*, 2009).

Estudos em torres relatam a presença de diversos organismos patogênicos, normalmente bactérias do gênero *Legionella sp.* são isoladas, sendo que há uma maior preocupação na remoção das mesmas, muitos países possuem legislações que visam o combate ao risco oferecido por esses microrganismos. Outros organismos patogênicos já encontrados em torres são *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium sp.*, *E.coli*, *Cryptosporidium sp.* e *Acanthamoeba sp.* (PAGNIER *et al*, 2009; TÜRETGEN, 2007).

3.4.3.1. Biofilmes

Biofilmes são complexos ecossistemas de microrganismos envolvidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica. Acredita-se que essa formação providencia uma barreira física, que promove a conservação do genótipo e proteção contra predadores e sistemas imunológicos, sendo uma estratégia de sobrevivência para os organismos que o compõem (RENNER *et al*, 2011).

A capacidade de formar biofilme acarreta em importantes benefícios para os microrganismos. Tais como o aumento da concentração de nutrientes, proteção contra fatores ambientais agressivos, possibilidade de troca de material genético entre microrganismos presentes no biofilme, permite relações de simbioses e possibilita estabelecer e colonizar novos nichos ecológicos (BRAGA, 2001).

Em seu trabalho, Tolker-Nielsen e colaboradores (2000) observaram que cada comunidade de biofilme é única, apesar de alguns atributos estruturais serem universais. Eles são tipicamente constituídos por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas, como argilas, areais e ainda partículas orgânicas provenientes do meio aquoso onde o mesmo está imerso. A água constitui uma percentagem significativa, correspondendo 70 a 95% da massa total do biofilme, já os microrganismos representam uma pequena parte dessa massa, frequentemente menor que 10%.

O desenvolvimento do biofilme pode ser condicionado por diversos fatores como pH, temperatura, força iônica do meio, velocidade de escoamento do líquido, além da qualidade e concentração de nutrientes no meio líquido circundante. Outros fatores relevantes são as características dos microrganismos constituintes, matéria de construção e rugosidade da superfície sólida, presença de material particulado, micronutrientes e presença de agentes antimicrobianos (BRAGA, 2001).

Quanto à formação do biofilme, ele se inicia com a geração de um filme de origem orgânica ou inorgânica, que modifica as cargas na superfície do material do equipamento. Em seguida, ocorre a deposição de células planctônicas nessas superfícies. Estes microrganismos depositados iniciam a síntese e excreção de proteínas e polissacarídeos que propiciam o crescimento da população microbiana, já que outros organismos presentes no meio também passam a se aderir ao biofilme. Algumas células do biofilme ainda podem se desprender e

colonizar novas superfícies ou se tornarem organismos planctônicos (DONLAN, 2002; MARSHALL, 1994).

No início da colonização da superfície, as colônias são constituídas, na maioria dos casos, por uma película gelatinosa que pode ser facilmente removível. Entretanto, com o passar do tempo pode haver mineralização desta camada microbiológica superficial externa, o que a torna de difícil remoção.

Diversos microrganismos podem compor os biofilmes: microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus. As células bacterianas predominam devido à sua maior versatilidade e resistência. Além disso, geralmente são a partir delas que se inicia a formação dos biofilmes, devido ao seu tamanho reduzido, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares que a protegem do meio circundante. Os gêneros mais comuns de bactérias formadoras de biofilme são *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (BRAGA, 2001).

Os biofilmes são ecossistemas de relevância para o Homem, podendo ter uma atividade neutra, benéfica ou prejudicial para o mesmo. Sua presença é desejável no que se refere à ciclagem de nutrientes, sendo utilizada pelo homem em processos biotecnológicos. Seus efeitos são negativos quando ocasionam na deterioração de superfícies e/ou ambientes circundantes, podendo agir sobre dentes, lentes de contato, edifícios, monumentos e processos industriais (BRAGA, 2001).

Em algumas situações, como em sistemas de tratamento de efluentes industriais ou domésticos, a presença de biofilmes é desejada e auxilia no processo, como é o caso dos reatores de leito fixo. Neles os biofilmes possuem a capacidade de remoção de metais pesados presentes em efluentes e são utilizados também para biodegradação de poluentes líquidos e gases químicos.

Como mencionado anteriormente, essa formação microbiológica também pode ser encontrada associada a torres de resfriamento. Entretanto é um fato indesejado, pois ocasiona em redução na vida útil dos equipamentos, queda de eficiência, redução na transferência de calor e geração de processos corrosivos. Assim é um dos principais problemas que devem ser controlados em águas de resfriamento, principalmente devido ao aumento da resistência ao

escoamento no interior das tubulações e na redução da capacidade de troca térmica (ALVES, 2013; DONLAN, 2002; ERDEM, 2008; O'NEAL, 2010; TÜRETGEN, 2007).

3.5. Controle de crescimento microbiológico

Em torres de resfriamento é muito importante adotar medidas para o controle microbiológico. Esses métodos devem considerar especificidades do equipamento envolvido, mas, no geral, é importante usar água de boa qualidade para alimentar o equipamento, pois isso reduz a concentração de nutrientes na corrente líquida. Outras ações podem ser utilizadas para evitar o surgimento de biofilmes, como limpeza mecânica frequente, adequado projeto do equipamento, inspeção visual, dentre outros (BRAGA, 2001).

Caso o biofilme já esteja desenvolvido no sistema, alguns métodos podem ser utilizados para removê-lo, sendo os mais frequentes a adição de compostos químicos, processos físicos e mecânicos ou radiação. Aos compostos químicos utilizados dá-se o nome de biocidas sendo comum a utilização de diferentes princípios ativos, potencializando o efeito. Entretanto, alguns desses biocidas quando aplicados em ambientes naturais pode causar danos à organismos inofensivos e são compostos perigosos ao contato humano, causando problemas respiratórios quando inalados (SENEVIRATNE, 2007; TROVATI, 2004).

Os biocidas podem ser definidos como substâncias antimicrobianas que contém um ou mais ingredientes ativos capazes de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a ação de organismos vivos, sejam eles patogênicos ou não. Eles atacam componentes celulares funcionais, como parede celular, componentes da membrana citoplasmática e o citoplasma, submetendo os microrganismos a condições de estresse (BRAGA, 2001).

A dificuldade no tratamento de microrganismos com o uso de biocidas está no fato de que estes são adaptáveis à modificações no meio, devido à suas taxas de reprodução e a capacidade de transferir novas características adaptativas à futuras gerações em curtos períodos de tempo. E o uso combinado de biocidas ainda pode potencializar o desenvolvimento dessa resistência (ARAÚJO, 2011; TROVATI, 2004).

Os biocidas mais utilizados podem ser classificados em dois grupos: oxidantes e não oxidantes. O primeiro age por meio da oxidação dos seres vivos, destruindo suas estruturas

vitais e causando a morte dos mesmos. Já o segundo é composto por substâncias químicas que possuem forma de ação específicas, afetando a permeabilidade celular, sequestrando elementos da parede celular, dentre outras (ARAÚJO, 2011; SILVA, 2013; TROVATI, 2004).

Biocidas a base de cloro são mais comumente utilizados devido a sua conhecida e relatada eficiência, o baixo custo, sua aplicabilidade a uma maior diversidade de organismos e o tempo curto de ação. São pertencentes ao grupo dos biocidas oxidantes, com princípio de ação fundamentado na formação do ácido hipocloroso (HClO) (SILVA, 2013).

O conhecimento da concentração inibitória mínima do biocida é um parâmetro importante pois, quando bactérias são expostas a níveis não letais, pequenos danos são causados e pode ocorrer aquisição de resistência. Para que não ocorram tais problemas, é necessário conhecer os organismos presentes no sistema, aplicar concentrações adequadas do biocida e monitorar eficácia do tratamento. (ALVES, 2013; ARAÚJO, 2011).

Os biofilmes são 100 vezes mais resistentes a biocidas do que microrganismos planctônicos. Dessa forma, o tempo de contato do biocida com biofilmes ou sua concentração deve ser muito maior do que os aplicados às bactérias plactônicas (KIM *et al*, 2002; LUDENSKY, 2003; TÜRETGEN, 2011).

Caçador (2009) aponta que a escolha de um biocida deve considerar vários requisitos, mas sempre tendo em vista que dificilmente se encontrará um único composto que cumpra todas as exigências e, talvez, seja necessária combinação de diferentes compostos. Os principais requisitos a serem considerados são:

- Possuir atividade contra uma grande quantidade de microrganismos;
- Não ser muito tóxico para outras formas de vida;
- Biodegradabilidade;
- Não ser corrosivo;
- Não ter sua eficiência afetada pela presença de matéria orgânica e inorgânica
- Não ser responsável pela desativação de outros aditivos presentes no sistema;
- Oferecer segurança do ponto de vista da saúde, do manuseio e armazenamento;
- Possuir estabilidade perante variações de pH e temperatura.

A eficiência de um biocida pode estar atrelada à alguns fatores ambientais, como a velocidade de escoamento do líquido, tipo de biocida usado, sua concentração e tempo de

contato. Além da temperatura, pH, microrganismos presentes, a idade dos mesmos e qualidade do biofilme formado, assim como a interferência de outras substâncias dissolvidas, como cálcio, ferro e amônio (BRAGA, 2004).

Outra forma de potencializar o controle microbiológico é por meio do uso de biodispersantes. Essas substâncias possuem a capacidade de dissolver o glicocálice, substância mucilaginosa que aumenta a aderência dos microrganismos sobre superfícies, servindo também como abrigo, agrupando e alojando células de outras espécies. Quando dissolve o glicocálice, o biodispersante permite que o biocida penetre no interior do biofilme, matando células das camadas inferiores de difícil acesso ou que estejam protegidas por essa substância. (TROVATI, 2004)

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar a diversidade microbiana presente em um torre de resfriamento de água de uma fábrica de fertilizantes nitrogenados localizada no estado da Bahia.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar físico-química e microbiologicamente a água utilizada na torre de resfriamento da fábrica de fertilizantes;
- Determinar a densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) e bactérias oxidantes de amônia e nitrito, sésseis e planctônicas;
- Correlacionar os dados de densidade microbiana séssil obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) com os de biomassa aderida aos cupons, avaliada por um método comercial (kit comercial HydroBio);
- Correlacionar os dados de densidade microbiana séssil obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) com os de biomassa aderida às lâminas de vidro, avaliada por método colorimétrico;
- Isolar e identificar os microrganismos presentes nas amostras da torre de resfriamento.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Local de coleta

O estudo foi realizado em uma torre de resfriamento de uma fábrica de fertilizantes nitrogenados localizada em Camaçari, Bahia. A torre em estudo possui capacidade de 1500 m³, variação de temperatura de 30° C a 38° C. Possui metalurgia em material de aço carbono e aço inoxidável; e suas principais fontes de contaminação são amônia, uréia, óleo e dióxido de carbono. A torre estudada possui uma perda líquida total de 19 m³h⁻¹ e é abastecida por dois poços artesianos. O tratamento aplicado é com cloro gás.

5.2. Amostragem

5.2.1. Caracterização físico-química de amostras de água da torre

Amostras de água foram coletadas para avaliação dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, alcalinidade total, dureza de cálcio, amônio, condutividade, fosfato. As análises foram realizadas no laboratório de química da fábrica de fertilizantes.

5.2.2. Preparo dos corpos de prova

Lâminas de vidro (76 x 26 x 1,3 mm), cupons de aço inoxidável AISI 316 (76 x 13 x 1,6 mm) e biocupons de aço inoxidável de 10 mm de diâmetro foram utilizados como corpo de prova para o monitoramento e análise da microbiota séssil. Os corpos de prova foram escolhidos de forma a representarem o material da torre de resfriamento estudada e as lâminas de vidro foram escolhidas por apresentarem, uma boa correlação com os dados obtidos quando se usou cupons metálicos para o monitoramento de bactérias sésseis em torres de resfriamento.

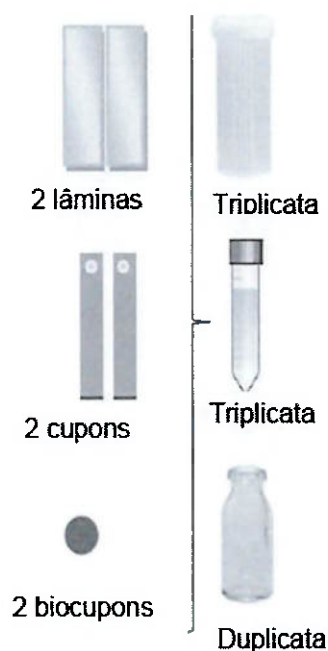
Antes de serem instalados na torre, os cupons e biocupons de aço inox foram limpos com papel absorvente para remoção do excesso de óleo, em seguida enxaguados com água destilada e imersos em tolueno para desengorduramento. Em seguida foi feita a imersão em acetona por 5 minutos e os mesmos foram secos em temperatura ambiente. Já as lâminas de vidro foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água destilada. Depois imersas em etanol 70% por 5 minutos e secas em temperatura ambiente. Após o procedimento de limpeza, lâminas e cupons foram autoclavados e, depois, manuseados com luvas látex e colocados suspensos no suporte plástico de PVC que foi instalado na torre. Biocupons de 10 mm de diâmetro foram instalados na linha de retorno da água para torre de resfriamento utilizando uma árvore de teste comumente usada em estudos de corrosão e constituída de uma bomba e linhas de PVC.

5.2.3. Coleta de amostras e transporte

Os corpos de prova permaneceram nas torres por sete dias e posteriormente foram encaminhados ao laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais para análises.

Ao serem retirados das torres, os corpos de prova foram imersos em água destilada estéril, para remoção de microrganismos não aderidos. Seis lâminas, seis cupons de aço inox e quatro biocupons de aço inox foram armazenados em frascos contendo solução salina (NaCl) estéril a 0,85% de forma que: duas lâminas de vidro foram inseridas em tubo porta lâminas contendo 35 mL (em triplicata) da solução; dois cupons de aço inox (em triplicata) foram inseridos em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo 10 mL da solução. Esses corpos de prova foram usados para estimar a densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) bactérias oxidantes de amônia e nitrito sésseis.

Figura 4: Quantidade de corpos de prova usados durante o experimento. Lâminas, cupons e biocupons de aço inoxidável para avaliação de BHTs e bactérias nitrificantes



Fonte: ALVES (2016)

Além disso, frascos âmbar estéreis, contendo 0,1% de tiosulfato de sódio usado para neutralizar a ação do cloro residual, foram utilizados para coletar amostras da água (em duplicata) das bacias das torres para quantificação de BHT e oxidantes de amônia e nitrito planctônicas (Funasa, 2004).

5.3. Determinação da densidade de bactérias sésseis e planctônicas associadas à torre de resfriamento

5.3.1. Avaliação da microbiota séssil

Em laboratório, os corpos de prova foram submetidos a banho de ultrassom em aparelho Ultra Cleaner 1650A, em três séries de 2 minutos a 40Khz para que as células aderidas fossem desprendidas dos mesmos. Depois, a solução foi homogeneizada e, então, plaqueada.

O plaqueamento foi feito pelo método “spread plate” (Método Spread Plate 9215C, APHA, 1998) a partir de alíquotas de 100 μL da amostra original e também das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}), sendo realizado em duplicata para cada amostra.

Nos casos de amostras que apresentaram baixa densidade de bactérias – inferior a 30 UFC por placa – o método utilizado foi o da membrana filtrante. Alíquotas de 1 ou 3 mL (para BHT) de cada amostra foram filtradas em membranas quadriculadas de nitrocelulose com 47 mm de diâmetro e com diâmetro de poro de 0,22 μm . Ao final do processo de filtração, as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura sólido Reasoner's 2A (R2A). Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por até 48 horas. Após o período de incubação, foi contado o número de colônias em cada placa e a densidade de microrganismos determinada em UFC mL^{-1} e posteriormente, convertida em UFC cm^{-2} , de acordo com a área estimada para cada corpo de prova: as lâminas de vidro têm área de 38,71 cm^2 , os cupons de aço inox 18,75 cm^2 e biocupons 0,008 cm^2 .

Para a determinação de bactérias oxidantes de amônia e nitrito sésseis e planctônicas foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP mL^{-1}). Esse método permite estimar a densidade da população microbiana numa amostra sem a contagem individual das células ou colônias. Assim, as amostras foram inoculadas em Caldo Amônia-Carbonato de Cálcio e Nitrito-Carbonato de Cálcio, em 3 séries de 5 tubos, sendo que em cada série foi inoculado 1 mL de cada diluição. Os tubos foram incubados a 37°C por 15 dias. Após este período, foram adicionadas 3 gotas (aproximadamente 150 μL) do reagente de Griess-Illowsky aos tubos contendo os inóculos. O aparecimento da cor vermelho-púrpura é indicativo da presença de nitrito, portanto o teste é positivo para a presença de Bactérias Oxidantes de amônia (BOA). Para os tubos que não apresentaram resultado positivo para o grupo das oxidantes de amônia, foi feito o teste para nitrato, adicionando uma gota do reagente de difenilamina. O aparecimento de uma cor azul indica que o teste é positivo para presença de Bactérias Oxidantes de Nitrito (BON), e também é positivo para o grupo BOA pois sugere que o nitrito que havia sido produzido pelas oxidantes de amônia, representadas principalmente pelo gênero *Nitrosomonas*, foi convertido em nitrato pelas bactérias oxidantes de nitrito (BON), representadas principalmente pelo gênero *Nitrobacter*. Os resultados serão expressos em NMP/mL.

5.3.2. Microbiota planctônica

As amostras de água coletadas na bacia da torre também foram submetidas à quantificação de BHT, BOA e BON, portanto, plaqueadas e incubadas da mesma forma como descrito anteriormente, contudo sem passar antes por banho de ultrassom. E no caso da filtragem dessas amostras, os volumes foram de 3 mL, 5 mL ou 10 mL. Após incubação, o número de colônias foi determinado em UFC mL⁻¹.

5.3.3. Avaliação da biomassa aderida a cupons de aço inoxidável pelo kit Hidrobio

Três cupons de aço inox tiveram sua biomassa aderida avaliada seguindo as recomendações do kit comercial Hydrobio® (BKG). Esse kit permite determinar a biomassa de biofilme aderida em cupons de aço inoxidável, expressa em gramas por m² do cupom.

De acordo com a quantidade de biofilme aderido em cada cupom, o kit categoriza a biomassa aderida em três faixas: baixa quantidade de biofilme (5-15 g.m⁻²); média quantidade de biofilme (25 g.m⁻²) e alta quantidade de biofilme (35-45 g.m⁻²). Para as duas últimas categorias, o kit adverte sobre medidas de ajuste no tratamento da água com biocida; sendo que para a segunda categoria o fabricante recomenda verificar o tratamento e para a última categoria a recomendação é de limpeza do sistema e ajuste do tratamento.

Três lâminas de vidro também foram avaliadas quanto à biomassa aderida de forma a determinar o índice de aderência (IA) microbiana às lâminas, de acordo com um método desenvolvido no laboratório de Microbiologia Aplicada que correlaciona absorbância com biomassa aderida às lâminas expressas em g.cm⁻².

5.4. Isolamento e identificação de bactérias sésseis e planctônicas presentes na torre de resfriamento

Os diferentes morfotipos de BHT sésseis e planctônicas obtidos foram isolados em culturas puras e identificados por método molecular. Para a manutenção das culturas estoques,

as bactérias foram mantidas em tubos contendo o meio Lignieri a 4 °C, e a - 80 °C em criotubos acrescidos de 20% de glicerol.

5.4.1.Extração de DNA

As células das amostras bacterianas cultivados em meio R2A foram utilizadas na extração do DNA genômico pelo método descrito por Pitcher e colaboradores (1989). Inicialmente as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,0). Foram adicionados também uma porção de esferas de vidro aos tubos que foram vortexados por 2 min. Após o período de incubação, as células foram lisadas pela adição de 600 µL de solução contendo tiocinato de guanidina 5 mol L⁻¹ (Sigma), EDTA (100 mmol L⁻¹, pH 8,0) e sarcosil 0,5% (v/v) (GES reagent). Os tubos foram agitados por inversão e incubados por 10 min. à temperatura ambiente para que ocorra a lise celular. Os tubos foram resfriados pela incubação em banho de gelo por 2 min. e, a seguir, adicionados 300 µL de solução de acetato de amônio gelada (7,5 mol L⁻¹) e novamente agitados por inversão e incubados por mais 10 min. no banho de gelo. Após esse período, 600 µL de uma mistura de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi adicionada aos tubos. Após a homogeneização da mistura em agitador tipo vortex, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 10 min. e a fase aquosa transferida para novos tubos nos quais foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. Ao final desse processo, os tubos foram incubados a -20 °C por 12 h. Após o período de incubação, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 13000 rpm por 10 min para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado duas vezes com etanol 70%. Após evaporação do etanol, os “pellets” foram ressuspensos em 50 µL de água livre de nucleases e estocados a 4 °C. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, e a concentração determinada em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 nm.

5.4.2 Amplificação por reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de regiões do gene do rDNA 16S

A amplificação de regiões do gene do rDNA 16S foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores universais para bactérias 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') (Lane, 1991) e 806R (5'- GCG GAT CCG CGG CCG CGG ACT ACC AGG GTA TCT AAT -3') (Lacroix et al., 1996). A reação de 50 μL foi constituída de 10 μL de Taq Buf IVB (5X), 1 μL de dNTP (10 mmol μL^{-1} de cada), 2 μL do oligonucleotídeo iniciador (10 pmol μL^{-1}), 0,5 μL de Taq DNA polimerase (5U μL^{-1}) (Phoneutria) e 2,0 μL de DNA (90-120 ng μL^{-1}). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando o termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min. seguido de 26 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 57 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min., finalizado por extensão final de 72 °C por 5 min. (Kushmaro *et al.*, 2006), com modificações. O produto da PCR foi quantificado em espectrofotômetro NanodropTM 1000 a 260 nm e a integridade do fragmento, de aproximadamente 900 pares de bases, analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% com a utilização de um padrão de DNA ladder 1Kb (Promega).

5.4.3. Purificação dos amplicons

Para purificação dos produtos de PCR, os tubos foram adicionados de 11,25 μL de EDTA (125 mmol L^{-1}) e 135 μL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 min. à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 13000 rpm por 25 min a 25° C para precipitação dos amplicons. O sobrenadante foi descartado e aos tubos de microcentrífuga foram adicionados 120 μL de etanol 70% (v/v). Os mesmos foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 13000 rpm por 10 min a 25° C e o sobrenadante novamente descartado. Após total evaporação do etanol residual o produto foi ressuspensionado em 10 μL de água livre de nuclease. O produto obtido foi quantificado em NanodropTM 1000 a 260 nm.

5.4.4. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados para fins de identificação das amostras. Os fragmentos foram analisados no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram editadas utilizando-se o programa Bio Edit Sequence Alignment Editor 7.2.5 version (Ibis Biosciences) e sempre que possível as sequências geradas pelos oligonucleotídeos iniciadores “forward” e “reverse” foram alinhadas para gerar sequências consenso (contigues) que foram comparadas com sequências gênicas de rDNA depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o servidor Blast do National Centre for Biotechnology Information - NCBI (Altschul *et al.*, 1997). O isolado, para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, terá que apresentar similaridade de pelo menos 97% a outra sequência já depositada no GenBank (Stackebrandt e Goebel, 1994).

Sequências da região 16S que apresentaram identidade igual ou superior a 97% e ainda mantiveram uma posição taxonômica inconclusiva foram submetidos a análise filogenética no software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011). Essa análise foi feita a partir da comparação das sequências de todas as possíveis espécies relacionadas a bactéria isolada, incluindo espécies tipo. O método da probabilidade composta é usado para estimar distâncias evolutivas com valores de bootstrap calculados a partir de 1000. A bactéria isolada foi identificada de acordo com a sequência que exibir menor distância evolutiva (Ferreira *et al.*, 2015)

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Caracterização físico-química da água da torre de resfriamento e da água clarificada

Os corpos de prova ficaram na torre de resfriamento durante 7 dias, a primeira coleta compreendendo o período entre 5 a 11 de março de 2015 e a segunda coleta entre os dias 12 e 19 de março do mesmo ano. Durante o período em que as amostras ficaram na torre de resfriamento, foram realizadas análise de alguns parâmetro físico-químicos pelo laboratório localizado na fábrica, os valores obtidos se encontram na tabela 3. Há ainda outros fatores de interesse a serem avaliados devido à sua influência na comunidade microbiana envolvida naquele sistema, como nitrito, nitrato e teor de ferro e manganês. Entretanto os mesmos não foram quantificados durante os períodos da coleta da torre. Segundo SENEVIRATNE (2007) os dois últimos estão relacionados à incrustação e o manganês também afeta o processo de corrosão.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos da torre de resfriamento IV durante as duas coletas

Parâmetro	Primeira coleta			Segunda coleta		
	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média
Condutividade ($\mu\text{S.cm}$)	1243	1158	1209,3	1152	956	1045
Alcalinidade total ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	106,0	48,3	81,0	131,7	78,0	100,0
Amônio (mg.L^{-1})	0,4	0,1	0,2	1	0,2	0,3
Magnésio (mg.L^{-1})	42,5	31	36,8	-	-	-
Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$)	121	118	119,5	238	24	96,3
pH	8,4	7,6	8,1	8,5	8	8,3
Fosfato (mg.L^{-1})	35,6	3,9	9,8	9,8	3,85	7,5

A condutividade está relacionada com os sólidos dissolvidos na água e esses valores, quando elevados, também afetam no processo de corrosão da superfície metálica; o indicado são níveis inferiores à 4000 $\mu\text{S.cm}$. Pôde-se observar que nas amostras esses valores estão dentro da faixa ótima de operação em ambos períodos de coleta (ALVES, 2016).

Já o controle dos parâmetros alcalinidade e dureza está relacionado ao fato de os mesmos indicarem a presença de carbonatos, bicarbonatos, cálcio e magnésio, os quais podem ocasionar em incrustações. Os valores encontrados nas duas coletas estão dentro da faixa recomendada, inferiores à 400 ppm CaCO_3 . (TROVATI, 2004)

Alguns estudos também apontam limites internacionais para parâmetros químicos para água de reuso ou para circuitos de resfriamento de água. Os valores aceitáveis para o íon amônio devem ser inferiores à 1,0 mg.L^{-1} , e foi possível constatar que esse parâmetro estava adequado em ambas as coletas. O fósforo, assim como o nitrogênio, é um elemento importante para o crescimento de microrganismos e é medido pelo parâmetro fosfato. Os valores aceitáveis são inferiores à 4 mg.L^{-1} , e foi possível observar que os valores medidos se encontram, em média, acima do recomendado (9,8 mg.L^{-1} na primeira coleta e 7,5 mg.L^{-1} na segunda coleta) (MACHADO, 2005)

O pH em ambas as coletas se apresentou dentro da faixa recomendada, entre 6,5 e 8,5.

6.2. Avaliação da densidade microbiana associada à torre de resfriamento

Os valores das densidades de bactérias planctônicas e sésseis associadas à torre nas duas épocas de coleta estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Densidade média de bactérias heterotróficas totais planctônicas e sésseis encontradas nas coletas

Planctônica (UFC mL ⁻¹) ^{1/}		
	Coleta 1	Coleta 2
	$1,39 \times 10^4 \pm 9,72 \times 10^3$	-
Séssil (UFC cm ⁻²) ^{2/}		
Corpos de prova	Coleta 1	Coleta 2
Lâminas de vidro	$1,32 \times 10^3 \pm 6,96 \times 10^2$	$2,89 \times 10^2 \pm 3,10 \times 10^2$
Cupons de aço inox	$1,28 \times 10^4 \pm 1,27 \times 10^4$	$5,68 \times 10^2 \pm 5,77 \times 10^2$
Biocupons de aço inox	$1,23 \times 10^9$	-

^{1/}UFC mL⁻¹: Unidade formadora de colônia por mililitro, ^{2/}UFC cm⁻²: Unidade formadora de colônia por centímetro quadrado, - análise não realizada devido a perda da amostra durante o transporte do local de coleta ao local de análise

Os valores de BHT planctônicas na coleta 1 foi inferior à 10^4 UFC mL⁻¹, dessa forma se encontram de acordo com recomendação do Instituto de tecnologia de resfriamento (*Cooling Technology Institute* – CTI). Veiga *et al* (2010) em seu trabalho também obteve valores dentro do indicado pelo instituto ao realizar um estudo para avaliar o efeito da manutenção do cloro residual livre na bacia de três torres de resfriamento piloto de uma refinaria de petróleo. Em seu trabalho, Peres *et al* (2008) avaliando diferentes tratamento da água de resfriamento de uma indústria siderúrgica e a presença de microrganismos planctônicos verificou que a contagem de BHT também estava de acordo com os valores recomendados pelo CTI.

Quanto às BHTs sésseis, o instituto recomenda valores inferiores à 10^5 UFC cm⁻², os valores determinados para lâminas de vidro e cupons de aço se adequaram à recomendação, porém, observa-se que os biocupons obtiveram maior adesão de microrganismos que o ideal, uma provável explicação para essa diferença é o formato do material que pode ter propiciado um maior desenvolvimento do biofilme formado nele. Dentre os demais corpos de prova, os cupons tiveram uma maior formação de biofilme pouco superior ao das lâminas na primeira coleta e não foi observada diferença significativa entre os corpos de prova na segunda coleta. Observando os dados das lâminas e dos cupons, pode-se perceber que houve maior adesão na primeira coleta, essa alteração pode ter sido referente à influência dos parâmetros físico e químicos na eficácia do tratamento realizado pelo adição do cloro gás.

Um estudo realizado por Veiga *et al* (2010) avaliou também as bactérias aderidas em corpos de prova de diferentes materiais: aço carbono, cobre e aço inox. O estudo fez uma comparação entre períodos de permanência de 9 e 31 dias nas torres de resfriamento. Nesse caso, os autores observaram uma diferença na adesão entre as datas de análise e do corpo de prova utilizado, sendo que cada material teve um comportamento diferente quanto aos períodos de coleta. Em geral, poucas amostras ultrapassaram os valores recomendados pelo CTI.

Essa variação quanto à adesão à corpos de prova pode ser devido às interações físico-químicas que o biofilme possui com o substrato, algo que acredita-se ter influência sobre a formação do mesmo. Estudos comparativos entre corpos de prova indicam haver uma diferença na adesão para variados metais, isso ocorre devido ao comportamento que cada material possui referente ao ataque corrosivo e à colonização por microrganismos. Quanto ao vidro, estudos apontam que sua adesão é inferior à que ocorre em metais. (ALMEIDA *et al*, 2002; TÜRETGEN, 2007).

A densidade de bactérias oxidantes de amônia (BOA) e nitrito (BON) planctônicas e sésseis presentes em amostras da bacia da torre foram quantificadas pela técnica do número mais provável (NMP) e os valores obtidos se encontram na tabela 5.

Tabela 5: Densidade de bactérias oxidantes de amônia (BOA) e nitrito (BON)

Planctônica (NMPmL ⁻¹) ^{1/}				
Coleta	BOA		BON	
1	> 5,45 x 10 ³		1,17 x 10 ²	
2	>6,77 x 10 ³		1,43 x 10 ³	
Séssil (NMPcm ⁻²) ^{2/}				
Coleta	BOA		BON	
	Cupom	Lâmina	Cupom	Lâmina
1	2,84 x 10 ³	6,89 x 10 ²	1,42 x 10 ³	0
2	3,15 x 10	1,38 x 10 ³	3,47 x 10 ⁻¹	6,89 x 10 ²

^{1/}NMP mL⁻¹: Número mais provável de bactérias por mililitro, ^{2/}NMP cm⁻²: Número mais provável de bactérias por centímetro quadrado

Os grupos BOA e BON foram observados dentre a microbiota séssil e planctônica das duas coletas, exceto na avaliação da microbiota séssil das lâminas de vidro da primeira coleta. De modo geral, a densidade de BOA e BON variou com a época de amostragem e com o corpo de prova analisado. Os valores para a microbiota planctônica foram maiores na segunda coleta. Em relação à microbiota séssil, os cupons foram os corpos de prova que tiveram maior adesão na primeira coleta. Já na segunda coleta, houve predominância nas lâminas de vidro. De forma geral, foram encontrados mais bactérias nitrificantes planctônicas na segunda coleta e a prevalência desses organismos na forma sésseis na primeira coleta. O material do corpo de prova pode ter influenciado na aderência dos organismos do grupo das nitrificantes também, ocasionando na maior adesão no material de aço do que no de vidro. E as condições ambientais entre as coletas pode ter afetado a presença de bactérias na forma planctônica e séssil, pois foi verificada variação entre os parâmetros físico-químicos entre as coletas.

É possível que os dados da densidade de bactérias oxidantes de amônia planctônica possa estar subestimada, uma vez que as diluições utilizadas apresentaram resultados positivos para todos os tubos. Este padrão é analisado quando todos os 5 tubos das diferentes diluições analisadas dão positivo, dessa forma o valor fornecido pela tabela para quantificação de bactérias é superior a 1600, o que resulta em imprecisão.

Esta variação na densidade de BHT, BOA e BON em função do material do corpo de prova já foi relatada em outros estudos. Alves (2016), realizando estudo semelhante em outra torre da mesma fábrica de fertilizantes observou uma variação entre a época das coletas e o corpo de prova utilizado, mas a aderência foi significativamente maior nas lâminas de vidro para as BHT, já as diluições utilizadas para quantificar as bactérias nitrificantes não se mostrou suficiente.

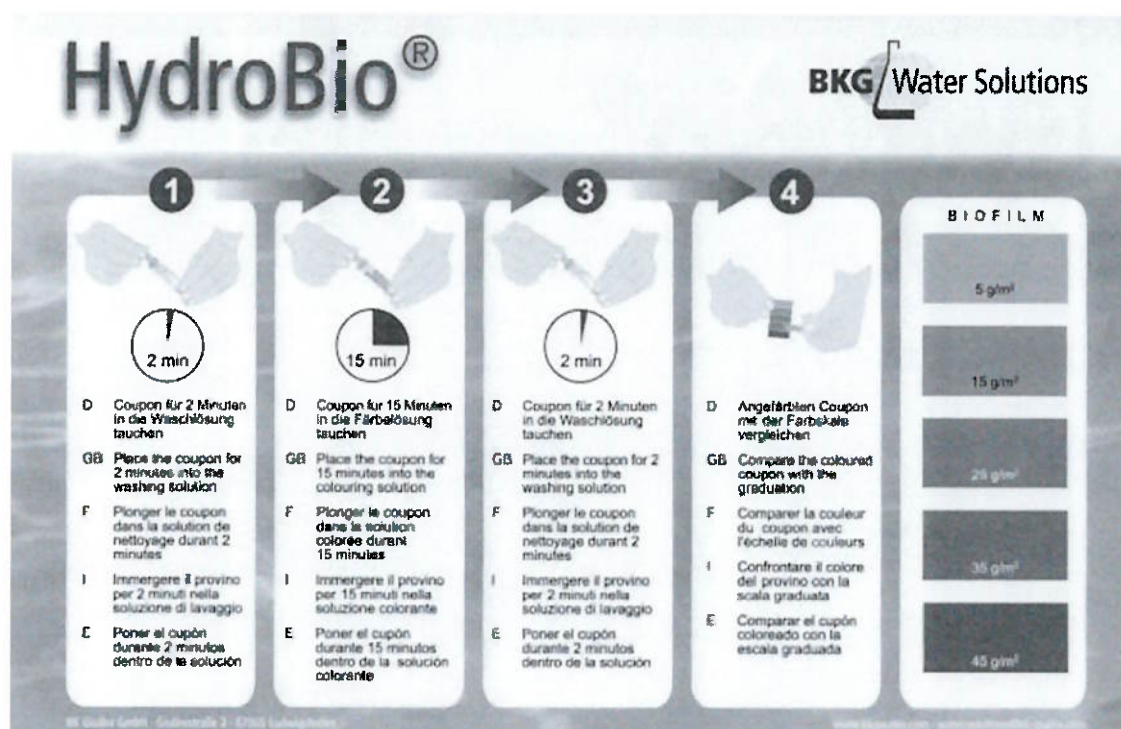
6.3. Avaliação da biomassa aderida aos corpos de prova a partir de métodos colorimétricos

Para facilitar análises necessárias nos mais diversos seguimentos industriais, diversas metodologias são propostas. A utilização de métodos colorimétricos objetiva tornar mais simples a quantificação de microrganismos sésseis. Para verificar a eficácia de alguns desses métodos, foi feita uma comparação dos dados obtidos através da metodologia de contagem das

unidades formadoras de colônia (UFC) com os dados do teste usando o kit da Hydrobio® (BKG) para os cupons de aço inox. Já para as lâminas de vidro, foi feita uma contraposição entre os valores obtidos pelo método do índice de aderência (IA).

A determinação da biomassa do biofilme utilizando o kit da Hydrobio é feita comparando a cor observada nos cupons com uma escala de cor fornecida pelo fabricante que é correlacionada com a biomassa do biofilme em g.m^{-2} (Figura 4). Os valores da biomassa associada a cupons de aço carbono corados corresponderam a 15 g.m^{-2} para a primeira coleta e 5 g.m^{-2} para a segunda.

Figura 5: Metodologia para utilização do kit Hydrobio®.



Fonte: BKG Water Solutions (<http://www.kurita.eu/en/>)

É possível perceber que houve uma diminuição na densidade de BHTs entre a primeira e a segunda coleta, assim como havia sido verificado pela metodologia de determinação da densidade baseada em diluição seriada e plaqueamento em meios de cultivo padrão.

O kit ainda possibilita avaliar se essa concentração de biofilme é considerada baixa, média ou alta constituindo risco para a torre. Através da escala é possível concluir que a

biomassa do biofilme não impõe risco de corrosão ao sistema e que o controle microbiano está adequado.

Outro método indireto utilizado é o de Índice de aderência (IA) o qual é patenteado por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia Aplicada e a equipe do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Petrobrás (CENPES). Nela, os valores de índice de aderência medidos a 531 nm são correlacionado com a biomassa de biofilme aderido à lâminas de vidro, usando a seguinte expressão matemática: $Y = 0,1243 X$, em que a variável “y” se refere ao valor de absorvância a 531 nm e “x” a densidade microbiana expressa em g.cm^{-2} .

A tabela 6 apresenta os valores obtidos para cada coleta, os dados indicam um pequeno aumento na densidade microbiana entre a primeira e a segunda coleta, com uma diferença muito pequena, realizando a análise de teste de variância e análise de variância (ANOVA), pode-se dizer que esses valores são estatisticamente iguais. Comparando esses valores com os obtidos analisando UFC, pode-se verificar que esta metodologia mostravam uma queda na presença de microrganismos. Essa disparidade pode estar relacionada a diversos fatores, como o fato de que ambas metodologias colorimétricas avaliam a biomassa total em que são quantificados outros grupos microbianos que não crescem no meio de cultivo para BHTs ou mesmo organismos que não são cultiváveis.

Tabela 6: Índice de aderência das lâminas depositadas na bacia da torre IV

	Índice de aderência	Densidade microbiana (g cm^{-2})
Primeira coleta	$0,2 \pm 0,06$	1,6
Segunda coleta	$0,22 \pm 0,02$	1,8

g cm^{-2} = grama por metro quadrado

Assim, percebe-se que os métodos colorimétricos possuem uma correlação com os dados obtidos pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias. Os resultados podem variar porque esses métodos quantificam toda a biomassa presente no corpo de prova, o que pode ser uma vantagem, além de que também permitem obtenção de resultados de forma mais rápida.

6.4. Isolamento e identificação de bactérias sésseis e planctônicas presentes na torre de resfriamento

Foi possível isolar 41 diferentes morfotipos a partir do crescimento em meio de cultura das amostras coletadas na bacia da torre. Foram analisadas características morfológicas de cor, brilho, forma da borda, superfície, elevação, centro e consistência. A descrição destas morfoespécies estão apresentadas no apêndice (A). A identificação dessas amostras foi feita por meio do sequenciamento de regiões do rDNA 16S (Tabela 7).

Foi possível isolar 34 bactérias na primeira coleta e 7 na segunda coleta. Isso aponta como a diversidade de bactérias diminuiu entre as análises. Até a conclusão desse trabalho, 10 amostras não haviam sido sequenciadas e não foram identificadas as espécies de 18 amostras.

No total, foram encontrados 6 gêneros diferentes: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas*. Enquanto representantes de todos esses gêneros foram observados na primeira coleta, na segunda, somente amostras de *Pseudomonas* foram observadas, provavelmente como resultado do efeito dos parâmetros físico-químicos sobre o tratamento microbiano com cloro em gás aplicado durante a segunda coleta que, além de reduzir a densidade da microbiota, reduziu também a diversidade. A figura 5 apresenta a percentagem dos diferentes gêneros isolados nas duas coletas. É possível observar que mais da metade das bactérias cultiváveis isoladas da torre são pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Figura 6: gráfico com percentual dos gêneros que foram identificados dos isolados das duas coletas.

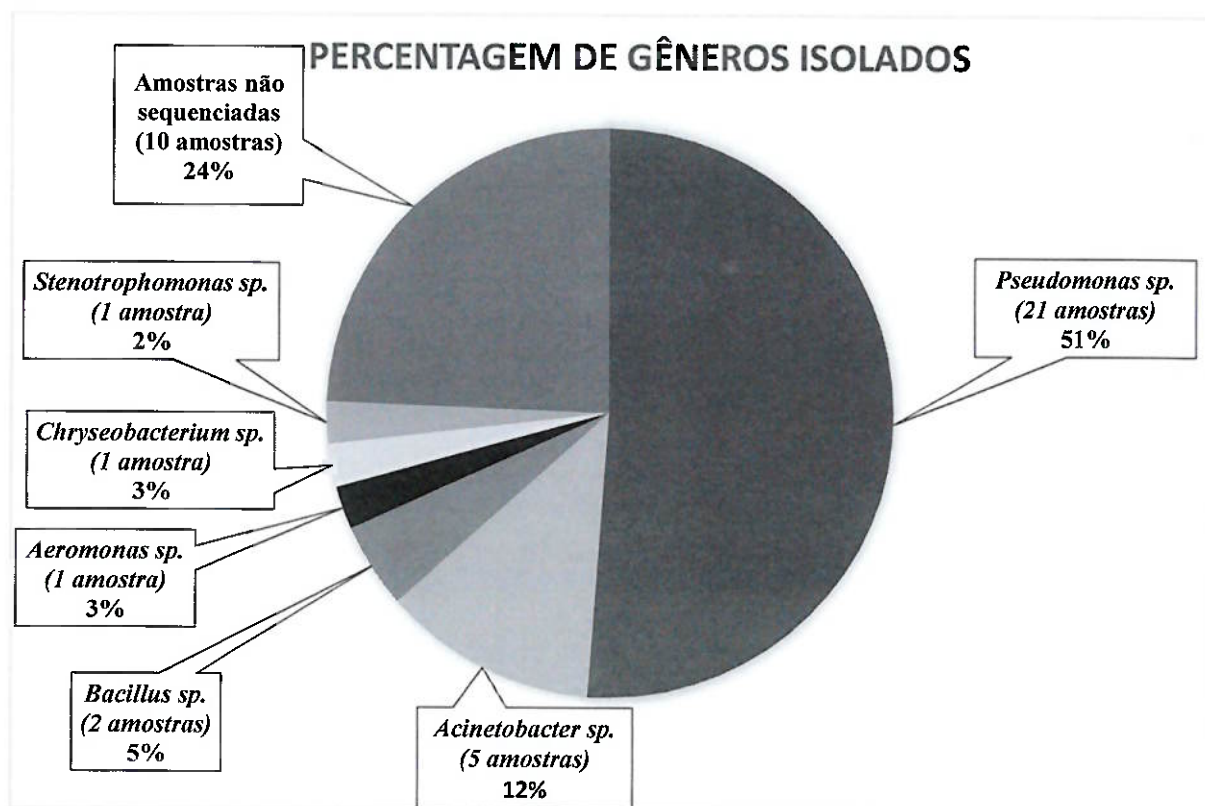


Tabela 7: Densidade dos gêneros isolados por coleta e na forma planctônica e sésil

Gênero / espécie	Séssil						Planctônica (UFC mL ⁻¹)	
	Biocupom (UFC cm ⁻²)		Cupom (UFC cm ⁻²)		Lâmina (UFC cm ⁻²)			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	4,91 X 10 ⁴	-	-	-	-	-
<i>A. junii</i>	-	-	-	-	2,51 X 10 ⁵	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	9,04 X 10 ²	-	-	-
<i>A. venetianus</i>	-	-	-	-	-	-	5,62 X 10 ³	-
<i>Aeromonas veronii</i>	-	-	-	-	1,06 X 10 ³	-	-	-
<i>Bacillus sp</i>	-	-	-	-	4,52 X 10	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	1,36 X 10 ²	-	-	-
<i>Chryseobacterium hispalense</i>	-	-	-	-	9,00 X 10 ²	-	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>	2,50 X 10 ⁷	-	2,67 X 10	-	-	-	1,80 X 10 ⁴	-
<i>P. otitidis</i>	-	-	1,33 X 10 ³	-	-	8,14 X 10	-	-
<i>P. stutzeri</i>	-	-	9,44 X 10 ²	-	-	-	1,16 X 10 ⁴	-
<i>P. guzei</i>	-	-	1,67 X 10 ⁴	5,65 X 10 ³	1,81 X 10 ²	-	3,64 X 10 ⁴	-
<i>P. chengduensis</i>	1,93 X 10 ⁹	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	2,38 X 10 ⁹	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. alcaliphila</i>	6,00 X 10 ⁸	-	-	-	-	-	-	-

<i>Stenotrophomonas sp</i>	-	-	$2,19 \times 10^3$	-	-	-	-	-
4B4	-	-	$3,76 \times 10^3$	-	-	-	-	-
4B5	-	-	$1,50 \times 10^3$	-	-	-	-	-
4B6	-	-	$1,63 \times 10^4$	-	-	-	-	-
4B8	-	-	$2,31 \times 10^3$	-	-	-	-	-
4B14	-	-	$2,67 \times 10$	-	-	-	-	-
4B27	-	-	-	-	$4,52 \times 10^2$	-	-	-
4B28	-	-	-	$1,59 \times 10^3$	-	-	-	-
4B31	-	-	-	$1,09 \times 10^2$	-	-	-	-
4B32	-	-	-	-	-	$1,01 \times 10^3$	-	-
4B34	-	-	-	-	-	$4,52 \times 10$	-	-
Total	$4,93 \times 10^9$	0	$9,42 \times 10^4$	$7,35 \times 10^3$	$2,54 \times 10^5$	$1,14 \times 10^3$	$7,16 \times 10^4$	0

A tabela confirma a predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas sp.* Esse gênero é formado por bactérias gram-negativas, aeróbias, não formadoras de endósporos, com formato de bastonete e a maioria possui flagelos que lhe conferem mobilidade. Algumas espécies são fluorescentes e outras não. Crescem em pH neutro, a temperatura ótima para as espécies do gênero é aproximadamente 28° C. O pH durante as coletas foi de 8,1 e 8,3, próximo à neutralidade e as temperaturas da torre são pouco superiores à ótima, sendo entre 30°C e 38°C, condições que permitem a presença desse gênero (CAIXETA, 2008; OLIVEIRA, 2013).

Algumas espécies são patogênicas para humanos, animais e plantas. Outras, como a *P.strutzeri* e a *P.pseudoalcaligenes*, podem metabolizar diversos substratos, sendo utilizadas em processos de biorremediação e tratamento de águas residuais (LEAL,2015; MICROBEWIKI, 2012; SILLANKORVA, 2004).

Como pode ser observada na tabela anterior, bactérias do gênero *Acinetobacter sp* foram isoladas na primeira coleta na forma sésil (cupons e lâminas) e planctônica. As bactérias pertencentes a esse gênero possuem a forma de bacilo, são imóveis, gram-negativas e não formam esporos. Estão presentes na água solo e microbiota de humanos e animais, por terem uma alta versatilidade nutricional e metabólica. É necessário um cuidado com os organismos desse gênero, pois é um patógeno oportunista relacionado com casos de pneumonia e que acomete, principalmente, pacientes imunodeprimidos e internados em unidades de terapia intensiva. O tratamento muitas vezes é complicado pois a bactéria pode apresentar resistência a diversos medicamentos e facilidade em se adaptar a ambientes hostis, com diferentes condições de temperatura e pH (LUZ, 2010; MARTINS, 2010; TAKAGI, 2011).

Estudos de monitoramento da qualidade microbiológica de água purificada para uso em ambiente de saúde (MARTINS, 2002) e no esgoto doméstico e hospitalar (FERREIRA, 2015) isolaram diferentes espécies patogênicas do gênero. Representantes do gênero também já foram descritos em uma torre de resfriamento de uma fábrica de substâncias químicas na China (WANG *et al*, 2013).

Aeromonas sp, *Bacillus sp* e *Chryseobacterium sp* foram encontrados apenas na primeira coleta e nas lâminas de vidro. O primeiro gênero possui a forma de bacilos, sendo gram-positivas, anaeróbias facultativas e encontrado frequentemente em ambientes aquáticos. Eventualmente são patógenos de répteis, mamíferos e humanos imunocomprometidos. Nesses últimos pode causar gastroenterite, diarreia e, principalmente, infecções respiratórias e

generalizadas. O risco da presença desses microrganismos é que o contágio pode se dar pelo contato de feridas com a água contaminada ou da ingestão da mesma (MARQUES, 2011).

O isolado identificado ainda possui a capacidade de formar biofilme, o que o torna mais resistente à desinfetantes. A maioria das espécies cresce bem à 37° C, mas sua temperatura ótima se encontra na faixa entre 22° C e 28° C e o pH entre 5,5 e 9 (MARQUES, 2011). A temperatura da torre em estudo se encontra na faixa entre 30° C e 38° C, superior às suas condições ótimas de crescimento, mas o pH na torre na época em que foi isolado se encontrou dentro da sua faixa ótima (8,1).

Já o gênero *Bacillus* é composto por bactérias gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, com formação de esporos resistentes ao calor, frio, radiação, dessecação e à desinfetantes. São de natureza ubíqua, colonizando solo, água, pó do ar, microbiota intestinal do homem e outros animais. É um grupo diversos, que inclui espécies patogênicas e outras que sintetizam importantes antibióticos (MARANGONI, 2010; MICROBEWIKI, 2010).

A presença desses organismos em torre de resfriamento é comum. Bactérias esporuladas como os *Bacillus sp* causam problemas devido sua capacidade em formar biofilme e esporos de difícil destruição. O pH ideal para o gênero é de 5 a 8 e a temperatura se encontra na faixa entre 20° C e 40° C, a torre IV se encontrava dentro dessas condições nos períodos de estudo (MACHADO, 2005).

Quanto ao gênero *Chryseobacterium*, inclui bacilos gram-negativos, não móveis, e são comumente encontrados em solo, água doce, esgoto e em associação com plantas, entre outros. Algumas espécies possuem a capacidade de reduzir nitrato e nitrito. É um patógeno ambiental oportunista, podendo causar bacteremia, meningites, sépsis abdominais e infecção de feridas. O controle de sua presença é dificultado por ser uma bactéria multirresistente a antimicrobianos (MIGUEL, 2011; DIAS, 2007).

Em estudo que buscava avaliar a formação de biofilmes em diferentes condições e demonstrar a equivalência entre as bactérias presentes nesses, realizou testes em uma planta industrial alimentícia e em um domicílio localizado em Tokyo. As coletas foram feitas em uma torre de resfriamento e no encanamento do banheiro (FURUHATA *et al*, 2008). Foram isolados nesses ambientes os gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium* e *Acinetobacter*.

O gênero *Stenotrophomonas* foi identificado apenas para uma amostra bacteriana isolada de cupom. São organismos gram-negativos, aeróbios obrigatórios e móveis por flagelo

polar. Podem ser patógenos do trato respiratório humano acometendo pacientes com baixa imunidade e são multirresistentes à medicamentos devido, principalmente, à sua variabilidade genética, que facilita sua adaptação a novas condições ambientais e sua capacidade de adquirir genes de resistência através de outras bactérias já adaptadas. Esse processo é conhecido como Transferência Genética Horizontal (TGH) (BROOKE, 2012; KRAENKEL, 2013).

Um outro estudo conduzido por Alves (2016) durante o mesmo período em outra torre de resfriamento da mesma fábrica apresentou uma maior densidade e diversidade microbiana. Foram isoladas 81 amostras e 16 gêneros distintos, dentre eles se encontraram algumas das amostras isoladas da torre IV: *Aeromonas sp*, *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* e *Stenotrophomonas sp*.

Observando a adesão desses microrganismos nos diferentes corpos de prova testados, pôde-se perceber que houve uma maior diversidade na primeira coleta realizada na lâmina de vidro, isso possivelmente porque os compostos químicos usados para tratamento possuem uma reação com o material que serve de substrato, o que pode ter ocasionado nessa variedade de organismos na lâmina de vidro.

A resposta das bactérias ao tratamento por biocida utilizado é determinado pela natureza do agente químico e o tipo de organismo envolvido. Organismos em biofilme possuem maior proteção que os sésseis, e a densidade dos mesmos também pode afetar na ação do composto químico. Bactérias gram-negativas costumam ser menos sensíveis à aplicação de tais compostos, a propriedade de formar endósporos também permite maior resistência (MORENTE *et al.*, 2013). O composto químico aplicado também possui diferente interação com os mais variados organismos, o cloro em gás, tratamento utilizado na torre em estudo possui diferente relação com alguns dos gêneros isolados na torre IV. Foi observado que algumas espécies de *Pseudomonas sp*. são resistentes ao cloro (ALVES, 2014), esporos de organismos do gênero *Bacillus sp*. são mais resistentes à desinfecções que todos os tipos de bactérias (LOURENÇÃO, 2009)

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho observou-se que houve variação na densidade bacteriana planctônica e sésil durante as coletas realizadas. Essa diferenciação pode estar relacionada às variações das condições físico-químicas da torre estudada, a qual pode ter influenciado na eficácia do tratamento com cloro em gás na torre nos diferentes períodos. O formato do biocupom pode ter ocasionado na adesão superior aos demais corpos de prova. E em relação à formação do biofilme no aço inox e no vidro, a diferenciação pode ter ocorrido devido à interação do mesmo com o material do substrato, estudos relatam uma maior adesão de biofilmes em metais do que em vidro.

A diversidade também variou entre as análises, podendo estar atrelada também às condições ambientais geradas pelos parâmetros físico-químicos e o biocida empregado. Na segunda coleta apenas foram isolados organismos sésseis do gênero *Pseudomonas*. Enquanto na primeira coleta, além desse gênero, também foram encontrados na forma sésil e planctônica: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas*. Também foi observada maior diversidade na lâmina de vidro, possivelmente devido à diferente ação do biocida na presença de diferentes materiais.

O estudo também permitiu perceber que os métodos colorimétricos possuem uma correlação com os valores utilizados na metodologia de quantificação de unidades formadoras de colônia, porém os dados podem divergir pois esta avalia apenas grupos microbianos cultiváveis em meio para BHTs enquanto os métodos colorimétricos avaliam a biomassa total, apresentando assim uma vantagem em relação ao método tradicionalmente utilizada, além de demandarem avaliações mais rápidas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. Difference Between Heterotrophs & Autotrophs. **eHow**, 2013. Disponível em <
http://www.ehow.com/info_8274633_difference-between-heterotrophs-autotrophs.html >

Acesso em 04 de Junho de 2016

ALMEIDA, M. A. N. SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Monitoramento da formação de biofilme em torre de refrigeração. **8ª conferência sobre tecnologia de equipamentos**, Salvador, Bahia, 2002.

ALVES, A. L. Estudo da diversidade e avaliação de biocidas clorados no controle da microbiota sésil e planctônica associada a sistemas de resfriamento de água. 2016, 108 f., (mestrado em microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

ALVES, A. L. Monitoramento da microbiota associada a torres de resfriamento de uma refinaria de petróleo operando com efluente terciários ou água doce clarificada e clorada como água de reposição. 2013, 50 f. (Trabalho de conclusão de curso em ciências biológicas), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

ALVES, C. C. Implementação de um método de pesquisa e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* na rede de distribuição de águas de consumo da AGERE/EM. 2014, 163f. (dissertação mestrado em engenharia biológica), Universidade do Minho.

ARAÚJO, P.; LEMOS, M.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**.

BOE-HANSEN, R.; MARTINY, A. C.; ARVIN, E.; ALBRECHTSEN, H. -J. Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions. **Water Science and Technology**, v.47, n. 5 p. 91-97, 2003.

BOLTON, N.; CRITCHLEY, M.; FABIEN, R.; CROMAR, N.; FALLOWFIELD, H. Microbially influenced corrosion of galvanized steel pipes in aerobic water systems. **Journal of Applied microbiology**, v. 109, p. 239-247, 2010.

BRASIL. Decreto nº 86.955, de 18 de fevereiro de 1982. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. Diário oficial da União, seção 1, p. 3241, 24 de fevereiro de 1982.

BROOKE, J. *Stenotrophomonas maltophilia*: na Emerging Global opportunistic pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v.25, n.1, p. 2-41, 2012.

CAÇADOR, M. P. Controlo de biofilms indesejáveis – utilização de biocidas em meios hospitalares. 2009, 102f. (Mestrado em biotecnologia), Universidade do Minho.

CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfícies de aço inoxidável. 2008, 86f. (Dissertação para programa de pós graduação em microbiologia agrícola), Universidade Federal de Viçosa.

CHARACKLIS, W. G.; TRULEAR, M. G.; BRYERS, J. D. Dynamics of biofilm processes: methods. **Water Res.**, v. 16, p. 1207-1216, 1982.

CHOUDHURY, M. R.; HSIEH, M. K.; VIDIC, R. D.; DZOMBAK, D. A. Corrosion management in power plant cooling systems using tertiary-treated municipal water as makeup water. **Corrosion Science**, v. 61, p. 231-241, 2012.

CONTI, F. Muitas dicas. **Laboratório de informática, ICB –UFPA**. Disponível em < - <http://www.cultura.ufpa.br/dicas/> > Acesso em 04 de Julho de 2016

CORTINOVIS, G. F.; SONG, T. W. Funcionamento de uma torre de resfriamento de água. **Revista de graduação da engenharia química**, v. VI, n.14, 2005.

DASGUPTA, D.; GHOSH, R.; SENGUPTA, T. K. Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, 13p, 2013.

DELAUNOIS, F.; TOSAR, F.; VITRY, V. Corrosion behaviour and biocorrosion of galvanized steel water distribution systems. **Bioelectrochemistry**, v. 97, p. 110-119, 2014.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International biodeterioration & biodegradation**, p. 227-245, 1995.

DIAS, F. N. Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual de óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo. 2007, 136f. (Dissertação Programa de pós-graduação em tecnologia bioquímico-farmacêutica), Universidade de São Paulo.

DIAS, V. P.; FERNANDES, E. Fertilizantes: uma visão global sintética. **BNDES setorial**, Rio de Janeiro, n. 24, p. 97-138, 2006.

DOGRUOZ, N.; MINNOS, B.; SUNGUR, E. I.; ÇOTUK, A. Biofilm formation on copper and galvanizes steel surfaces in a cooling- water system. **IUFS journal of biology**, v.68, n.2, p. 105-111, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n.9, p. 881-890, 2002.

ERDEM, A. K.; YÜRÜDÜ, N. O. S.; AYDOGDU, E. Ö. A.; DOGRUOZ, N.; ZEYBEK, Z.; TÜRETGEN, I.; COTUK, A. Quantitative microbiological analysis of biofilm communities from the surfaces of diferente cooling tower materials. **IUFS journal of biology**, v. 67(1), p. 9-16, 2008.

FERREIRA, J. C. Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário. 2015, 162f. (Dissertação para mestrado em engenharia ambiental), Universidade Tecnológica do Paraná.

FERREIRA, M. C. et al. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36-44, 4// 2015. ISSN 0305-1978. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030519781400341X>>.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews**. V. 8 P. 623-633, 2010.

FLETCHER, M. Attachment of *Pseudomonas fluorescents* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2027-2030, 1988.

FURUHATA, K.; KATO, Y.; GOTO, K.; HARA, M.; FUKUYAMA, M. Diversity of heterotrophic bacteria isolated from biofilm samples and cell surface hydrophobicity. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, vol. 55, p. 69-74, 2009.

GOMES, E. B. Biotratamento de resíduo oleoso da indústria do petróleo por batelada sequencial e avaliação da ecotoxicidade. 2008, 219f. (Tese de doutorado para programa pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro.

KIM, B. R.; ANDERSON, J. E.; MUELLER, S. A. GAINES, W. A.; KENDALL, A. M. Literature review – efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. **Water research**, vol. 36, p. 4433-4444, 2002.

KOOIJ, D. V. D.; VEENENDAAL, H. R.; LORIST, C. B.; KLIFT, D. W. V. D.; DROST, Y.C. Biofil formation on surfaces of glass and Teflon exposed to treated water. **Wat. Res.**, v. 29, n. 7, p 1955-1962, 1995.

KRAENKEL, S. Pesquisador da USP caracteriza geneticamente bactéria responsável por infecções hospitalares. **USP**. 12 de julho de 2013. Disponível em: <<http://www.usp.br/aun/exibir.php?id=5345>> Acesso em 04 de junho de 2016.

KROUKAMP, O.; WOLFAARDT, G.M. CO₂ production as an indicator of biofilm metabolism. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4391-4397, 2009.

LEAL, C. D. Avaliação do efeito de diferentes relações DQO/N sobre o processo anammox e viabilidade da aplicação do processo como pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto doméstico. 2015, 142f. (Dissertação do programa de pós-graduação em saneamento, meio ambiente e recursos hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais.

LIMA, C. J. B.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactante. **Ciência e Engenharia**, v. 16, n.1/2, p. 73-79, jan-dez. 2007.

LIMA, P. C. R. **Fábrica de fertilizantes nitrogenados e produção de etanol no norte fluminense**. Consultoria legislativa, 2007.

LITTLE, B.; WAGNER, P.; MANSFELD, F. An overview of microbiologically influenced corrosion. **Electrochimica Acta**, v. 37, n. 12, p. 2185-2194, 1992.

LOPES, R. B. M. Montagem e análise do genoma parcial de *Bacillus thuringiensis* BAC3151 endofítico das folhas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). 2015, 81f. (Dissertação para programa de pós graduação em microbiologia agrícola), Universidade Federal de Viçosa.

LOURENÇO, J. Avaliação da resistência de microrganismos patogênicos à desinfecção sequencial com Ozônio-Radiação ultravioleta e Cloro-Radiação ultravioleta. 2009, 162f. (Dissertação para metrado em engenharia hidráulica e saneamento), Universidade de São Paulo.

LUDENSKY, M. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 51, p. 255-263, 2003.

LUZ, A. P. F. *Acinetobacter* spp resistente a antimicrobianos carbapenêmicos isolados de infecções hospitalares de corrente sanguínea: Estudo do Projeto SCOPE Brasil. 2010, 98f. (Tese para obtenção do título de mestre em ciências), Universidade Federal de São Paulo.

MACÊDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmaucêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v.2, n. 7, p. 19-24, 2000.

MACHADO, I. F. Tratamento terciário de efluente de estações de tratamento por lodo ativado para fins de reuso como água de reposição em torres de resfriamento. 2005, 145f. (Trabalho final do Programa de Pós graduação em Saúde Pública), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca.

MAILLARD, J.-Y. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of applied microbiology Symposium supplement**, v. 92, p. 165-275, 2002.

MARANGONI, P. R. D. Caracterização de biofilmes formados em superfícies metálicas e biocorrosão. 2010, 103f. (Dissertação para pós-graduação em microbiologia, parasitologia e patologia), Universidade Federal do Paraná.

MARQUES, C. L. M. Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. Isoladas durante um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004. 2011, 74f. (Tese para curso de doutorado em saúde pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

MARSHALL, K. C.; Microbial adhesion in biotechnological processes. **Currente opinion in biotechnology**, p. 296-301, 1994.

MARTINS, A. F. Caracterização epidemiológica e molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos da cidade de Porto Alegre. 2010 174f. (Tese de doutorado para programa de pós-graduação em medicina), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MARTINS, A. M. S. Identificação e verificação da resistência aos sanitizantes dos microrganismos presentes na água destinada ao abastecimento público e em um sistema de purificação. 2002, 166f. (Dissertação para obtenção do grau de mestre), Universidade de São Paulo.

MEYLHEUC, T.; METHIVIER, C.; RENAULT, M.; HERRY, J. M.; PRADIER, C. M.; FONTAINE, M. N. B. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Biointerfaces**, v.52, p. 128-137, 2006.

/ MICROBEWIKI. Bacillus, 8 de maio de 2016. Disponível em: < <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus> > Acesso em 27 de abril de 2016.

MIGUEL, P. S. B. Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de *Coffea canephora* em três estádios de maturação. 2011, 61f. (Dissertação para programa de pós graduação em microbiologia agrícola), Universidade Federal de Viçosa.

MITTELMAN, M. W.; PACKARD, J.; ARRAGE, A. A.; BEAN, S. L.; ANGELL, P.; WHITE, D. C. Test systems for determining antifouling coating efficacy using on-line detection of bioluminescence and fluorescence in a laminar-flow environment. **Journal of microbiological methods**, 18, p. 51-60, 1992.

MOMBA, M. N. B.; MAKALA, N. Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems. **Water SA**, v. 30, n. 2, p. 175-182, 2004.

MORENTE, E. O.; FUENTES, M. A. F.; BURGOS, M. J. G.; ABRIOUEL, H.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 162, p. 13-25, 2013.

MORTON, L. H. G.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & biodegradation**, v.41, p. 247-259, 1998.

MOTA, A. N. B. Complicações relacionadas ao uso de cateter venoso central semi-implantável não tunelizado em pacientes com afecções cardiopulmonares. 2015, 115 f. (Dissertação para programa de pós graduação em enfermagem), Universidade de São Paulo.

O'NEAL, J.; GUILLEMOT, G. Online monitoring of biofilm in cooling tower systems. **The analyst technology supplement**, p. 36-42, 2010.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular microbiology**, v.28, n.3, p. 449-461, 1998.

OLIVEIRA, A. C. D. G. Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel. 2012, 130f. (Dissertação do Programa de Pós graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento), Universidade Estadual de Londrina.

OLIVEIRA, E. S. D. Biocorrosão em cupons de aço carbono expostos à água doce. 2013, 86f. (Dissertação para obtenção do título de mestre em biotecnologia industrial), Universidade federal de Pernambuco.

ÖZÜÖLMEZ, D.; ÇOTUK, A. Biofilm formation on galvanized steel by SRB isolate obtained from cooling tower water. **Journal of biology**, v. 70, n. 2, p. 35-42, 2011.

PAGNIER, I.; MERCHAT, M.; SCOLA, B. Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms In cooling towers and their control. **Future microbial**, v. 4(5), p. 615-629, 2009.

PAVANELLO, G.; FAIMALI, M.; PITTORE, M.; MOLLICA, A.; MOLLICA, A.; MOLLICA, A. Exploitation of a new electrochemical sensor for biofilm monitoring and water treatment optimization. **Water research**, v. 45, p. 1651-1658, 2011.

PEDERSEN, K. Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. **Wat. Res.**, v. 24, n.2, p. 239-243, 1990.

PEIXOTO, J. B. Prospecção de microrganismos com potencial para biodegradação de polietileno. 2013, 123f. (Dissertação para programa de pós graduação em biologia molecular), Universidade de Brasília.

PENNA, M. O.; BAPTISTA, W.; BRITO, R. F.; SILVA, E. D.; NASCIMENTO, J. R.; COUTINHO, C. M. L. M. Sistema dinâmico para avaliação de técnicas de monitoração e controle da CIM. **Bol, téc. PETROBRAS**, v. 45, p. 26-33, 2002.

PEREIRA, M. O.; MORIN, P.; VIEIRA, M. J.; MELO, L. F. A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions. **Letters in applied microbiology**, v. 34, p. 22-26, 2002.

PEREIRA, M. P. B. O. Comparação da eficácia de dois biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em sistemas de biofilme. 2001, 234f. (Dissertação para obtenção de grau de doutor em engenharia química e biológica), Universidade do Minho.

PERES, B. M. Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto. 2011, 105f. (Dissertação para o programa de pós-graduação em microbiologia), Universidade de São Paulo.

PERES, F. A. S.; TEIXEIRA, L. A. C.; YOKOYAMA, L.; CAMPOS, J. C.; MIGUEL, M. A. L. Tratamento de águas de refrigeração com peróxido de hidrogênio. **Química nova**, vol. 31, n. 7, p. 1851-1855, 2008.

RAMESH, S.; RAJESWARI, S.; MARUTHAMUTHU, S. Effect of inhibitors and biocide on corrosion control of mild steel in natural aqueous environment. **Materials Letters**, v. 57, p. 4547-4554, 2003.

RAO, T. S.; SAIRAM, T. N.; VISWANATHAN, B.; NAIR, K. V. K. Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulfate reducing bacteria in a fresh water cooling system. **Corrosion science**, v. 42, p. 1417-1431, 2000.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B.; Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bull**, v.36, n.5, p. 347-355, 2011.

SAARIVIRTA, E. H.; HONKANEN, M.; LEPISTÖ, T.; KUOKKALA, V. -T.; KOIVISTO, L.; BERG, C. -G. Microbiologically influenced corrosion (MIC) in stainless steel heat exchanger. **Applied surface science**, v. 258, p. 6512-6526, 2012.

SANTOS, C. M. F. Obtenção de fertilizantes fosfatados de alta solubilidade a partir de calcinado de osso bovino. 2012, 86f. (Dissertação de mestrado para programa de pós-graduação em engenharia metalúrgica e de minas), Universidade Federal de Minas Gerais.

SELBY, K.; LICINA, G. **Closed cooling water chemistry guideline**. Palo Alto, CA. 2013

SENEVIRATNE, M. Cooling water systems. In: **A practical approach to water conservation for commercial**. Marrickville, N.S.W.: Elsevier Science Australia, p. 83-116, 2007.

SHROUT, J. D.; NERENBERG, R. Monitoring bacterial twitter: Does Quorum Sensing Determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 1995-2005, 2012.

SILLANKORVA, S. M. Utilização de bacteriófagos no controlo de células suspensas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. 2004, 125f. (Dissertação apresentada para mestrado em tecnologia do ambiente), Universidade do Minho.

SILVA, V. N. **Biocidas alternativos em sistemas de resfriamento industrial**. 2013, 78 f. (mestrado em engenharia ambiental) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Drinking water biofilm monitoring by PropellaTM and flow cell bioreactors under different operating conditions. Biological Engineering Conference – Chempor 2008.

STAROSVETSKY, D.; ARMON, R.; YAHALOM, J.; STAROSVETSKY, J. Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 47, p. 79-87, 2001.

STAROSVETSKY, J.; STAROSVETSKY, D.; ARMON, R. Identification of microbiologically influenced corrosion (MIC) in industrial equipment failures. **Engineering Failure analysis**, v. 14, p. 1500-1511, 2007.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature reviews microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.

SUHET, M. I.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L. A. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobiano por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **ARS Veterinária**, v.27, n.1, Jaboticabal, SP, 2011.

SUNGUR, E. I.; ÇOTUK, A. Microbial corrosion of galvanized steel in a simulated recirculating cooling tower system. **Corrosion science**, v. 52, p. 161-171, 2010.

SUNGUR, E. I.; TÜRETGEN, I.; JAVAHERDASHTI, R.; ÇOTUK, A. Monitoring and disinfection of biofilm-associated sulfate reducing bacteria on different substrata in a simulated recirculating cooling tower system. **Turk J boil**, v. 34, p. 389-397, 2010.

TAHMOURESPOUR, A.; SALEHI, R.; KERMANS SHAHI, R. K. *Lactobacillus acidophilus* – derived biosurfactant effect on *GTFB* and *GTFC* expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. **Brazilian Journal of microbiology**, v.42, p. 330-339, 2011.

TAKAGI, E. H. Caracterização molecular e fenotípica de amostras bacterianas pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*. 2011, 132f. (Tese para obtenção do grau de doutor), Universidade de São Paulo.

TANGI, Y.; NISHIHARA, T.; MIYANAGA, K. Monitoring of biofilm in cooling water system by measuring lactic acid consumption rate. **Biochemical Engineering journal**, v. 35, p. 81-86, 2007.

TAO, Y.; ZHOU, Y.; XIAOHONG, H.; XIAOHONG, H.; DAPING, L. *Pseudomonas chengduensis* sp. Nov., isolated from landfill leachate. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 95-100, 2014.

TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. **Microbial ecology**, vol. 40, p.75-84, 2000.

TROVATI, J. **Tratamento de água de resfriamento**. Araraquara –SP, setembro de 2004. 89p.

TÜRETGEN, I. Comparison of the efficacy of free residual chlorine and monochloramine against biofilms in model and full scale cooling towers. **Biofouling**, v. 20, n. 2, p. 81-85, 2004.

TÜRETGEN, I.; COTUK, A; Monitoring of biofilm-associated *Legionella pneumophila* on different substrata in model cooling tower system. **Environ monit assess**, v. 125, p. 271-279, 2007.

TÜRETGEN, I.; YÜRÜDÜ, N. Ö, Ş.; NORDEN, I. Biofilm formation comparison of the SANIPACKING® cooling tower fill material against standard polypropylene fill material in a recirculating model water system. **Turk J boil**, v. 36, p. 313-318, 2012.

VEIGA, A. A. Estudo do efeito biocida do cloro e do peróxido de hidrogênio em sistemas de resfriamento com reuso de efluente como água de reposição. 2010, 286 f., (doutorado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VEIGA, A. A.; CAMPOS, J. C.; YOKOYAMA, L.; TEIXEIRA, L. A. C.; SANTIAGO, V. M. J. A minimização da cloração no reuso de efluentes em torres de resfriamento. **Revista de ciência & tecnologia**, vol. 10, n.1, p.54-68, 2010.

VIANA, M. G. Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico. 2009, 90f. (Dissertação de Mestrado para programa de pós graduação em ciência e engenharia de petróleo), Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & biodegration**, v. 49, p. 259-270, 2002.

WANG, J.; LIU, M.; XIAO, H.; WU, W.; XIE, M.; SUN, M.; ZHU, C.; LI, P. Bacterial community structure in cooling water and biofilm in a industrial recirculating cooling water system. **Water Science & Technology**. 2013

ZACHEUS, O. M.; IIVANAINEN, E. K.; NISSINEN, T. K.; LEHTOLA, M. J.; MARTIKAINEN, P. J. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Wat. Res.** v. 34, N. 1, p. 63-70, 2000.

ZHANG, X.; PEHKONEN, S. O.; KOCHERGINSKY, N.; ELLIS, G. A. Copper corrosion in mildly alkaline water with the disinfectant monochloramine. **Corrosion Science**, v. 44, p. 2507-2528, 2002.

APÊNDICE (A): DESCRIÇÃO DE MORFOESPÉCIES ISOLADAS

Data de Análise	Código	Corpo de prova Lâmina, água cupom, biocupom	Cor	Isolados Torre 4													
				Brilho		Borda		Superfície		Elevação		Centro		Consistência			
				Opaca	Brilhante	Irregular	Regular	Lisa	Rugosa	Côncavo	Convexo	Plana	Claro	Escuro	Cremosa	Seca	Mucoides
17/03/2015	4B1	Cupom	Branca		X		X	X			X				X		
23/03/2015	4B2	Cupom	Transparente e marrom		X	X		X				X		X	X		
17/03/2015	4B3	Cupom	Branca	X		X			X		X						X
17/03/2015	4B4	Cupom	Branca		X		X	X				X					X
17/03/2015	4B5	Cupom	Transparente e amarela		X	X		X		X				X	X		
23/03/2015	4B6	Cupom	Transparente e amarela		X		X		X	X				X	X		
23/03/2015	4B7	Cupom	Branca transparente		X	X			X			X		X	X		
17/03/2015	4B8	Cupom	Branca		X		X	X		X				X	X		
17/03/2015	4B9	Cupom	Transparente		X	X			X			X			X		
17/03/2015	4B10	Cupom	Amarela		X		X	X		X					X		
17/03/2015	4B11	Cupom	Branca		X	X		X				X			X		
23/03/2015	4B12	Cupom	Transparente		X	X			X			X			X		
17/03/2015	4B13	Cupom	Branca	X		X			X			X			X		
17/03/2015	4B14	Cupom	Branca		X		X	X				X				X	
17/03/2015	4B15	Lâmina	Amarela		X		X	X		X					X		
17/03/2015	4B16	Lâmina	Branca		X		X	X		X					X		
23/03/2015	4B17	Lâmina	Branca		X		X	X			X				X		
17/03/2015	4B18	Lâmina	Transparente		X	X			X			X			X		
23/03/2015	4B19	Lâmina	Transparente		X	X		X				X		X	X		
23/03/2015	4B20	Biocupom	Amarelo Claro		X	X			X		X			X			X
17/03/2015	4B21	Biocupom	Transparente		X	X			X			X	X			X	
23/03/2015	4B22	Biocupom	Transparente		X	X			X			X		X		X	
17/03/2015	4B23	Biocupom	Amarelo Claro		X	X			X	X				X			X
23/03/2015	4B24	Lâmina	Branca		X	X		X		X					X		
23/03/2015	4B25	Lâmina	Branca	X		X			X			X			X		
17/03/2015	4B26	Lâmina	Branca		X	X			X			X			X		
23/03/2015	4B27	Lâmina	Transparente		X		X	X		X				X	X		
23/03/2015	4B28	Cupom	Transparente		X		X	X		X					X		
23/03/2015	4B29	Cupom	Transparente		X	X		X		X					X		
23/03/2015	4B30	Cupom	Branca		X	X		X		X					X		X
23/03/2015	4B31	Cupom	Transparente		X	X			X			X			X		
23/03/2015	4B32	Lâmina	Transparente		X		X	X		X					X		
23/03/2015	4B33	Lâmina	Transparente		X	X		X		X					X		
23/03/2015	4B34	Lâmina	Amarela		X		X	X		X					X		
17/03/2015	4P1	Água	Transparente com o centro amarelo	X (borda)	X (centro)	X		X (centro)	X (borda)			X		X			X
23/03/2015	4P2	Água	Transparente	X		X			X			X		X		X	
23/03/2015	4P3	Água	Amarelo Claro	X		X			X		X			X		X	
17/03/2015	4P4	Água	Transparente	X (borda)	X (centro)	X		X (centro)	X (borda)			X	X			X	
23/03/2015	4P5	Água	Branco		X		X			X				X			X
17/03/2015	4P7	Água	Transparente		X		X		X		X			X			X
17/03/2015	4P8	Água	Transparente		X	X		X (borda interna)	X (borda externa)	X				X			X
23/03/2015	4P9	Água	Transparente		X	X			X		X			X			X