

THIAGO RANZANI DA COSTA

**ESTUDOS DE BIOFILMES MICROBIANOS EM
MEMBRANAS DE OSMOSE REVERSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

THIAGO RANZANI DA COSTA

**Estudos de Biofilmes Microbianos em Membranas de
Osmose Reversa**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

Versão Original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Costa, Thiago Ranzani da.

Estudos de biofilmes microbianos em membranas de osmose reversa / Thiago Ranzani da Costa. -- São Paulo, 2016.

Orientador: René Peter Schneider.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biofilmes.

Versão do título para o inglês: Biofilms microbial studies in reverse osmosis membranes.

1. Biofouling 2. Osmose reversa 3. Autópsia de membranas 4. Limpeza química de membranas I. René Peter Schneider II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0103/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thiago Ranzani da Costa.

Título da Tese: Estudos de biofilmes microbianos em membranas de osmose reversa.

Orientador(a): René Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

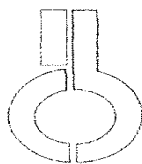
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : 11 - 3091.7733 - telefax : 11 3091.8408
e-mail:

CEP - ICB/USP

RECEBIDO: 15/12/11

Ass:

São Paulo, 15 de Dezembro de 2011

Ilmo. Srs.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Prof. Dr. Paulo Marinho de Andrade Zanotto

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP SH

Rei.: Solicitação de Certificado de Isenção

Prezados Professores,

Vimos por meio deste solicitar **Certificado de Isenção das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICB/USP) e Comissão de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos (CEPSH-ICB/USP)**, visto que o projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS DE LIMPEZA QUÍMICA EM MEMBRANAS DE OSMOSE REVERSA" sob a responsabilidade do aluno Thiago Ranzani da Costa e orientação do Prof. Dr. René Peter Schneider do Departamento de Microbiologia, não fará coleta nem uso de amostras biológicas e/ou células primárias provenientes de seres humanos bem como não utilizará seres humanos como veículo ou hospedeiro para coleta e manutenção de insetos ou organismos invertebrados.

Declaro ainda que os animais utilizados no referido projeto não estão sob a égide da Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Por fim, informo que o projeto (X) não utilizará células imortalizadas/() utilizara células imortalizadas (caso afirmativo, preencha os dados abaixo).

Linhagem celular () / () / () / () /

Origem:

(A) animal

(H) humana

Atenciosamente,

Aluno (a): Thiago Ranzani da Costa

Orientador (a): Prof. Dr. René Peter Schneider

A minha família,

Ao meu pai Arnaldo, minha mãe Helouisa, minha avó Aparecida, minha esposa Ana Paula, minhas filhas Giovanna e Marcella e meus irmãos Daniel e Andrea que pavimentaram e nortearam a estrada que percorri; acompanharam a minha história e, por isso, compreendem melhor que os outros o significado disso.

DEDICO

Aos meus avós maternos Cleibe e Leida e avô paterno João, todos *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

A sociedade pelo investimento despendido.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica (PQI/USP) pela estrutura fornecida.

Ao Prof. Dr. René Peter Schneider pela orientação e oportunidade de trabalhar com um tema tão interessante.

Aos funcionários do ICB e PQI/USP pela amizade e apoio técnico.

À Fernando Freitas de Oliveira, Thiago Schneider de Vilhena, Georges Mikhael Nammoura Neto, Bianca de Miranda, Milton Virgulino e Júlia Ortiz que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários da USP.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Microbiologia do ICB/USP.

Aos discentes do programa de pós-graduação em Microbiologia do ICB/USP.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

DA COSTA, T. R. **Estudos de Biofilmes Microbianos em Membranas de Osmose Reversa** 2016. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Sistemas de membranas filtrantes, principalmente os de osmose reversa, estão sendo cada vez mais utilizados em diversos seguimentos de empresas (farmacêutica, tratamento de água, alimentícia e química), devido à diminuição do preço dos elementos filtrantes e da alta qualidade do produto obtido. O *biofouling* corresponde a um tipo de *fouling* inevitável, caracterizado pelo crescimento de microrganismos na superfície das membranas e liberação de EPS pelos mesmos; por isso, um melhor conhecimento sobre estas estruturas é necessário. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o *biofouling* em diferentes membranas de osmose reversa colmatadas de diferentes indústrias pela técnica da autópsia e comparar com resultados obtidos com biofilmes de cultura pura formados em membranas de osmose reversa; além de verificar a influência de biofilmes na deposição de sais e ação de compostos químicos utilizados na limpeza química de membranas nos mesmos. A autópsia dos elementos colmatados mostrou uma grande quantidade de células viáveis porém, com concentrações de carboidratos muito baixas; diferentemente do que ocorreu quando biofilmes de cultura pura isolados destas membranas foram analisados, apresentando correlações fortes entre quantidade de células viáveis e macromoléculas como proteínas e, principalmente, carboidratos. Com relação à influência dos biofilmes na deposição de sais, dois dos quatro biofilmes de cultura pura apresentaram incorporação de bário em sua estrutura (revelado por análises de fluorescência de raios X), esta incorporação, provavelmente, ocorreu por troca iônica e não pela deposição de sulfato de bário. Compostos como hidróxido de sódio (pH = 12) e ácido clorídrico (pH = 2) apresentaram bons resultados na diminuição de células viáveis porém, a recuperação dos microrganismos foi menor com a utilização do ácido. Os compostos EDTA e SDS não foram eficazes na diminuição de viáveis.

Palavras-chave: *Biofouling*. Osmose Reversa. Autópsia de Membranas. Limpeza Química de Membranas.

ABSTRACT

DA COSTA, T. R. . **Biofilms Microbial studies in Reverse Osmosis Membranes**. 2016. 161 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Systems of filter membranes, especially reverse osmosis, are being increasingly used in various segments of companies (pharmaceutical, water treatment, food and chemical industries) due to the decrease in the price of the filter elements and high quality of the product. The biofouling corresponds to a type of inevitable fouling characterized by growth of microorganisms on the surface of the membrane and release of EPS by them; so a better understanding of these structures is necessary. This study aimed to characterize the biofouling in different reverse osmosis membranes addressed from different industries by the technique of autopsy and compared with results obtained with pure culture biofilms in reverse osmosis membranes; and to verify the influence of biofilms in the deposition of salts and action of chemical compounds used in chemical cleaning of membranes in them. The autopsy of clogged elements showed a lot of viable cells but with very low carbohydrate concentrations; unlike what occurred when biofilms isolated pure culture of these membranes were analyzed, showing strong correlation between number of viable cells and macromolecules such as proteins and especially carbohydrates. Regarding the influence of biofilms in the deposition of salts, two of the four pure culture biofilms showed barium incorporation in its structure (revealed by fluorescence analysis X-ray), this merger probably occurred by ion exchange and not by deposition barium sulfate. Compounds such as sodium hydroxide (pH = 12) and hydrochloric acid (pH = 2) showed good results in the decrease of viable cells however, the recovery of microorganisms was lower with use of the acid. EDTA and SDS compounds were not effective in reducing viable.

Keywords: *Biofouling*. Reverse osmosis. Membrane Autopsy. Membranes cleaning chemicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Geração de duas correntes a partir da água de alimentação.	23
Figura 2 - Representação de uma folha de membrana assimétrica de osmose reversa. A membrana em si representa apenas 1% da espessura do suporte poroso.	25
Figura 3 - Módulo de membrana em espiral. Fonte: Adaptado de Wagner (2001).	26
Figura 4 - Elemento aberto de osmose reversa mostrando um envelope de membrana. As setas vermelhas indicam os vértices que foram colados e a seta preta, indica o vértice que não foi colado e está em conexão com o canal de permeado.	27
Figura 5 - Elemento de osmose reversa fechado (A) e após abertura do elemento em (B). A coloração escura dos envelopes de membrana se deve ao acúmulo de depósitos em suas superfícies (fouling). O espaçador de alimentação (C) localiza-se entre os envelopes de membrana gerando turbulência e mistura. O espaçador de permeado (D) é uma tela muito fina que se localiza dentro de cada envelope de membrana.	27
Figura 6 - Esquema do fluxo de água da alimentação, do permeado e do concentrado em um envelope de membrana. O fluxo de água de alimentação dentro de um elemento é tangencial à membrana. O permeado se difunde pela membrana e escoar dentro do envelope para o coletor de permeado (setas escuras).	28
Figura 7 - Unidades básicas que integram um sistema de osmose reversa.	29
Figura 8 - Diferentes arranjos de sistemas de osmose reversa: (a) arranjo em série, (b) arranjo em paralelo, (c) arranjo cônico e (d) arranjo cônico com bombas entre os estágios.....	30
Figura 9 - Perfil da concentração de sais dissolvidos e sólidos suspensos da água de alimentação (CF) para a superfície da membrana (CM).	31
Figura 10 - Adição de padrão em 5 amostras de membranas de osmose reversa. Curva padrão (A) e amostras fortificadas 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) e 5 (F).	43
Figura 11 - Adição de padrão em 5 amostras de membranas de osmose reversa para quantificação de ferro. Curva padrão (A) e amostras fortificadas 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) e 5 (F).....	45
Figura 12 - Representação de um esquema do prolongamento da curva de fortificação de uma amostra qualquer para $y=0$. O valor de ΔX representa o valor real da concentração de ferro na amostra.	46
Figura 13 - Revestimento externo de fibra de vidro de um elemento de osmose reversa colmatado.....	51

Figura 14 - Pacotes de membranas desenrolados (A e B). Espaçadores de alimentação sem depósito (C) e com depósito (D). Acesso aos espaçadores de permeado após corte da membrana (E e F).	52
Figura 15 - Distribuição homogênea do fouling em 9 diferentes amostras de membranas.	56
Figura 16 - Micrografias de uma amostra de membrana antes (A) e após a trituração (B).	57
Figura 17 - Aspecto do fouling nas amostras analisadas. O círculo em vermelho na figura 17B indica a presença de biofilmes imersos em EPS.	57
Figura 18 - Proporção de material orgânico e inorgânico (A) e peso seco (B) de 37 elementos de osmose reversa colmatados de plantas em operação e análise de FRX (C).	59
Figura 19 - Contagem de células viáveis (UFC/cm ²) na camada de fouling das membranas...	60
Figura 20 - Proporção de proteínas e carboidratos em relação ao peso seco das camadas de fouling das membranas.	61
Figura 21 - Relação entre proteínas e log de bactérias viáveis nos depósitos onde a quantidade de proteína excedeu 10% do peso seco (A), entre carboidratos e células viáveis nos elementos onde os carboidratos excederam 10 % do peso seco (B) e entre matéria orgânica e células viáveis nos depósitos (C).	62
Figura 22 - 1 – Adesão inicial a uma superfície com filme condicionante; 2 – adesão irreversível;3e.....	68
Figura 23 - Elemento de osmose reversa novo (A) utilizado para obtenção de amostras (B). .	71
Figura 24 - Duas células de fluxo montadas com amostras de membranas limpas dentro.	71
Figura 25 - Sistema montado para o crescimento de biofilme de cultura pura (1). Reservatório (A), bombas peristálticas (B), células de fluxo (C). Vedação do reservatório para evitar contaminação (2).	72
Figura 26 - Formação de grande quantidade de biofilme em todas as culturas circuladas no sistema (elipses pretas).	75
Figura 27 - Crescimento de <i>Bacillus anthracis</i> nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).	77
Figura 28 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilmes de <i>Bacillus anthracis</i>	78
Figura 29 - Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).	80

Figura 30 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilme de <i>Bacillus cereus</i>	81
Figura 31 - Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).	83
Figura 32 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilme de <i>Bacillus thuringiensis</i>	84
Figura 33 - Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).	86
Figura 34 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
Figura 35 - Elemento de osmose reversa novo (A) utilizado para obtenção de amostras (B).	97
Figura 36 - Duas células de fluxo montadas com amostras de membranas limpas dentro.	97
Figura 37 - Sistema montado. (A) Reservatório, (B) Bombas peristálticas e (C) Placas de acrílico contendo amostras de membranas em série. As setas em preto mostram o percurso do fluido no sistema após o funcionamento.	98
Figura 38 - Micrografias eletrônicas das amostras de membranas limpas (A e B), e após 15 dias em contato com a água da raia olímpica da USP (C, D e E). Presença de algas (setas vermelhas em C), bactérias (setas verdes em D e E) e grande quantidade de material amorfo.....	100
Figura 39 - Micrografias eletrônicas mostrando os biofilmes de cultura pura formados nas amostras. Biofilmes formados pelas culturas: <i>Bacillus anthracis</i> (A e B), <i>Bacillus cereus</i> (C e D), <i>Bacillus thuringiensis</i> (E e F) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G e H).....	101
Figura 40 - Mapa EDS de alguns elementos químicos presentes nas amostras de biofilmes complexos sobre as amostras de membrana após circulação da solução de BaSO ₄ . Os aglomerados (círculos verdes no elemento bário por exemplo) indicam a presença dos elementos. Os pontos sem aglomeração representam ruído (círculos azuis).....	104
Figura 41 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (<i>Bacillus anthracis</i>) sobre as amostras de membrana. Os aglomerados (círculos vermelhos) indicam a presença do elemento bário nas amostras.	105

Figura 42 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (<i>Bacillus cereus</i>) sobre as amostras de membrana. Os aglomerados (círculos verdes) indicam a presença de elemento bário.....	107
Figura 43 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (<i>Bacillus thuringiensis</i>) sobre as amostras de membrana. Ausência de aglomerados para o elemento bário. Os pontos sem aglomeração indicam apenas ruído do equipamento.	109
Figura 44 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) sobre as amostras de membrana. Ausência de aglomerados para o elemento bário.	110
Figura 45 - Amostras de membranas de osmose reversa durante o procedimento de limpeza química de bancada.	121
Figura 46 - Elemento de osmose reversa novo (A) utilizado para obtenção de amostras (B).	122
Figura 47 - Duas células de fluxo montadas com amostras de membranas limpas dentro.	122
Figura 48 - Sistema montado na raia olímpica da USP para o crescimento de biofilmes.....	123
Figura 49 - Limpeza química das amostras de membranas utilizando solução de ácido clorídrico em pH 2. As figuras das amostras após a utilização da solução ácida referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.....	129
Figura 50 - Limpeza química das amostras de membrana utilizando solução de hidróxido de sódio em pH 12. As figuras das amostras após a utilização da solução alcalina referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos (imagens de cima para baixo).	130
Figura 51 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de ácido clorídrico em pH 2 e, posteriormente, uma solução de hidróxido de sódio em pH 12. As figuras das amostras após a utilização das soluções de limpeza referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.....	132
Figura 52 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de hidróxido de sódio em pH 12 e, posteriormente, uma solução de ácido clorídrico em pH 2. As figuras das amostras após a utilização das soluções de limpeza referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.....	133
Figura 53 - Limpeza química de membrana utilizando solução de EDTA. As figuras das amostras após a utilização da solução de EDTA referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.....	135
Figura 54 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de EDTA e, posteriormente, uma solução de ácido clorídrico em pH 2. As figuras das amostras após a	

utilização da solução de EDTA e HCl referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.	136
Figura 55 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de EDTA e, posteriormente, uma solução de hidróxido de sódio em pH 12. As figuras das amostras após a utilização da solução de EDTA e NaOH referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.	137
Figura 56 - Limpeza química de membrana utilizando uma solução de SDS 10 mM. As figuras das amostras após limpeza referem-se a tempos de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos de contato com a solução de SDS.	139
Figura 57 - Limpeza química de membrana utilizando uma solução de SDS e uma solução de ácido clorídrico com pH = 2. As figuras das amostras após limpeza referem-se a tempos de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos de contato com a solução de SDS e HCl.	140
Figura 58 - Limpeza química de membrana utilizando uma solução de SDS e uma solução de hidróxido de sódio pH = 12. As figuras das amostras após a lavagem são referentes aos tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.	141
Figura 59 - Micrografias eletrônicas de varredura das amostras do elemento 1 com 65 X de aumento após diferentes soluções empregadas na remoção do <i>fouling</i> das amostras.	143
Figura 60 - Micrografias eletrônicas das amostras do elemento 1 com aumento de 15000 X.	144
Figura 61 - Micrografias das amostras do elemento 2 com aumento de 65 X.	146
Figura 62 - Micrografia das amostras do elemento 2 após limpeza. Aumento de 15000 X. ..	147
Figura 63 - Micrografias das amostras do elemento 3 após lavagem com diferentes soluções. Aumento de 15000 X.	149
Figura 64 - Micrografias eletrônicas mostrando biofilmes formados sobre as superfícies das amostras de membrana.	151
Figura 65 - Contagem de células viáveis nas amostras de membranas durante o procedimento de limpeza e recuperação bacteriana.	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos e características de fouling e consequências destes em sistemas de osmose reversa.....	34
Tabela 2 - Comparação das concentrações de ferro nas amostras utilizando as absorvâncias	47
Tabela 3 - Procedência de cada elemento colmatado enviado para análise.	53
Tabela 4 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (<i>Bacillus anthracis</i>) em diferentes períodos	76
Tabela 5 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (<i>Bacillus cereus</i>) em diferentes período.	79
Tabela 6 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (<i>Bacillus thuringiensis</i>) em diferentes períodos.	82
Tabela 7 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (<i>Bacillus thuringiensis</i>) em diferentes períodos.	85
Tabela 8 - Quantificação elementar de amostras de membrana sem biofilmes após 15 dias em contato com solução contendo 2 mg/L de BaSO ₄	102
Tabela 9 - Quantificação elementar de amostras de membrana com biofilmes complexos aderidos.	103
Tabela 10 - Quantificação elementar das amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (<i>Bacillus anthracis</i>) aderidos.	105
Tabela 11 - Quantificação elementar de amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (<i>Bacillus cereus</i>) aderidos.	106
Tabela 12 - Quantificação elementar de amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (<i>Bacillus cereus</i>) aderidos.	108
Tabela 13 - Quantificação elementar das amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) aderidos.	110
Tabela 14 - Caracterização do fouling nas amostras de membranas.	126
Tabela 15 - Análise semi-quantitativa, valores expressos em % de óxidos, normalizados a 100%.	126

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	MEMBRANAS FILTRANTES	21
1.2	OSMOSE REVERSA	22
1.2.1	Osmose Reversa: Utilização e Vantagens	23
1.2.2	Elementos de Membrana de Osmose Reversa de Configuração Espiral	24
1.3	CONCENTRAÇÃO POLARIZAÇÃO	30
1.4	FOULING DE MEMBRANAS	32
2	OBJETIVO DA TESE	35
	REFERÊNCIAS	36
3.1	CAPÍTULO 1: UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS TRADICIONAIS NA ANÁLISE DE FOULING	39
3.1.1	Introdução	39
3.1.2	Objetivos	39
3.1.3	Materiais e Métodos	40
3.1.3.1	Amostras de Membranas Analisadas	40
3.1.3.2	Quantificação de Cálcio e Magnésio	40
3.1.3.3	Quantificação de Sílica	40
3.1.3.4	Quantificação de Ferro Total	41
3.1.4	Resultados e Discussão	41
3.1.4.1	Quantificação de Magnésio	41
3.1.4.2	Quantificação de Cálcio	42
3.1.4.3	Quantificação de Sílica	42
3.1.4.4	Ferro Total em Amostras de Membranas	44
3.1.4.4.1	Quantificação de ferro total em amostras que apresentaram uma inclinação da reta de fortificação diferente da reta padrão	46
3.1.4.4.2	Comparação das concentrações de ferro nas amostras de membranas utilizando o método da adição de padrão e diretamente a curva padrão	46
3.1.5	Conclusão	47
	REFERÊNCIAS	48
4.2	CAPÍTULO 2: AUTÓPSIA DE ELEMENTOS DE OSMOSE REVERSA UTILIZADOS EM DIVERSOS SETORES INDUSTRIAIS	49
4.2.1	Introdução	49
4.2.2	Objetivo	53

4.2.3 Materiais e Métodos	53
<i>4.2.3.1 Elementos de Osmose Reversa Analisados</i>	53
<i>4.2.3.2 Coleta das Amostras de Membranas</i>	53
<i>4.2.3.3 Remoção dos Depósitos Sobre as Membranas</i>	54
<i>4.2.3.4 Peso Seco e Quantificação de Matéria Orgânica nas Amostras</i>	54
<i>4.2.3.5 Quantificação de Carboidratos e Proteínas nas Amostras</i>	54
<i>4.2.3.6 Contagem de Bactérias Viáveis</i>	54
<i>4.2.3.7 Análise das Amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	54
<i>4.2.3.8 Análise Elementar do Fouling das Membranas por Fluorescência de Raios X (XRF)</i>	55
4.2.4 Resultados e Discussão	55
<i>4.2.4.1 Elementos de membranas</i>	55
<i>4.2.4.2 Observação do Fouling nas Membranas</i>	56
<i>4.2.4.3 Caracterização do Fouling nos Trinta e Sete Elementos Analisados</i>	57
<i>4.2.4.3.1 Quantificação de Matéria Orgânica e Inorgânica nos Elementos</i>	58
<i>4.2.4.3.2 Biofouling de Membranas</i>	60
4.2.5 Conclusões	65
REFERÊNCIAS	66
5.3 CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE BIOFILMES DE CULTURA PURA ORIGINADOS DE BIOFOULING DE MEMBRANAS DE OSMOSE REVERSA COLMATADOS	68
5.3.1 Introdução	68
<i>5.3.1.1 Biofouling em Sistemas de Membranas</i>	68
5.3.2 Objetivos	71
5.3.3 Materiais e Métodos	71
<i>5.3.3.1 Amostras de Membranas</i>	71
<i>5.3.3.2 Sistema para Crescimento de Biofilme de Cultura Pura</i>	71
<i>5.3.3.3 Obtenção e Crescimento de Biofilmes de Cultura Pura nas Amostras</i>	72
<i>5.3.3.3.1 Isolamento de Bactérias</i>	72
<i>5.3.3.3.2 Extração e Precipitação de DNA Genômico</i>	73
<i>5.3.3.3.3 PCR com primer universal (Adaptado de RAJI et al. 2008)</i>	73

5.3.3.3.4 Sequenciamento das Amostras	74
5.3.3.4 Biofouling (Análises)	74
5.3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	75
5.3.4 Resultados e Discussão	75
5.3.4.1 Formação de Biofilmes nas Amostras de Membrana	75
5.3.4.1.1 Desprendimento de Biofilmes (Sloughing)	75
5.3.4.1.2 <i>Bacillus anthracis</i>	76
5.3.4.1.3 <i>Bacillus cereus</i>	78
5.3.4.1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	81
5.3.4.1.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
5.3.5 Conclusão	88
REFERÊNCIAS	90
6.4 CAPÍTULO 4: INFLUÊNCIA DE BIOFILMES NA DEPOSIÇÃO DE SAIS	
.....	93
6.4.1 Introdução	93
6.4.1.2 <i>Sulfato de Bário</i>	96
6.4.2 Objetivos.....	96
6.4.3 Materiais e Métodos	96
6.4.3.1 <i>Membranas Utilizadas no Experimento</i>	96
6.4.3.2 <i>Montagem do Sistema</i>	97
6.4.3.3 <i>Crescimento de Biofilmes Complexos nas Amostras</i>	98
6.4.3.4 <i>Crescimento de Biofilmes de Cultura Pura nas Amostras</i>	98
6.4.3.5 <i>Solução Salina</i>	98
6.4.3.6 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	99
6.4.3.7 <i>Análise Elementar (FRX)</i>	99
6.4.4 Resultados e Discussão	99
6.4.4.1 <i>Crescimento de Biofilmes Complexos nas Amostras</i>	99
6.4.4.2 <i>Crescimento de Biofilmes de Cultura Pura nas Amostras</i>	100
6.4.4.3 <i>Análise Elementar das Amostras</i>	102
6.4.4.3.1 <i>Amostras Limpas Após Circulação com Solução de BaSO₄ (2 mg/L)</i>	102
6.4.4.3.2 <i>Amostras com Biofilmes Complexos após Circulação com Solução de BaSO₄ (2 mg/L)</i>	102
6.4.4.3.3 <i>Amostras com Biofilmes de Cultura Pura após Circulação com Solução de BaSO₄ (2 mg/L)</i>	104

6.4.4.3.3.1 biofilme de cultura pura (<i>Bacillus anthracis</i>)	104
6.4.4.3.3.2 biofilme de cultura pura (<i>Bacillus cereus</i>)	106
6.4.4.3.3.3 biofilme de cultura pura (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	107
6.4.4.3.3.4 biofilme de cultura pura (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	109
6.4.5 Conclusão	111
REFERÊNCIAS	112
7.5 CAPÍTULO 5: LIMPEZA QUÍMICA E RECUPERAÇÃO BACTERIANA EM MEMBRANAS DE OSMOSE REVERSA	114
7.5.1 Introdução	114
7.5.1.1 Limpeza Química de Membranas	114
7.5.1.2 Agentes Químicos Utilizados	115
7.5.1.3 Frequencia de Limpeza	118
7.5.1.4 Duração e os Passos de uma Limpeza	118
7.5.1.5 Aspectos Físicos para Limpeza de Membranas	120
7.5.1.6 Efetividade da Limpeza Química	120
7.5.2 Objetivos	120
7.5.3 Materiais e Métodos	120
7.5.3.1 Limpeza Química em Membranas de Uso Industrial Colmatadas	120
7.5.3.1.1 Amostras de Membrana	120
7.5.3.1.2 Autópsia dos Elementos	121
7.5.3.1.3 Limpeza Química de Bancada (análise qualitativa)	121
7.5.3.1.4 Reagentes Utilizados na Limpeza Química	121
7.5.3.1.5 Procedimentos de Limpeza	121
7.5.3.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	122
7.5.3.2 Teste de Limpeza Química em Bactérias Contidas em Biofilmes	122
7.5.3.2.1 Amostras de Membranas	122
7.5.3.2.2 Sistema para Crescimento de Biofilme Complexo	123
7.5.3.2.3 Compostos Químicos Testados	123
7.5.3.2.4 Procedimento para Limpeza Química das Amostras	124
7.5.3.2.5 Procedimento para Teste de Limpeza e Recuperação Microbiana	124
7.5.3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	125

7.5.4 Resultados e Discussão	125
7.5.4.1 Limpeza Química em Membranas de Uso Industrial Colmatadas	125
7.5.4.1.1 <i>Caracterização do Fouling do Elemento Analisado</i>	125
7.5.4.1.2 <i>Teste de Limpeza Química</i>	128
7.5.4.1.2.1 limpeza ácida	128
7.5.4.1.2.2 limpeza alcalina	128
7.5.4.1.2.3 limpeza (ácido + base)	131
7.5.4.1.2.4 limpeza (base + ácido)	131
7.5.4.1.2.5 limpeza com EDTA	134
7.5.4.1.2.6 limpeza (EDTA + ácido).....	134
7.5.4.1.2.7 limpeza (EDTA + base)	134
7.5.4.1.2.8 limpeza com SDS	138
7.5.4.1.2.9 limpeza (SDS + ácido)	138
7.5.4.1.2.10 limpeza (SDS + base)	138
7.5.4.1.3 <i>Microscopia das Amostras após Limpeza</i>	142
7.5.4.1.3.1 elemento 1	142
7.5.4.1.3.2 elemento 2	145
7.5.4.1.3.3 elemento 3	148
7.5.4.2 Teste de Limpeza Química em Bactérias Contidas em Biofilmes	150
7.5.4.2.1 <i>Formação de Biofilmes nas Amostras de Membrana</i>	150
7.5.4.2.2 <i>Limpeza Química</i>	152
7.5.5 Conclusão	153
REFERÊNCIAS	154
ANEXOS	157

1 INTRODUÇÃO

1.1 MEMBRANAS FILTRANTES

O processo de filtração por membranas é um processo em que a membrana é usada como uma barreira física seletiva para separar compostos, aplicando-se uma força dirigida através da membrana. Em um sistema de membranas, a corrente de água da alimentação é separada em duas, o produto ou permeado, contendo solutos que passaram através da membrana, e o concentrado, contendo solutos e partículas rejeitadas pela mesma (MALLEVIALLE; ODENDAAL; WIESNER, 1996).

A história recente das membranas filtrantes começou 250 anos atrás com o clérigo francês Abbe Nollet, quando ele observou o transporte de água através da bexiga de porco que cobria um jarro contendo vinho (LONSDALE, 1982). Cem anos mais tarde, em 1867, Moritz Traube preparou a primeira membrana artificial (TRAUBE, 1867). Em 1950, Hassler introduziu o primeiro conceito de dessalinização por membranas (GLATER, 1998). No final de 1950, a base para a osmose reversa atual foi estabelecida por pesquisas com membranas de acetato de celulose feitas por Reid e Breton (1959) e Loeb e Sourirajan (1960,1963). Reid e Breton foram os primeiros a demonstrar que filmes de acetato de celulose poderiam produzir água potável a partir de soluções salinas. Loeb e Sourirajan (1963) inventaram as membranas assimétricas de acetato de celulose com alta rejeição de sais e bom fluxo de água, tornando prática a dessalinização por membranas. O primeiro elemento em espiral foi desenvolvido pela empresa General Atomics em 1963. Em 1970, membranas de filme fino, onde uma camada ultrafina separadora de poliamida foi depositada sobre um suporte de membrana de ultrafiltração foram desenvolvidas, proporcionando um maior fluxo de água, maior rejeição de sais e com pressão de alimentação bem inferior a de membranas de acetato de celulose (BODDEKER, 1995).

Sistemas de membranas podem ser classificados considerando os seguintes parâmetros: força motriz, mecanismo de separação e propriedades de rejeição. No caso de processos de membranas por pressão, a força motriz é a diferença de pressão através da membrana. Exemplos de processos de separação por membranas que utilizam a pressão como força motriz incluem: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa. Uma subclassificação, geralmente adotada na prática, classifica as membranas de microfiltração e ultrafiltração como processos de separação de baixa pressão, e membranas de nanofiltração e osmose reversa como processos de separação de alta pressão. Microfiltração separa partículas com tamanhos de 0,1 – 0,5 micrômetros e ultrafiltração separa partículas de 0,005 – 0,05 micrômetros. Membranas de nanofiltração são utilizadas para a retenção de íons bivalentes, compostos orgânicos e inorgânicos com peso molecular maior do que cerca de 200 D. Membranas de osmose reversa

retêm íons monovalentes (99% de retenção) e constituem as membranas clássicas de dessalinização. Osmose reversa e nanofiltração são processos de separação por membranas em que a membrana densa permite a difusão do solvente e do soluto. Sais, compostos de baixo peso molecular e partículas são rejeitados fisicamente ou por exclusão de carga na superfície da membrana, resultando na separação destes compostos da água (LI, 1990).

1.2 OSMOSE REVERSA

Osmose reversa é um processo que utiliza membranas semipermeáveis que rejeitam constituintes dissolvidos presentes na água de alimentação. Esta rejeição ocorre devido à exclusão por tamanho, exclusão por carga e interações físico-químicas entre soluto, solvente e membrana (RADJENOVIC et al., 2008). A eficiência do processo depende de parâmetros operacionais, propriedades da membrana e da água de alimentação. Os tipos de módulos mais comercializados são os com configuração em espiral e fibra oca; estes últimos, possuem uma maior área de membrana e uma maior produção de permeado, mas são mais propensos à formação de *fouling* (MALAEB e AYOUB, 2011).

A água de alimentação entra sob pressão nos elementos de membrana, gerando duas correntes: o permeado, que representa o fluxo de água que atravessou/permeou as membranas, representando a água purificada; e o concentrado, que representa o fluxo de água com materiais rejeitados pelas mesmas (Figura 1). Estas membranas possuem a capacidade de reter íons monovalentes e permitem a passagem de moléculas de água. Os materiais mais comuns utilizados na fabricação das membranas são: acetato de celulose, poliamidas e outros polímeros (GARUD et al., 2011). Osmose reversa é um processo baseado em tecnologias de membranas utilizadas para a dessalinização. A utilização destas membranas na dessalinização da água do mar e reuso de águas são consideradas soluções promissoras para aumentar a disponibilidade de água para consumo (LEE et al., 2010).

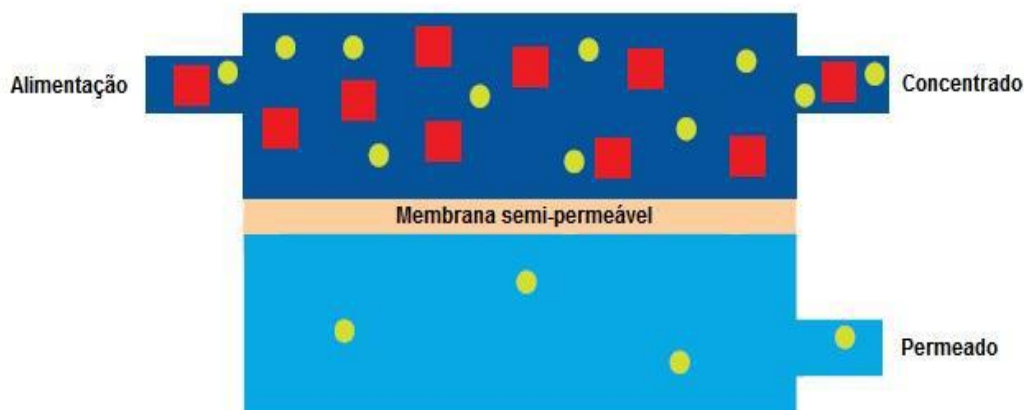


Figura 1 - Geração de duas correntes a partir da água de alimentação.
 Fonte: Adaptado de Vrouwenvelder (2009).

1.2.1 Osmose Reversa: Utilização e Vantagens

O processo de osmose reversa é utilizado nas mais diversas atividades como: no tratamento de águas residuárias municipais (remoção de sólidos dissolvidos), na remoção de orgânicos e poluentes orgânicos de águas residuárias, na separação e concentração (recuperação) de diversos solutos e no tratamento de efluentes de diversos setores industriais (químico, petroquímico, eletroquímico, alimentos, papéis) (SANTOYO et al., 2004).

Sistemas de osmose reversa também estão sendo utilizados para a remoção de matéria orgânica como: aditivos plásticos, pesticidas, compostos farmacêuticos, benzeno e tolueno. (XU et. al., 2005).

As principais vantagens na utilização desses sistemas são: facilidade de operação e manutenção, poluentes inorgânicos e orgânicos podem ser removidos simultaneamente, utilizam menos energia, quando comparados com outras tecnologias (3-9,4 Kwh/m³ de produto), normalmente operam na temperatura ambiente, reduzindo problemas de incrustação e corrosão, a estrutura modular deste processo aumenta a flexibilidade na construção das plantas, além da possibilidade do funcionamento em conjunto com outros processos (oxidação, adsorção, tratamentos biológicos e outros) para produzir, por exemplo, águas de reuso (GARUD et al., 2011).

1.2.2 Elementos de Membrana de Osmose Reversa de Configuração Espiral

1.2.2.1 Estrutura e Materiais para Fabricação de Membranas

Em princípio, qualquer material que permita a síntese de filmes com porosidade controlada pode ser utilizado para a fabricação de membranas. Na prática, entretanto, o mercado de saneamento básico é dominado por membranas fabricadas com polímeros orgânicos. O alto custo de fabricação ainda restringe o uso de membranas inorgânicas (cerâmicas de óxidos de zircônio, alumínio ou titânio, aço inoxidável) a nicho de mercado que envolve tratamento de soluções agressivas (pH muito baixo ou muito alto, soluções oxidantes), de altas temperaturas ou de alto valor agregado (SCHNEIDER; TSUTIYA,2001).

As membranas produzidas e utilizadas atualmente são as chamadas membranas de terceira geração ou membranas compostas. Estas membranas consistem em uma camada fina de polímero depositada em um ou mais suportes porosos (o polímero destes suportes porosos é quase sempre diferente do polímero da membrana). A figura 2 mostra um esquema deste tipo de membrana. A fina camada, que corresponde à membrana, determina o fluxo e as características de separação, os polímeros abaixo da membrana servem apenas como um suporte mecânico, não afetando as propriedades de transporte da mesma. O polímero que forma a membrana é extremamente fino (0,2 μm ou menos), permitindo um alto fluxo de água (BAKER, 1990).

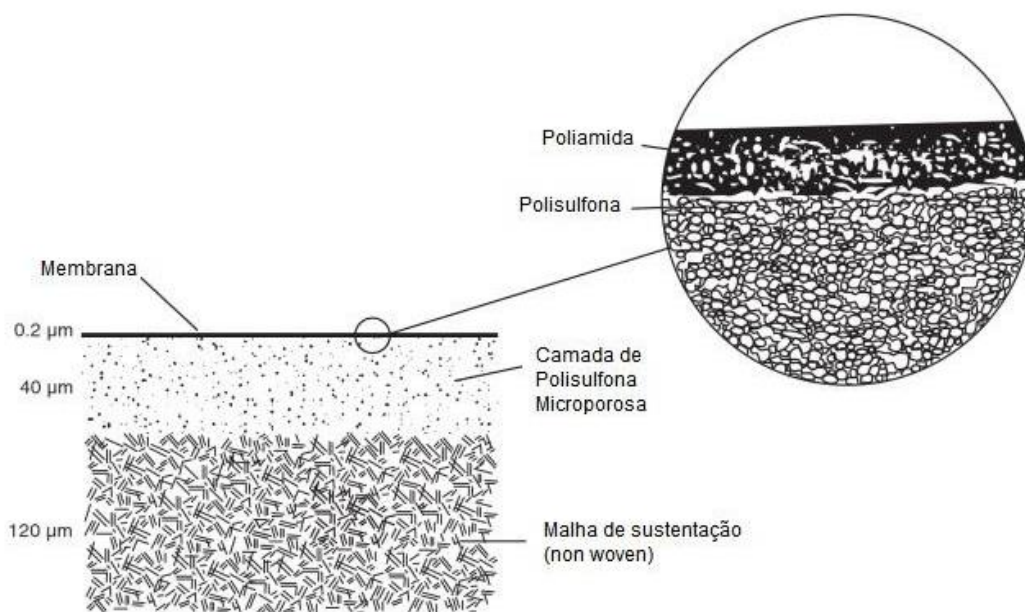


Figura 2 - Representação de uma folha de membrana assimétrica de osmose reversa. A membrana em si representa apenas 1% da espessura do suporte poroso.
Fonte: Adaptado de Bergman (2007).

Nos elementos de membrana de configuração espiral, folhas de membranas são enroladas em volta de um tubo perfurado denominado coletor de permeado (Figura 3). Para que este sistema seja funcional é necessário garantir a alimentação contínua com água sob pressões que podem atingir até 90 bar na dessalinização de água do mar, a remoção contínua do permeado e a separação dos canais de alimentação, onde circula água bruta, do canal de permeado, por onde escoam a água filtrada na pressão atmosférica.

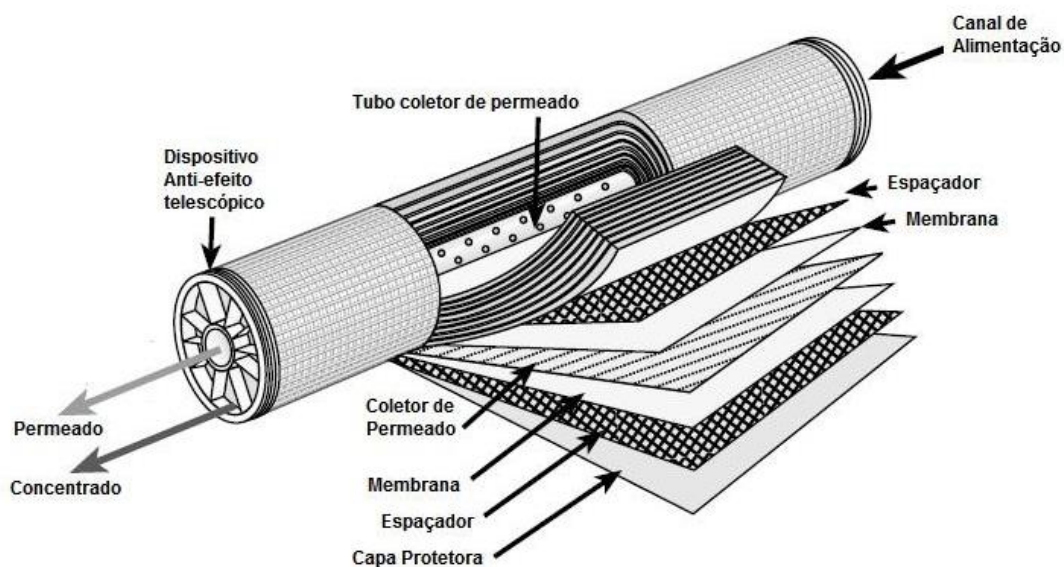


Figura 3 - Módulo de membrana em espiral. Fonte: Adaptado de Wagner (2001).

Para maximizar a quantidade área de membrana por volume, as folhas planas de membrana de osmose são acondicionadas em pacotes. Cada pacote consiste de duas folhas de membranas separadas por um espaçador de permeado, sendo que o verso da membrana fica em contato com o espaçador. Para garantir a estanqueidade do canal de permeado, as membranas são coladas nos três vértices formando um envelope; o vértice que não foi colado é conectado ao tubo coletor, de forma que o permeado possa escoar para o tubo (Figura 4). Um elemento de membrana contém um grande número destes envelopes, que são separados entre si pelo espaçador de alimentação. O espaçador de alimentação é uma tela bem mais aberta do que o espaçador de permeado, e tem como função, manter o canal de alimentação aberto no elemento e gerar turbulência e mistura, aumentando o transporte de massa próximo da superfície da membrana, removendo os compostos rejeitados pela mesma (Figura 5). O escoamento da água de alimentação, do permeado e do concentrado em um envelope de membrana é mostrado na figura 6.

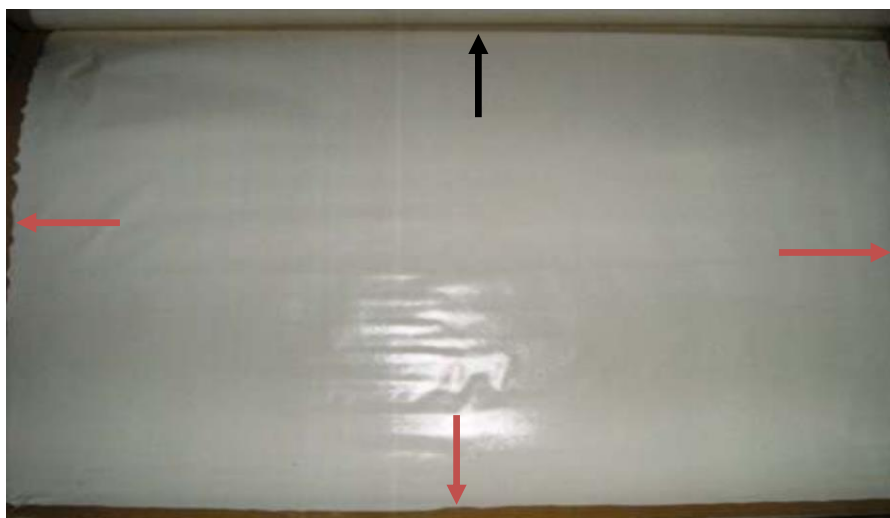


Figura 4 - Elemento aberto de osmose reversa mostrando um envelope de membrana. As setas vermelhas indicam os vértices que foram colados e a seta preta, indica o vértice que não foi colado e está em conexão com o canal de permeado.



Figura 5 - Elemento de osmose reversa fechado (A) e após abertura do elemento em (B). A coloração escura dos envelopes de membrana se deve ao acúmulo de depósitos em suas superfícies (fouling). O espaçador de alimentação (C) localiza-se entre os envelopes de membrana gerando turbulência e mistura. O espaçador de permeado (D) é uma tela muito fina que se localiza dentro de cada envelope de membrana.

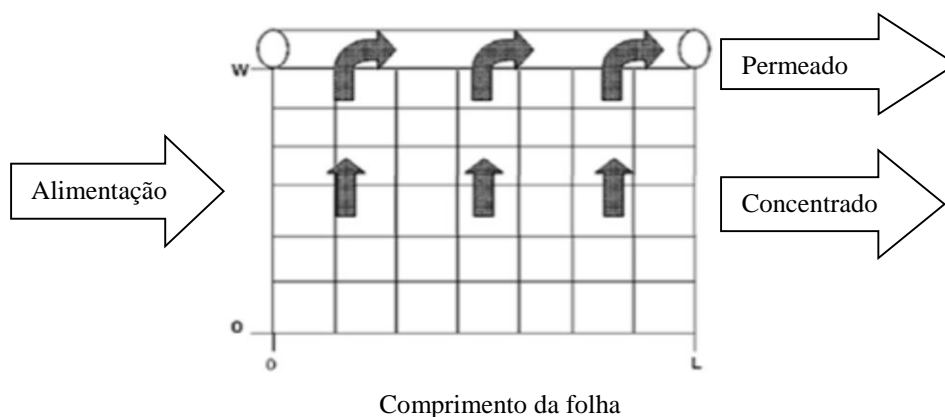


Figura 6 - Esquema do fluxo de água da alimentação, do permeado e do concentrado em um envelope de membrana. O fluxo de água de alimentação dentro de um elemento é tangencial à membrana. O permeado se difunde pela membrana e escoar dentro do envelope para o coletor de permeado (setas escuras).
Fonte: Schwinge et al., 2004.

1.2.2.2 Descrição de um Processo de Osmose Reversa

Plantas com elementos de membranas de osmose reversa na configuração espiral, frequentemente, utilizam vários estágios de processo. O número de elementos utilizados é uma função da produção desejada. Estas plantas podem ser configuradas em uma variedade de arranjos de um único passo, ou vários arranjos, com recirculação de permeado (MULDER, 1996).

A escolha entre as várias configurações depende do critério utilizado pelo comprador, assim como a eficiência de separação requerida, o tipo e volume do fluído a ser processado e do tamanho da planta (MACINTOSH, 2002).

Os elementos de membranas são combinados em série dentro dos vasos de pressão, e estes, são dispostos em paralelo para formar um estágio (Figura 7). Estes estágios são combinados em série para formar arranjos. Dependendo do tamanho da planta e da produção desejada, existem três configurações principais de arranjos de osmose reversa (SCHWINGE et al., 2004). A figura 8 mostra os três principais arranjos de osmose reversa. O arranjo 8(a) é realizado conectando vários vasos de pressão em série. Esta configuração é limitada pelo potencial de formação de *fouling* devido ao grande fluxo de água da alimentação e pela bomba de pressão que limita o tamanho dos vasos. Como a pressão de alimentação fornecida pela bomba é igual em todos os vasos (na realidade ela é um pouco menor nos vasos subsequentes, devido à perda de carga nos canais de alimentação), a força-motriz da filtração diminui nos vasos subsequentes devido ao aumento progressivo da pressão osmótica do concentrado, causando uma redução da taxa de transferência de massa e aumento na formação de *fouling* (FAZILET, 2000).

Arranjos em paralelo como mostrado na figura 8(b), consistem em um número de vasos de pressão em paralelo e são capazes de acomodar um maior número de elementos. O comprimento total dos vasos de pressão é limitado no arranjo em série. Quando o fluxo da alimentação é reduzido significativamente ao longo dos vasos de pressão, devido à permeação, a configuração do arranjo cônico, como é mostrada na figura 8(c) é utilizada. Esta é uma melhor opção de projeto, pois permite uma redução da área transversal ao longo do comprimento do vaso de pressão proporcional à redução da taxa de fluxo. Este arranjo é, às vezes, chamado de “árvore de natal” (MULDER, 1996). Apesar de mais capaz de lidar com fluxos de alimentação reduzidos, o arranjo cônico pode requerer altas pressões antes do primeiro estágio. O aumento da concentração pode também reduzir a pressão a níveis muito baixos; nestes casos, bombas inter estágios, como mostrado na figura 8(d), são usadas para aumentar a pressão e assim melhorar a transferência de massa (SCHWINGE et al.,2004).



Figura 7 - Unidades básicas que integram um sistema de osmose reversa.

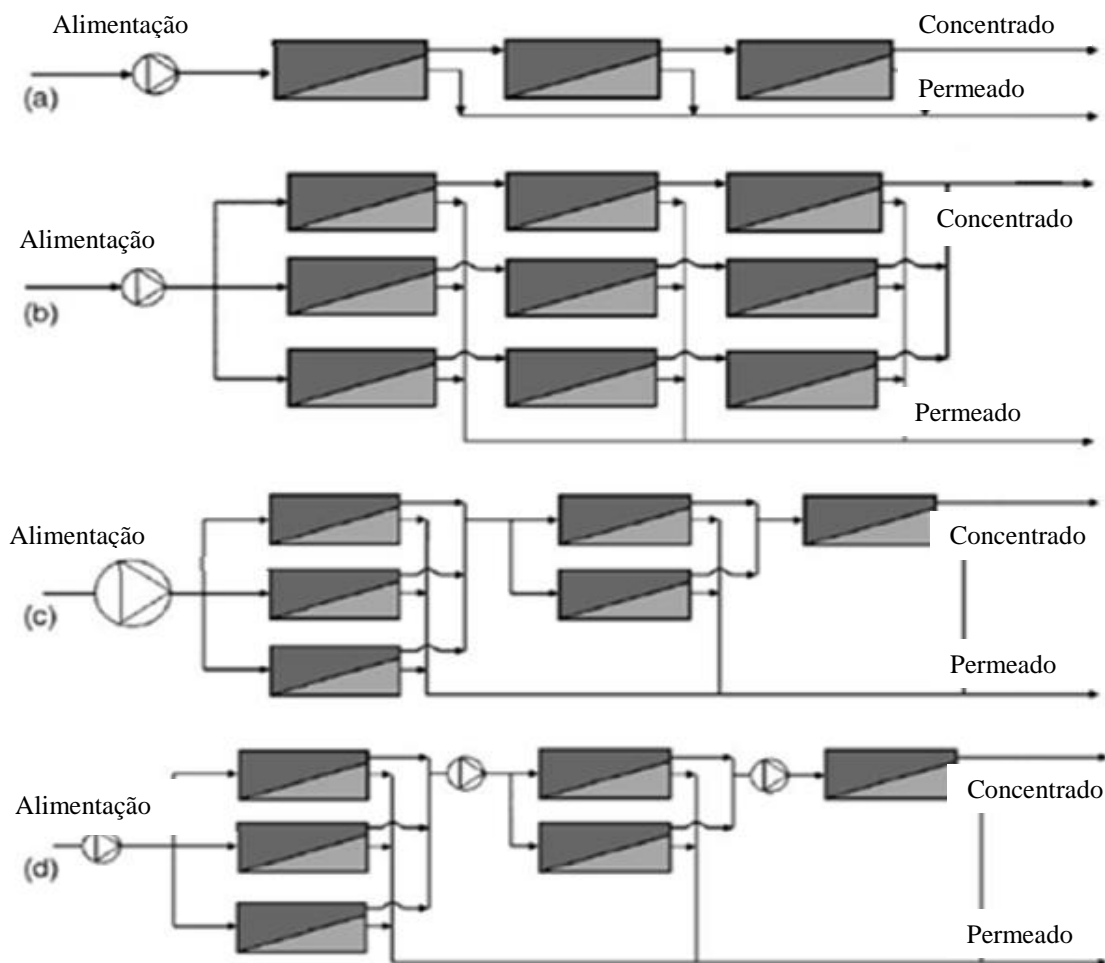


Figura 8 - Diferentes arranjos de sistemas de osmose reversa: (a) arranjo em série, (b) arranjo em paralelo, (c) arranjo cônico e (d) arranjo cônico com bombas entre os estágios.
Fonte: Macintosh (2002).

1.3 CONCENTRAÇÃO POLARIZAÇÃO

A formação de depósitos é suportada pela concentração polarização da corrente de alimentação diretamente na superfície da membrana. Uma vez que a solução passa através de uma membrana seletiva que separa componentes da solução, a concentração dos compostos separados começa a aumentar na superfície da membrana. Este fenômeno não ocorre apenas em membranas de osmose reversa, mas também, em outros tipos de membranas. A figura 9 mostra o princípio da concentração polarização em uma membrana com fluxo tangencial, como em membranas de osmose reversa. A figura mostra que a concentração aumenta até a uma certa distância (r_B) chamada 'boundary layer'.

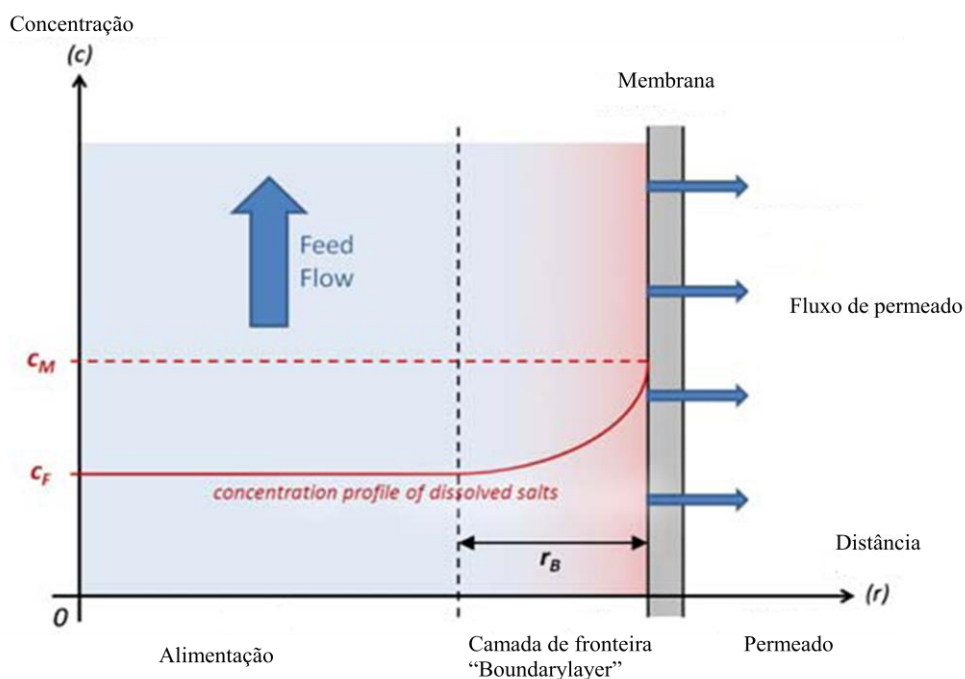


Figura 9 - Perfil da concentração de sais dissolvidos e sólidos suspensos da água de alimentação (C_F) para a superfície da membrana (C_M).

A espessura da camada de concentração polarização é altamente dependente da turbulência da corrente de alimentação. Quanto mais turbulência ocorrer no fluxo de alimentação, mais fina será a camada. Este fenômeno é um estágio preliminar para ocorrência do *fouling* e incrustação, devendo ser controlado. Um controle efetivo é a turbulência do fluxo de alimentação criada pela alta velocidade do fluxo e um espaçador com design apropriado. Um alto fluxo de permeado aumenta a camada de concentração polarização; o fluxo ou a pressão aplicada, não deve exceder a um valor limite, enquanto que a velocidade do fluxo da corrente de alimentação, não deve ser inferior a um certo limite. O fenômeno ilustrado na figura 9 também diminui a rejeição de sais e o fluxo de permeado, devido à concentração existente, assim como, uma maior pressão osmótica na superfície da membrana do que na solução de alimentação (KOLK et al., 2013).

A concentração polarização não inclui a formação de tortas de filtro, de camadas de gel, de sais precipitados ou de biofilmes microbianos, que são conseqüências da formação da camada de concentração polarização (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001).

O fenômeno da concentração polarização é indesejável por três razões: primeiro, a pressão osmótica perto da superfície da membrana aumenta, sendo necessário um aumento de pressão para manter o fluxo de permeado; segundo, com este fenômeno, ocorre um aumento da

concentração do soluto no permeado e, terceiro, ocorre um aumento na probabilidade de formação de *fouling*.

O fenômeno concentração polarização não é considerado como *fouling*, pois embora seja responsável pelo declínio do fluxo de permeado, uma vez cessado o processo de filtração, o fenômeno desaparece (SHIRAZI et al., 2010).

1.4 FOULING DE MEMBRANAS

O maior problema em processos de osmose reversa é o rápido declínio do fluxo de permeado com o tempo, devido ao *fouling* de membranas.

A operação de sistemas de membranas pode ocorrer com fluxo constante de permeado com pressão transmembrana variável (TMP) ou, com TMP constante e fluxo de permeado variável. As membranas utilizadas no tratamento de água e reuso são categorizadas em: membranas de baixa pressão (microfiltração e ultrafiltração operadas com pressões geralmente inferiores a 100 – 200 kPa) e de altas pressões (nanofiltração e osmose reversa operadas com pressão superior a 200 kPa) (GUO et al., 2012).

O *fouling* de membranas se manifesta como um aumento da TMP para manter um fluxo de permeado determinado ou, como uma queda do fluxo, quando o sistema é operado a pressão constante. São classificados como *fouling* reversível ou irreversível e, esta classificação, dependerá do modo de operação e limpeza dos sistemas de membranas. *Fouling* reversível ocorre devido à formação da camada de torta de materiais rejeitados pela superfície das membranas. A recuperação do fluxo de permeado nesses casos ocorre por retrolavagem, nos sistemas de microfiltração e ultrafiltração, e limpeza química, em sistemas de nanofiltração e osmose reversa. *Fouling* irreversível caracteriza-se por mecanismos de quimiossorção e obstrução dos poros e o fluxo de permeado não é recuperado por retrolavagem e limpeza química. Neste caso, as membranas precisam ser tratadas extensivamente com produtos de limpeza química ou devem ser substituídas por novos elementos (GUO et al., 2012).

A formação do *fouling* é causada por uma complexa interação física e química entre seus vários constituintes e entre estes e a superfície das membranas. O transporte de massa pode conduzir a adesão, acumulação ou adsorção de materiais nas membranas e/ou dentro dos poros das mesmas. De acordo com Li e Elimelech (2004), o *fouling* de membranas e suas características são determinados pela composição da água de alimentação, a concentração dos principais constituintes, a química da água (pH, força iônica, e concentração de cátions divalentes), propriedades da membrana (morfologia da superfície, hidrofobicidade, carga e tamanhos de moléculas retidas), temperatura, modo de operação e condições hidrodinâmicas (fluxo inicial de

permeado e velocidade de escoamento). Por isso, qualquer fator que possa mudar as características hidrodinâmicas da membrana e as características químicas da água de alimentação poderá afetar toda a performance da membrana (ZHOU; SMITH, 2002). Consequentemente, os efeitos químicos e físicos irão controlar o grau de deposição, assim como, irão determinar a severidade do *fouling* e qual estratégia será efetiva no seu controle (PEARCE, 2007). Normalmente, o *fouling* pode ser classificado em quatro categorias: particulado, orgânico, inorgânico e microbiológico (*biofouling*). A tabela 1 mostra os tipos de *fouling* e suas conseqüências em sistemas de osmose reversa.

Tabela 1 - Tipos e características de *fouling* e consequências destes em sistemas de osmose reversa.
 Fonte: Adaptado de PEÑA, et al., 2013.

Tipo de Fouling	Composição Química	Características	Problemas
Biofilme/Matéria Orgânica	Derivados de proteínas/carboidratos. Grande quantidade de microrganismos.	Viscoso.	Aumenta a ΔP e passagem de sais, diminui o fluxo de permeado. Mais freqüente nos primeiros elementos.
Material coloidal	Mais de 90% (aluminossilicatos)	Conglomerado de pequenas partículas.	Aumenta a ΔP e diminui o fluxo de permeado. Gradualmente, afeta todas as membranas do vaso começando pelos primeiros. Deficiência no pré-tratamento.
Inorgânico	Carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, sulfato de bário e sílica*	Formas cristalinas exceto para sílica, que é amorfa.	Diminuição da rejeição de sais e do fluxo de permeado. Geralmente afetam os últimos elementos do vaso.
Metais	Ferro, alumínio, manganês	Depósito amorfo.	Diminuição do fluxo. Deficiência no pré-tratamento.

* Sílica foi incluída no grupo dos inorgânicos, devido à dificuldade em se distinguir sílica coloidal e sílica precipitada.

2 OBJETIVO DA TESE

O objetivo central desta tese é a análise do *fouling* de membranas de osmose reversa (utilizando a técnica da autópsia, com o intuito de verificar a causa da colmatação de diferentes elementos utilizados em setores industriais diversificados e, por meio disso, testar diferentes produtos químicos como: ácidos, bases, surfactantes e agentes quelantes, individualmente e combinados, em diferentes tempos, para a verificação da remoção do *fouling* nestas membranas) e, análise do *biofouling* formado nestas membranas (comparação das estruturas dos biofilmes formados em sistemas reais de osmose reversa com biofilmes de cultura pura formados em células de fluxo de bancada, verificar se existe alguma relação do biofilme formado na superfície das membranas na deposição de sais e analisar a ação de produtos químicos utilizados na limpeza química de membranas (ácidos, bases, surfactantes e agentes quelantes) nas bactérias contidas no biofilme).

Este projeto é relevante, pois:

- (a) uma das principais características de biofilmes microbianos é a presença de uma substância extracelular polimérica constituída, principalmente, por carboidratos. Grande parte do conhecimento sobre a estrutura dos biofilmes advém da formação destas estruturas utilizando culturas puras em um ambiente controlado; diferente do que ocorre, por exemplo, em sistemas reais de osmose reversa, no qual diferentes tipos de microrganismos, compostos orgânicos e inorgânicos estão presentes.
- (b) praticamente não há pesquisas executadas com rigor científico de limpeza química de membranas de osmose reversa oriundas de plantas em operação comercial (real). Pesquisas acadêmicas de formação de camadas de *fouling* ou de limpeza destas camadas geralmente são executadas com sistemas onde a natureza dos elementos depositados na superfície da membrana é conhecida, onde a diversidade destes componentes é limitada e os depósitos são formados após tempos relativamente curtos de exposição. Em sistemas reais, as membranas são colmatadas por uma diversidade muito grande de compostos bióticos e abióticos, depositados em intervalos de tempos muito maiores (vários meses a vários anos);
- (c) outro aspecto importante que será estudado no projeto é o papel do biofilme microbiano formado na superfície das membranas na deposição de sais. Esta estrutura biológica geralmente é considerada no aspecto de colmatação biológica, mas não de colmatação química.

REFERÊNCIAS*

BAKER, R. Membrane and Module Preparation. **Membrane Separation Systems**, v. 2, n. 2, p. 119-123, 1990.

BODDEKER, K. W. Commentary: Tracing membrane science. The early history of membrane science selected papers celebrating. **Journal of Membrane Science**, v. 100, n. 1, p. 65-68, 1995.

GARUD, R. M.; KORE, S. V.; KORE, V. S.; KULKARNI G. S. A Short Review on Process and Applications of Reverse Osmosis. **Universal Journal of Environmental Research and Technology**, v.1, n.3, p.233-238, 2011.

GLATER, J. The early history of reverse osmosis membrane development. **Desalination**, v. 117, n. 1-3, p. 297-309, 1998.

GUO, W.; HAO NGO, H.; LI, J. A mini-review on membrane fouling. **Bioresource Technology**, v.122, p. 27-34, 2012.

LEE, S.; ELIMELECH, M.; BOOA, C.; HONGA, S. Comparison of fouling behavior in forward osmosis (FO) and reverse osmosis (RO). **Journal of Membrane Science**, v. 365, p. 34-39, 2010.

LI, K. Membrane Science and Membrane Separation Processes. **Journal of Membrane Science**, v. 52, n. 2, p. 205-219, 1990.

LI, Q.; ELIMELECH, M. Organic fouling and chemical cleaning of nanofiltration membranes: measurements and mechanisms. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 17, p. 4683-4693, 2004.

LOEB, S.; SOURIRAJAN, S. Sea Water Demineralization by Means of a Semi permeable Membrane. **Sea Water Research**, v. 2, n. 1, p. 60, 1960.

LONSDALE, H. K. The growth of membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 10, n. 2-3, p. 81-181, 1982.

MALAEB, L.; AYOUB, G. M. Reverse osmosis technology for water treatment: State of the art review. **Desalination**, v. 267, p. 1-8, 2011.

MALLEVIALLE, J.; ODENDAAL, P. E.; WIESNER, M. R. **Water Treatment Membrane Processes**. New York: Ed. McGraw-Hill, 1996.

MULDER M. Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1996.

PEÑA, N.; GALLEGOA, S.; DEL VIGOA, F.; CHESTERSB, S.P. Evaluating impact of fouling on reverse osmosis membranes performance. **Desalination and Water Treatment**. v.51, p.958–968, 2013.

RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; VENTURAC, F.; BARCELO, D. Rejection of pharmaceuticals in nanofiltration and reverse osmosis membrane drinking water treatment. **Water Research**, v. 42, p. 3601–3610, 2008.

SANTOYO, B.; CARRASCO, G. J. L.; GOMEZ, G. E.; MARTIN, M. M. F.; MONTESINOS, H. A. M. Spiral wound membrane reverse osmosis and the treatment of industrial effluents. **Desalination**, v.160, p.151-158, 2004.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso**. Edição. São Paulo: ABES, 2001. 234 p.

SCHWINGE, J.; NEAL, P. R.; WILEY, D. R.; FLETCHER, D. F.; FANE, A. G. Spiral wound modules and spacers Review and analysis. **Journal of Membrane Science**, v. 242, p.129-153, 2004.

TRAUBE, M. Physiologie und WissenschaftlicheMedicin. In: REISCHERT, T.; DUBOISREYNOLDS, R. (Ed.). **Archiv fur Anatomie**.Leipzig, 1867.

WAGNER, J. **Membrane filtration handbook: practical tips and hints**.2nd ed. Osmonics, 2001.

XU, P.; DREWES, J.E.; BELLONA, C.; AMY, G.; KIM, T.U. Rejection of Emerging Organic micro pollutants in nanofiltration reverse osmosis membrane applications. **Water Environ. Res.**, v. 77, p.40-48, 2005.

ZHOU, H.; SMITH, D.W. Advanced technologies in water and wastewater treatment. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v.1, p. 247-264, 2002.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

3.1 **CAPÍTULO 1: UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS TRADICIONAIS NA ANÁLISE DE FOULING**

3.1.1 **Introdução**

Problemas operacionais em sistemas de osmose reversa utilizados no tratamento de água podem ser causados por uma variedade de tipos de *fouling*: particulado, orgânico, inorgânico e *biofouling*. A ocorrência de *fouling* em membranas de osmose reversa conduzirá a gastos operacionais incluindo: maior gasto de energia elétrica, aumento na frequência de limpezas químicas e redução da vida útil das membranas. Uma caracterização adequada do *fouling* resulta em um controle efetivo do mesmo (PONTIÉ et al., 2005).

A autópsia de membranas é a técnica mais utilizada para verificar a causa da colmatação do elemento filtrante. Diversas ferramentas analíticas são utilizadas em uma autópsia de membranas para caracterização do *fouling* presente (fluorescência de raios X, difração de raios X, ângulo de contato, infravermelho, microscopia eletrônica, permeabilidade hidráulica, SDI, entre outros).

Dudley et. al (2003) utilizou a calcinação para quantificação de orgânicos e a microscopia eletrônica para verificar e identificar a presença de algas, fungos e bactérias presentes em depósitos de membranas de osmose reversa. Butt et. al., (1997) utilizou técnicas como: microscopia eletrônica, fluorescência de raios X e difração de raios X na autópsia de membranas de osmose reversa. Carnahan (2000) realizou a autópsia de três membranas de osmose reversa que, visualmente, mostraram sinais de colmatação por *biofouling*. A utilização da microscopia eletrônica não só confirmou a presença de biofilmes, como também, evidenciou a precipitação química na superfície destas membranas.

Geralmente, a análise de depósitos sobre membranas de osmose reversa envolve a utilização de equipamentos analíticos caros como, por exemplo: fluorescência de raios X, difração de raios X e microscopia eletrônica. Alguns métodos analíticos tradicionais poderiam auxiliar na análise de *fouling* na ausência de equipamentos mais sofisticados.

3.1.2 **Objetivos**

Verificar se métodos tradicionais de quantificação como titulação (quantificação de magnésio e cálcio) e espectrofotometria (quantificação de sílica e ferro total) são adequados para amostras de *fouling* em membranas de osmose reversa.

3.1.3 Materiais e Métodos

3.1.3.1 Amostras de Membranas Analisadas

Cinco elementos de osmose reversa colmatados de diferentes empresas foram utilizados. As amostras foram coletadas e trituradas em liquidificador para remoção dos depósitos sobre as mesmas e, posteriormente, peneiradas para retenção dos pedaços de membranas (peneira com abertura de 75 μm). As amostras processadas foram estocadas na geladeira para posterior análise.

3.1.3.2 Quantificação de Cálcio e Magnésio

O método utilizado nesta quantificação foi o da titulação utilizando EDTA como titulante (Standard Methods, 1985). Soluções de cloreto de magnésio 1 M e cloreto de cálcio 1 M foram preparadas para utilização e verificação da existência de interferentes contidos nas amostras de membranas.

Volumes de 150, 175, 200 e 250 μL da solução de MgCl_2 1 M foram adicionados em 20 mL de cada amostra de membrana para posterior titulação com EDTA 0,01 M utilizando negro de eriocromo T como indicador. Para a quantificação de cálcio, os mesmos volumes utilizados para a quantificação de magnésio foram utilizados com solução de CaCl_2 1 M em 20 mL de cada amostra para posterior titulação com EDTA 0,01 M e azul preto de eriocromo R como indicador.

3.1.3.3 Quantificação de Sílica

Para a quantificação de sílica em amostras de membranas foi utilizado o método do molibdato de amônio. O molibdato de amônio em pH de aproximadamente 1,2 reage com sílica e qualquer fosfato presente para produzir hetero-poli-ácidos. Ácido oxálico é adicionado para destruir o ácido molibdofosfórico, mas não o ácido molibdosilícico. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração de sílica na amostra. Termos como sílica coloidal, cristaloidal e iônica têm sido utilizada para diferenciar vários tipos de sílica, porém estas terminologias não são fundamentadas. Sílica não reativa pode ser convertida em sílica reativa pelo aquecimento ou com digestão prévia da amostra com bicarbonato de sódio (Standard Methods, 1985).

Volumes de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1 mL da solução estoque de sílica (solução de metassilicato de sódio nonaidratado 1 g SiO_2/L) foram adicionados em 20 mL de cada amostra de membrana e completados para 50 mL com água mili-Q, representando concentrações de 2, 4, 6, 10 e 20 mg SiO_2/L adicionadas respectivamente em cada amostra, para posterior leitura das absorvâncias em comprimento de onda de 410 nm. Experimento realizado em duplicata.

3.1.3.4 *Quantificação de Ferro Total*

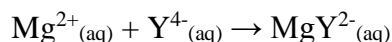
O método utilizado foi o da fenantrolina. Neste método, o ferro é reduzido ao estado ferroso pelo aquecimento com ácido e hidroxilamida e tratado com 1,10-fenantrolina em pH 3,2 a 3,3. Três moléculas de fenantrolina quelam cada átomo de ferro para formar um complexo vermelho-laranja. A solução colorida obedece a lei de Beer e sua intensidade é independente do pH 3 – 9. Um pH entre 2,9 e 3,5 assegura uma rápida cor na presença de excesso de fenantrolina (Standard Methods, 1985).

Para verificar a acurácia deste método em amostras de membranas, volumes de 50, 100, 200, 300 e 500 µL da solução padrão de ferro (1 mL = 200 µg de ferro) foram adicionados em 50 mL de cada amostra de membrana para posterior diluição com água mili-Q para 100 mL. Experimento realizado em duplicata.

3.1.4 **Resultados e Discussão**

3.1.4.1 *Quantificação de Magnésio*

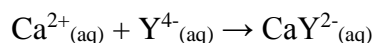
A titulação das cinco amostras de membranas sem adição de padrão (MgCl₂ 1 M) mostrou uma quantidade muito pequena de magnésio nas mesmas; indicando que a quantidade de magnésio titulada em cada amostra foi, exclusivamente, com relação à adição de padrão de acordo com a reação:



Os resultados mostraram que o método utilizado na quantificação de magnésio em amostras de membranas funcionou pois, a quantidade de matéria de EDTA que reagiu com a quantidade de matéria adicionada de magnésio foi, praticamente, de 1:1 (as diferenças observadas entre o número de mols de ambos no ponto de equivalência foi menor que 10 %) (Anexo 1). Alguns íons metálicos e material orgânico suspenso ou coloidal podem interferir no método dificultando a observação do ponto de equivalência (Standard Methods, 1985).

3.1.4.2 Quantificação de Cálcio

A titulação das cinco amostras de membranas sem adição de padrão (CaCl_2 1 M) também mostrou uma quantidade muito pequena de cálcio nas mesmas, sendo a quantidade de cálcio titulada em cada amostra, igual a adição de padrão de acordo com a reação:



Os resultados mostraram que o método utilizado na quantificação de cálcio em amostras de membranas também funcionou, pois como com o magnésio, as diferenças observadas entre o número de mols de ambos no ponto de equivalência foi menor que 10 %, indicando que os compostos contidos nos depósitos das amostras de membranas não interferiram no método (Anexo 2). Alguns íons metálicos e material orgânico suspenso ou coloidal podem interferir no método dificultando a observação do ponto de equivalência (Standard Methods, 1985).

3.1.4.3 Quantificação de Sílica

O método do molibdato de amônio mostrou-se eficaz para a quantificação de sílica em amostras de membranas de osmose reversa. Houve um aumento da absorbância referente ao incremento da concentração de sílica nas amostras, indicando a eficácia do método e, houve pouca diferença na inclinação das retas obtidas com a fortificação em relação à reta padrão (desvio máximo de 6% nas amostras 1, 3 e 5), ou seja, a quantificação de sílica nas amostras pode ser feita diretamente utilizando a curva padrão (Figura 10). Vidrarias e reagentes podem contribuir para aumentar o conteúdo de sílica nas amostras; por isso, a utilização de materiais de vidro deve ser evitada e os reagentes utilizados devem possuir baixo teor de sílica (Standard Methods, 1985).

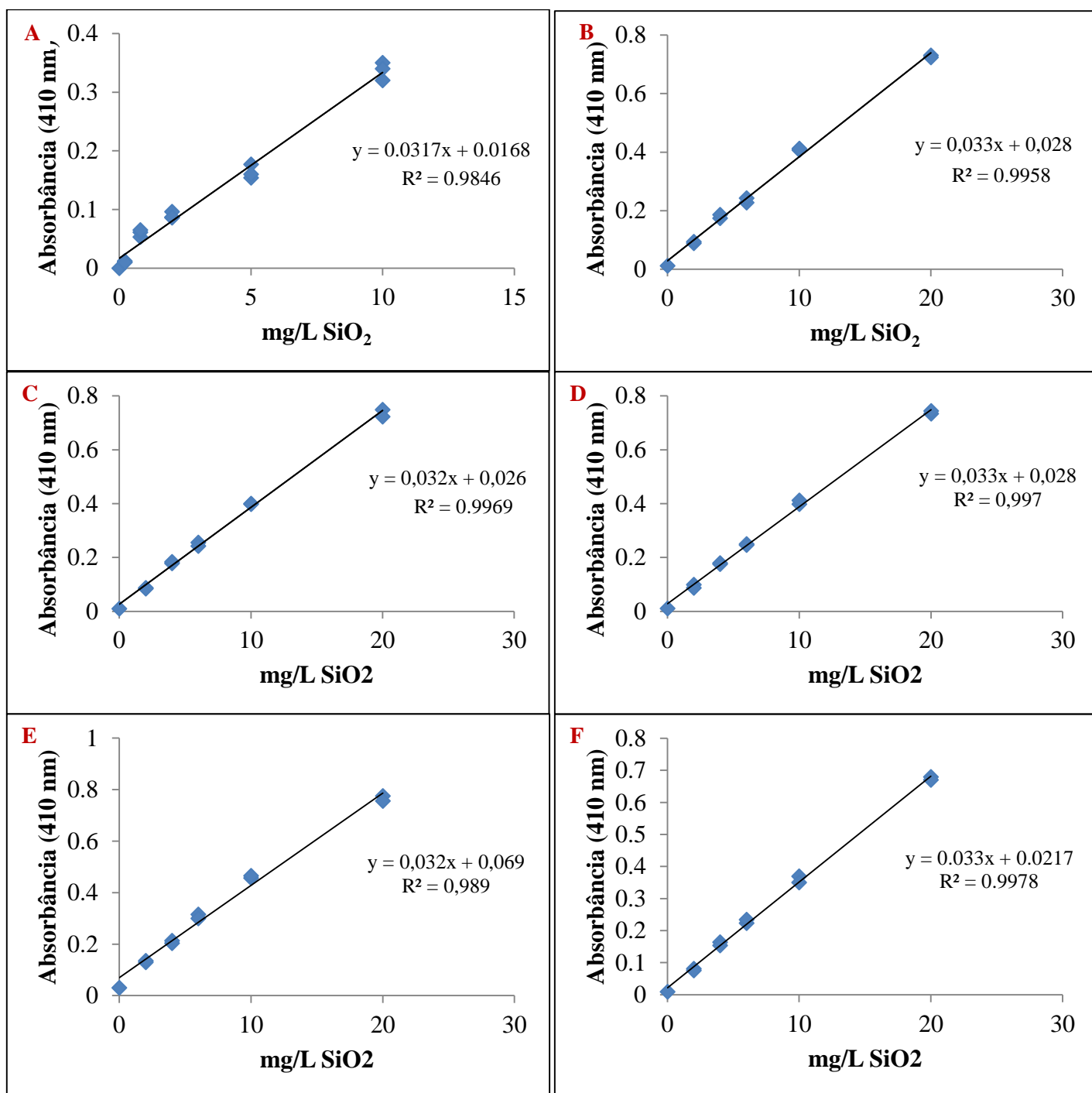


Figura 10 - Adição de padrão em 5 amostras de membranas de osmose reversa. Curva padrão (A) e amostras fortificadas 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) e 5 (F).

3.1.4.4 Ferro Total em Amostras de Membranas

Para verificar se possíveis interferentes contidos nas amostras influem no resultado da análise, todas as amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas de solução padrão de ferro. Todos os experimentos de fortificação resultaram em resposta linear da absorbância com relação à quantidade de ferro adicionada, demonstrando que a reação química do teste continua sendo proporcional à quantidade de ferro (Figura 11).

O segundo aspecto importante que deve ser analisado é se a inclinação da reta de fortificação das amostras foi similar à inclinação da reta da curva de calibração com solução padrão. Em relação à inclinação da reta, as amostras 1, 2, 3, 4 e 5 de *fouling* de membranas variaram: 323%, 355%, 194%, 227% e 356% respectivamente.

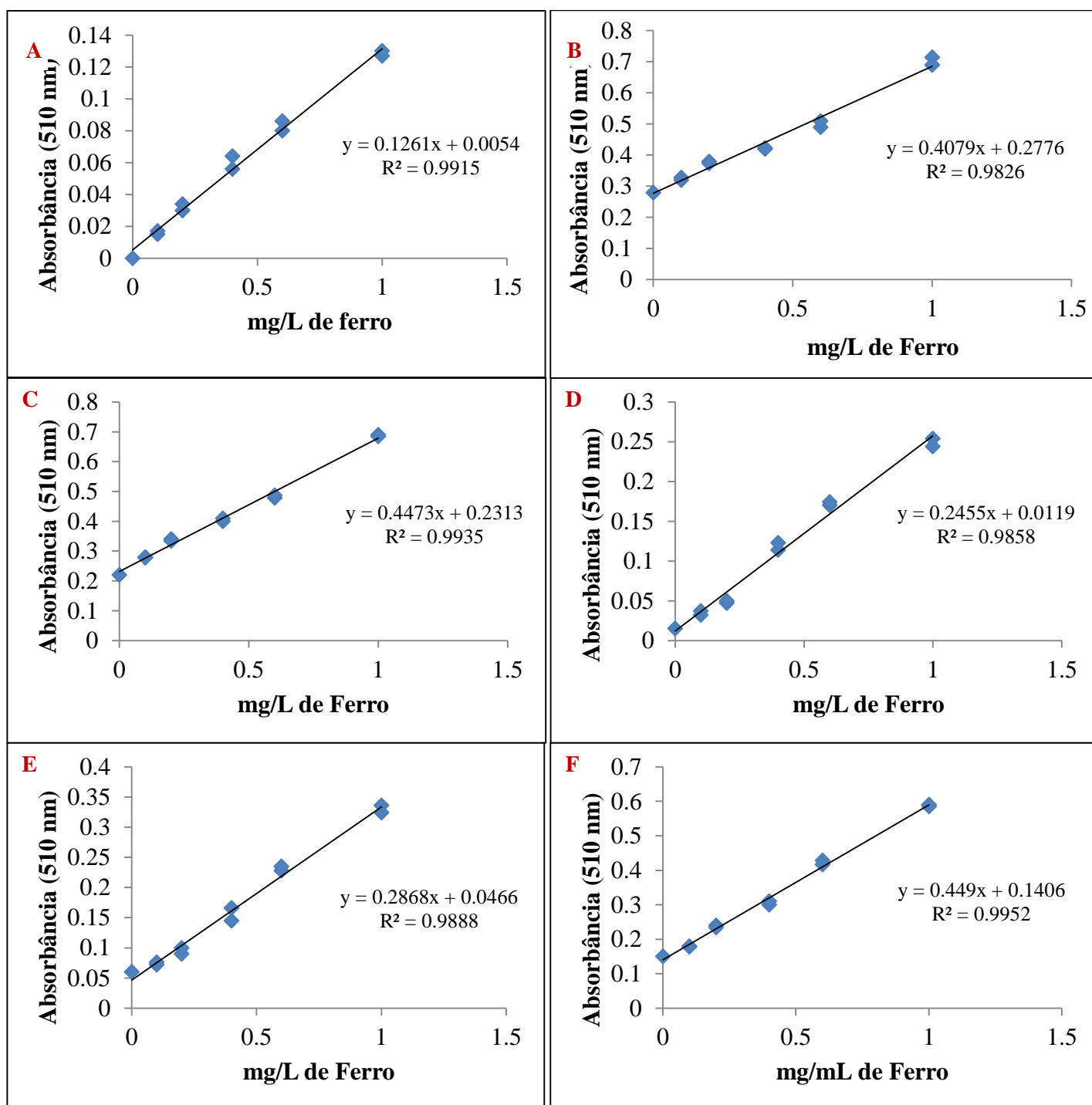


Figura 11 - Adição de padrão em 5 amostras de membranas de osmose reversa para quantificação de ferro. Curva padrão (A) e amostras fortificadas 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) e 5 (F).

3.1.4.4.1 Quantificação de ferro total em amostras que apresentaram uma inclinação da reta de fortificação diferente da reta padrão

Como as fortificações das amostras apresentaram inclinações significativamente diferentes da inclinação da curva padrão, a quantificação de ferro total nas mesmas não pode ser feita utilizando diretamente a curva de calibração (curva padrão).

Para a quantificação de ferro total em amostras de membranas de osmose reversa deve-se fortificar cada amostra para se obter a equação da reta (Figura 11). O primeiro ponto de cada amostra no gráfico corresponde à quantidade de ferro total nas mesmas, porém, o eixo x encontra-se defasado, indicando como nula a quantidade de ferro total. Para corrigir esta defasagem e obter a quantidade real de ferro total nas amostras, deve-se prolongar a reta de fortificação até o ponto em que $y = 0$; neste ponto, temos $b = 0$. Portanto, com a equação da reta obtida com a fortificação de cada amostra, obtêm-se a quantidade real de ferro nas mesmas (Figura 12).

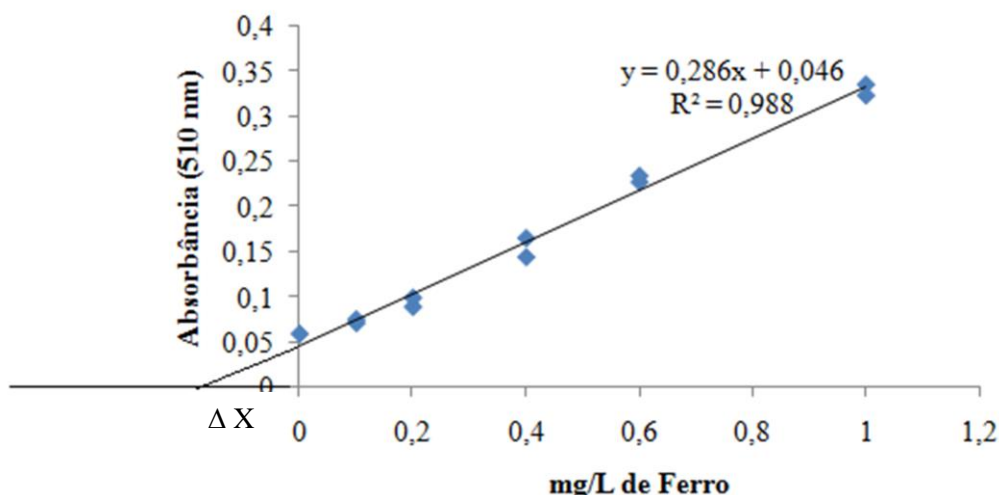


Figura 12 - Representação de um esquema do prolongamento da curva de fortificação de uma amostra qualquer para $y=0$. O valor de ΔX representa o valor real da concentração de ferro na amostra.

3.1.4.4.2 Comparação das concentrações de ferro nas amostras de membranas utilizando o método da adição de padrão e diretamente a curva padrão

De acordo com a tabela 2, todas as amostras que foram fortificadas apresentaram uma concentração de ferro muito inferior quando comparadas com a utilização direta da curva de calibração. A amostra 5, por exemplo, apresentou uma variação de 71% na concentração de ferro. Estes dados comprovam que, apesar do método de quantificação de ferro em amostras de membranas funcionar, a quantificação não deve ser feita utilizando a curva de calibração e sim, por meio da adição de padrão nas amostras. Alguns íons como: nitrito, cianeto, fosfato

(polifosfato mais que ortofosfato), cromo e zinco em concentrações 10 vezes maiores que o ferro; cobalto e cobre em concentrações acima de 5 mg/L e níquel em concentrações acima de 2 mg/L interferem no método. Bismuto, cádmio, mercúrio, molibdato e prata precipitam a fenantrolina (Standard Methods, 1985).

Tabela 2 - Comparação das concentrações de ferro nas amostras utilizando as absorvâncias obtidas diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão.

Amostras de membranas	Média das absorvâncias das amostras (510 nm)	[] de ferro das amostras utilizando a curva padrão (mg/L)	[] de ferro das amostras utilizando a fortificação das amostras (mg/L)
1	0,28	2,18	0,69
2	0,22	1,70	0,50
3	0,015	0,08	0,06
4	0,06	0,43	0,21
5	0,15	1,15	0,33

3.1.5 Conclusão

A utilização de métodos analíticos como a titulação e a espectrofotometria se mostraram adequados para a quantificação dos principais constituintes inorgânicos presentes em *fouling* de membranas de osmose reversa. A única ressalva deveu-se à quantificação de ferro nas amostras, pois a utilização direta da curva padrão na quantificação se mostrou errônea, sendo indicado a adição de padrão para a quantificação de ferro das mesmas.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, E.; GREENBERG, R.; TRUSSELL, R.; CLESCERI, L.S.; MARY, H. F. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. 16 ed. Washington, D.C. American Public Health Association, 1985.

BUTT, F. H.; RAHRNAN, F.; BADURUTHAMAL, U. Characterization of foulants by autopsy of RO desalination membranes. **Desalination**. v.114, p.51-64, 1997.

CARNAHAN, R.P; BOLIN, L.; SURATT, W. Biofouling of PVD-1 reverse osmosis elements in the water treatment plant of the city of Dunedin, Florida. **Desalination**. v.102, p.235-244, 2000.

DUDLEY, L.Y.; ANNUNZIATA, U.A.; ROBINSON, J.S.; LATHAM, L.J. Proc. IDA World Congress on Desalination and Water Sciences, Abu Dhabi, 4 (2003) 45.

PONTIÉ, M.; RAPENNE, S.; THEKKEDATH, A.; DUCHESNE, J.; LEPARC, J.; SUTY, H. Tools for membrane autopsies and antifouling strategies in seawater feeds: a review. **Desalination**, v. 181, p. 75-90, 2005.

4.2 **CAPÍTULO 2: AUTÓPSIA DE ELEMENTOS DE OSMOSE REVERSA UTILIZADOS EM DIVERSOS SETORES INDUSTRIAIS**

4.2.1 **Introdução**

A autópsia de membranas é uma técnica utilizada para identificar a causa do baixo rendimento da membrana. O conceito de autópsia de membranas é tão antigo quanto as próprias membranas (DARTON, 2004). Para isto, um elemento deve ser “sacrificado”, sendo removido da planta para análise. Técnicas analíticas são utilizadas para determinar a natureza do *fouling* presente na superfície das membranas. Um primeiro procedimento na autópsia é a escolha de elementos de membranas apropriados. Cuidados devem ser tomados para preservar a composição de biomassa original. Os procedimentos para uma autópsia de membranas são: seleção de um elemento de membrana representativo (ou elementos), dissecação e análises para identificação dos componentes da camada de *fouling*, com o objetivo de identificar as causas da colmatação (PONTIÉ et al., 2005).

A autópsia de membranas é uma técnica destrutiva e de alto custo referente à parte analítica e a substituição do elemento. Na maioria dos casos, a autópsia de membranas é utilizada como última opção para a solução dos problemas. Comumente, esta técnica é utilizada quando problemas severos relacionados com a diminuição do fluxo do permeado, baixa rejeição de sais, ou aumento da diferença de pressão são detectados na planta e nenhum resultado é obtido pelas práticas tradicionais de remediação (PEÑA, et al., 2013).

Dudley et al (1995) analisou amostras da água de alimentação e *fouling* de membranas por autópsia coletadas de diferentes partes do mundo, incluindo o oriente médio. Os elementos que apresentaram alta taxa de *biofouling* continham uma grande porcentagem de orgânicos (tipicamente maior que 60%) determinados por perda ao fogo a 550 °C. O *fouling* inorgânico nas membranas foi predominantemente causado por ferro, sílica, alumínio, cálcio e sulfato.

Karime et al (2008) relatou que uma autópsia realizada em uma planta industrial no norte da Europa, mostrou grande quantidade de depósitos visíveis nas superfícies das membranas. O *fouling* contido nas membranas apresentou forte odor e, análises destes materiais mostraram: a presença de orgânicos (66%), sílica (12%), carbonato de cálcio (9%), fosfato de cálcio (5%) e alumina (3%), predominantemente. Análises microbiológicas mostraram a presença de grande quantidade de microrganismos nas superfícies das membranas. Com a autópsia dos elementos, esta planta industrial, atualmente, consegue manter os níveis de *biofouling* em patamares toleráveis com a utilização de uma limpeza química correta.

Schneider et al (1997) analisou a camada de *fouling* em todos os elementos de osmose reversa contidos em um vaso de pressão. A composição elementar mostrou que apenas silício, ferro, fósforo, alumínio, enxofre, estrôncio e bário foram detectados em quantidades superiores a 1% por peso da fração inorgânica do *fouling*. A fração de silício, que estava presente em menos de 2% (por peso) no primeiro elemento, teve um aumento de 4-6% nas camadas de *fouling* no segundo elemento. Mais da metade do peso seco dos depósitos contidos nos elementos eram de origem orgânica. Esta proporção estava dentro de valores tipicamente encontrados em *fouling* de membranas, que varia de 26% - 90% (BACKER; DUDLEY, 1999).

Darton et al (2004) fizeram uma revisão estatística de 150 artigos de autópsias de membranas e concluíram que: embora todas as membranas analisadas continham biofilmes, estes não são considerados um problema quando as bactérias presentes são menores que 10^4 ufc/cm² e não excretam EPS em grande quantidade; a utilização de cloro não mostrou eficácia na redução de biofilmes sobre a superfície das membranas e o tipo de *fouling* mais comum em membranas de osmose reversa foi o *biofouling*, seguido pelo *fouling* causado por ferro e sílica (que invariavelmente está associado ao alumínio e ao ferro).

Em elementos de osmose reversa, após a seleção do elemento a ser analisado, a primeira etapa de uma autópsia refere-se à observação do revestimento externo de fibra de vidro das mesmas (presença de quebras ou rachaduras) (Figura 13). O procedimento seguinte consiste na remoção do revestimento externo para se ter acesso aos pacotes de membranas para inspeção visual dos mesmos (verificar possíveis danos nas membranas e na linha de cola dos pacotes), espaçadores de alimentação e permeado (contaminação) e presença de odor (Figura 14). A terceira etapa consiste em coletar amostras para posterior análise.



Figura 13 - Revestimento externo de fibra de vidro de um elemento de osmose reversa colmatado.



Figura 14 - Pacotes de membranas desenrolados (A e B). Espaçadores de alimentação sem depósito (C) e com depósito (D). Acesso aos espaçadores de permeado após corte da membrana (E e F).

4.2.2 Objetivo

Analisar o *fouling* de diferentes membranas colmatadas utilizadas em escala real em diferentes setores industriais (químico, petroquímico, alimentício, tintas, borracha, farmacêutica e papel e celulose) utilizando a autópsia de membranas, além de verificar a estrutura dos biofilmes formados nestes elementos (número de células viáveis, quantificação de carboidratos e proteínas).

4.2.3 Materiais e Métodos

4.2.3.1 Elementos de Osmose Reversa Analisados

Foram analisados trinta e sete elementos de osmose reversa colmatados provenientes de diferentes empresas (Tabela 3). O revestimento externo de fibra de vidro dos elementos foi removido utilizando uma serra elétrica (procedimento utilizado para ter acesso às folhas de membranas colmatadas).

Tabela 3 - Procedência de cada elemento colmatado enviado para análise.

INDÚSTRIA	ELEMENTOS
Química	5; 6; 7; 8; 10; 12; 31; 32; 33; 34; 36; 37
Petroquímica	1; 2; 3; 4; 9; 11; 17; 18
Alimentícia	19; 20; 21; 22; 26; 29
Tintas	35
Borracha	15; 30
Farmacêutica	14; 16; 23; 27
Papel e Celulose	13; 24; 24; 28

4.2.3.2 Coleta das Amostras de Membranas

Após a abertura dos elementos e análises preliminares (distribuição do *fouling* sobre as membranas, presença ou ausência de odor, contaminação ou não dos espaçadores de alimentação e permeado e verificação de danos nos pacotes de membranas), foram coletadas de cada um, amostras da região da entrada da alimentação (3 amostras) e saída do concentrado (3 amostras). Estas foram mantidas em geladeira a 4 °C até serem analisadas.

4.2.3.3 Remoção dos Depósitos Sobre as Membranas

As amostras foram trituradas com 200 mL de água destilada em liquidificador, por 3 minutos, na potência máxima, para remoção dos depósitos sobre as membranas e desagregação dos biofilmes. Após a trituração, as amostras foram peneiradas (peneiras de 75 µm) para a remoção de fragmentos de membrana, e armazenadas em geladeira a 4 °C.

4.2.3.4 Peso Seco e Quantificação de Matéria Orgânica nas Amostras

Para a análise de peso seco, alíquotas de cada amostra (20 mL) foram colocadas em cadinhos de porcelana e, posteriormente, aquecidas a 105 °C por 12 horas em estufa. Após a análise de peso seco, a quantificação de matéria orgânica das amostras foi feita após as mesmas serem submetidas ao forno mufla na temperatura de 550 °C por 20 minutos. Os resultados foram expressos em % de matéria orgânica em relação ao peso seco das amostras.

4.2.3.5 Quantificação de Carboidratos e Proteínas nas Amostras

O método do fenol-sulfúrico foi utilizado para a quantificação de carboidratos, empregando glicose (Synth) como padrão e leitura das absorbâncias a 490 nm (Dubois, 1956). Para a quantificação de proteínas foi escolhido o método de Bradford, utilizando albumina bovina (Sigma –Aldrich) como padrão e leitura das absorbâncias a 595 nm (Bradford, 1976).

4.2.3.6 Contagem de Bactérias Viáveis

Foram feitas diluições (10, 100, 1000 e 10000) das amostras em solução salina (0,9% de NaCl) para posterior inoculação e quantificação das bactérias viáveis utilizando meio R2A (Merck). O cálculo utilizado para a contagem de unidades formadoras de colônias foi: $N \times D \times 10 \times 200/A$; onde: N = número de colônias na placa (entre 30 e 300 colônias), D = diluição decimal utilizada, 10 = conversão de 100 µL para 1 mL, 200 = diluição da amostra e A = área da amostra de membrana utilizada (em cm²).

4.2.3.7 Análise das Amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca FEI, modelo Quanta 600 FEG para uma visualização mais detalhada dos depósitos em algumas amostras de membranas, e para verificar a eficiência da trituração das amostras na remoção desses depósitos sobre as mesmas.

4.2.3.8 Análise Elementar do Fouling das Membranas por Fluorescência de Raios X (XRF)

Foi feita a raspagem do *fouling* sobre as membranas utilizando uma espátula, para obtenção de material necessário para a análise da composição elementar. Para esta quantificação foi utilizado o equipamento Axios Advanced da Panalytical, localizado no laboratório LCT na Engenharia de Minas da Poli-USP. Os teores apresentados foram determinados por análise semi-quantitativa sem padrões com análise de elementos químicos de flúor a urânio.

4.2.4 Resultados e Discussão

4.2.4.1 Elementos de membranas

Todos os elementos apresentaram seu revestimento externo intacto (ausência de quebras e rachaduras). Em todos os elementos analisados, a distribuição do material sobre as membranas (*fouling*) apresentou-se de forma homogênea (Figura 15).

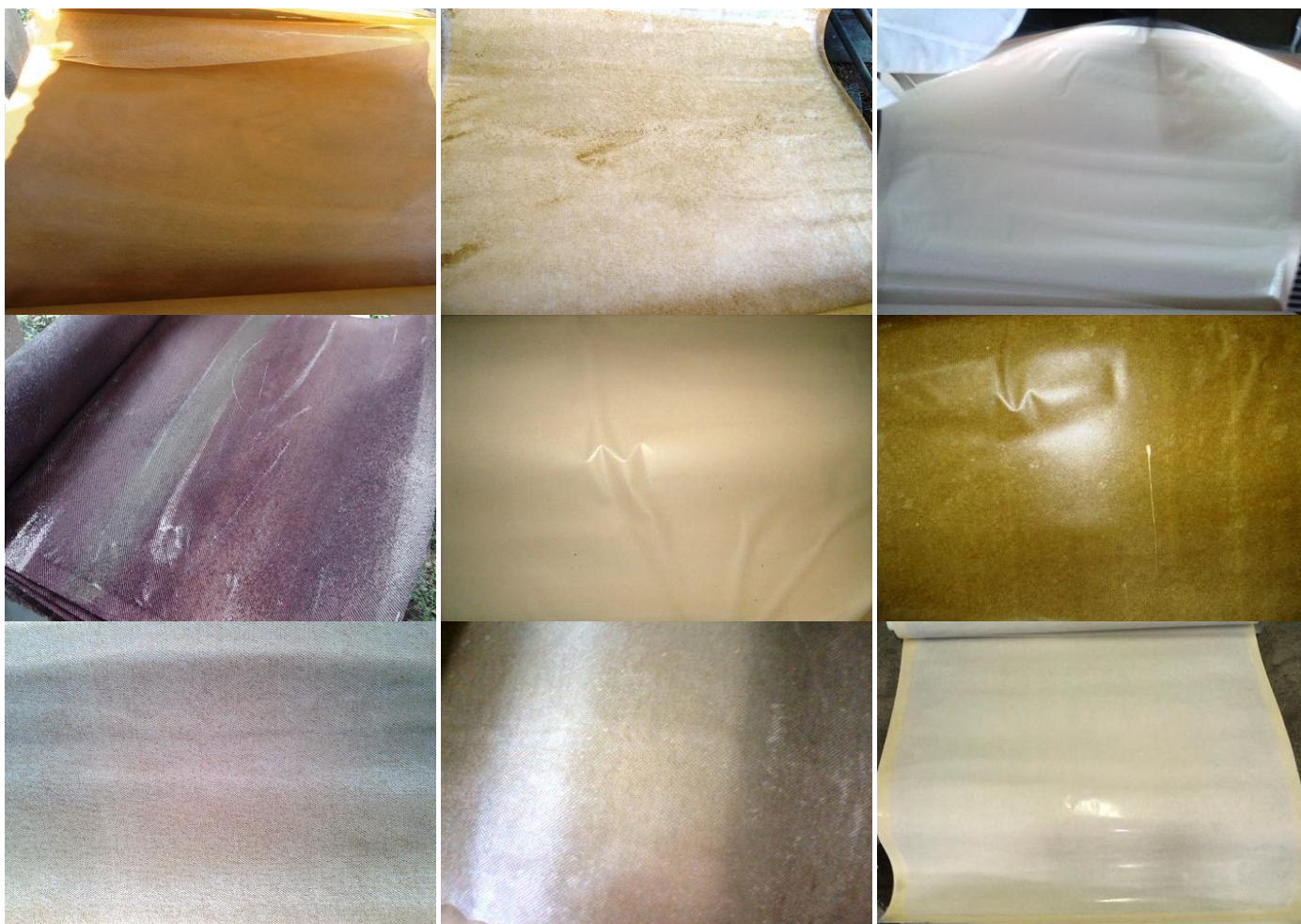


Figura 15 - Distribuição homogênea do fouling em 9 diferentes amostras de membranas.

4.2.4.2 Observação do Fouling nas Membranas

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar se a trituração das amostras em liquidificador foi eficaz na remoção dos depósitos sobre as mesmas e observar a estrutura do *fouling* em 4 amostras diferentes.

A micrografia abaixo mostrou que a trituração foi um método eficaz na remoção do material depositado sobre as amostras de membranas pois, grande parte do material depositado sobre as mesmas foi removido (Figura 16).

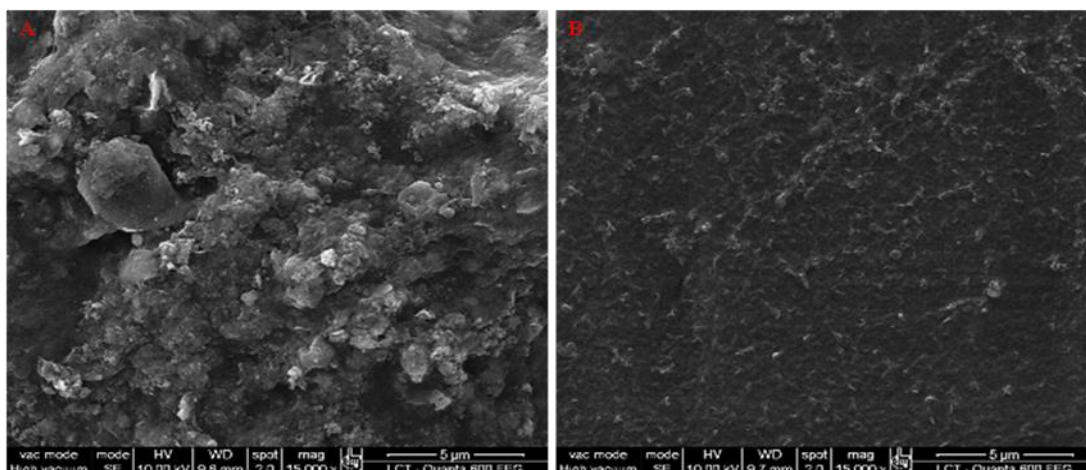


Figura 16 - Micrografias de uma amostra de membrana antes (A) e após a trituração (B).

As micrografias eletrônicas de algumas amostras de membranas mostraram a presença de um *fouling* amorfo (Figura 17A e 17D) e a presença de *biofouling* em outras (Figura 17B e 17C).

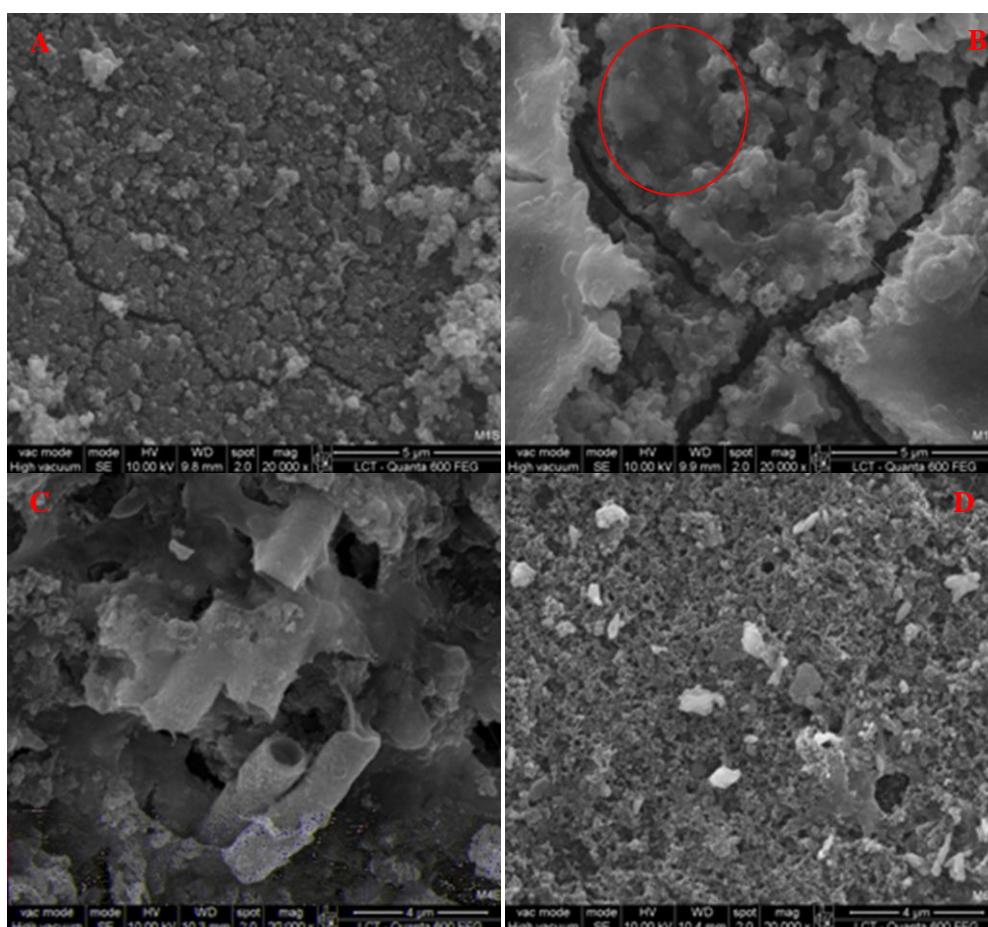


Figura 17 - Aspecto do fouling nas amostras analisadas. O círculo em vermelho na figura 17B indica a presença de biofilmes imersos em EPS.

4.2.4.3 Caracterização do Fouling nos Trinta e Sete Elementos Analisados

4.2.4.3.1 Quantificação de Matéria Orgânica e Inorgânica nos Elementos

As propriedades das camadas de *fouling* dos 37 elementos de osmose reversa colmatados originários de diferentes plantas em operação são mostrados nas figuras 18 e 19. Para facilitar as análises de detecção do *biofouling*, as membranas foram divididas em três grupos, de acordo com a diminuição da proporção de material inorgânico presente nos depósitos (Figura 18A).

As primeiras 12 membranas (grupo 1) mostradas na figura 1A apresentaram depósitos, predominantemente, de origem inorgânica. Os principais elementos químicos presentes (> 20%) foram: silício, ferro e, algumas vezes, alumínio (Figura 18C). Estes elementos, provavelmente, estavam presentes como sílica e silicatos, compostos muito comuns em *fouling* de membranas de osmose reversa.

O grupo 2 foi formado pelos elementos 13 ao 25 e seus depósitos eram formados, majoritariamente, por material inorgânico porém, com quantidades consideráveis de material orgânico (entre 10 e 30% em relação ao peso seco). Silício, ferro e alumínio, também foram os principais elementos encontrados no *fouling* desses elementos, uma exceção foi o elemento 21, apresentando carbonato de cálcio como principal constituinte do depósito deste elemento (Figura 18C).

Os elementos restantes (26 ao 37) formaram o grupo 3, que continham uma significativa proporção de material orgânico presente em seus depósitos (Figura 18A). Os principais elementos químicos presentes no *fouling* destes elementos também foram o ferro, silício e alumínio, com presença ocasional de cálcio (Figura 18C).

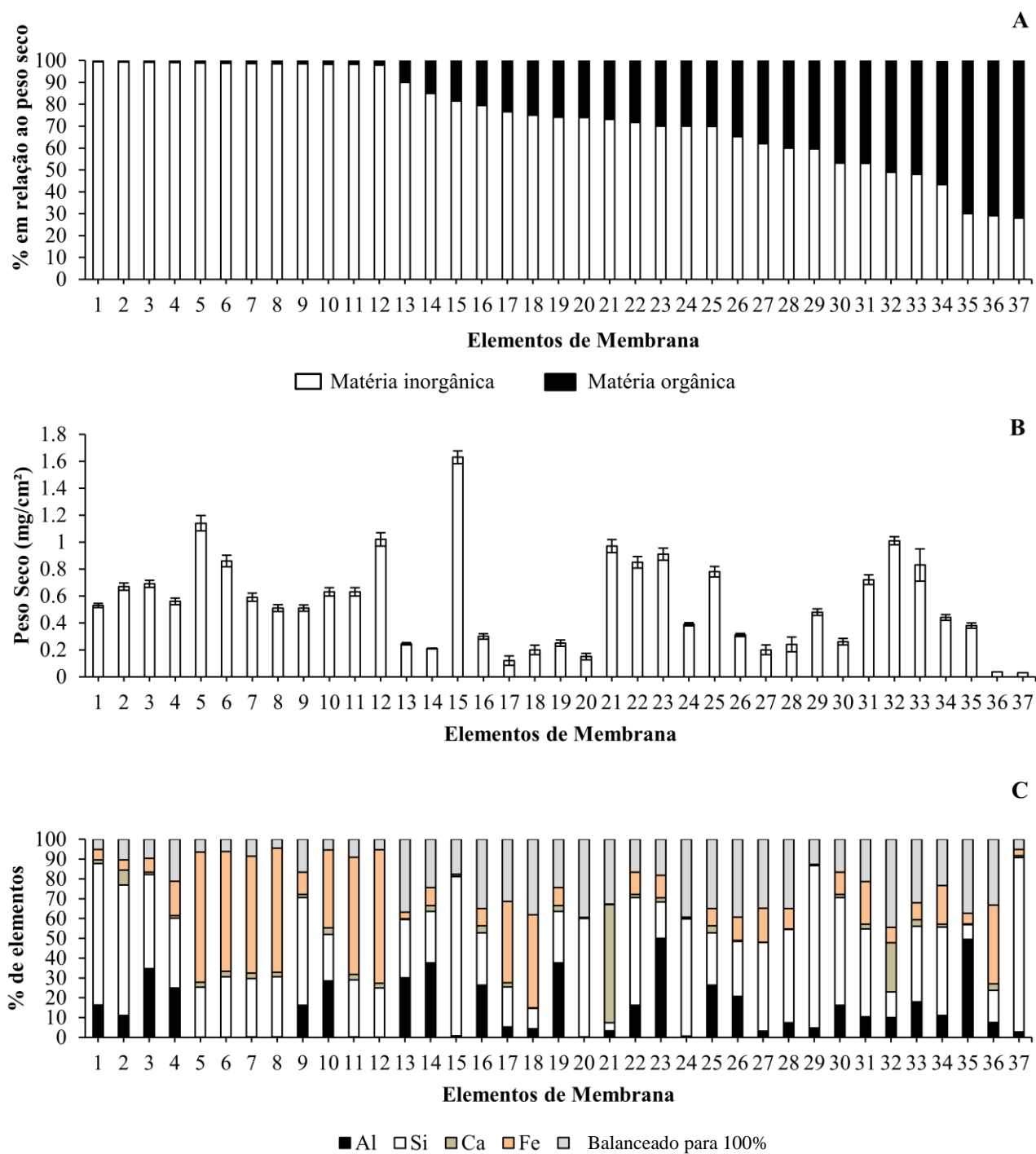


Figura 18 - Proporção de material orgânico e inorgânico (A) e peso seco (B) de 37 elementos de osmose reversa colmatados de plantas em operação e análise de FRX (C).

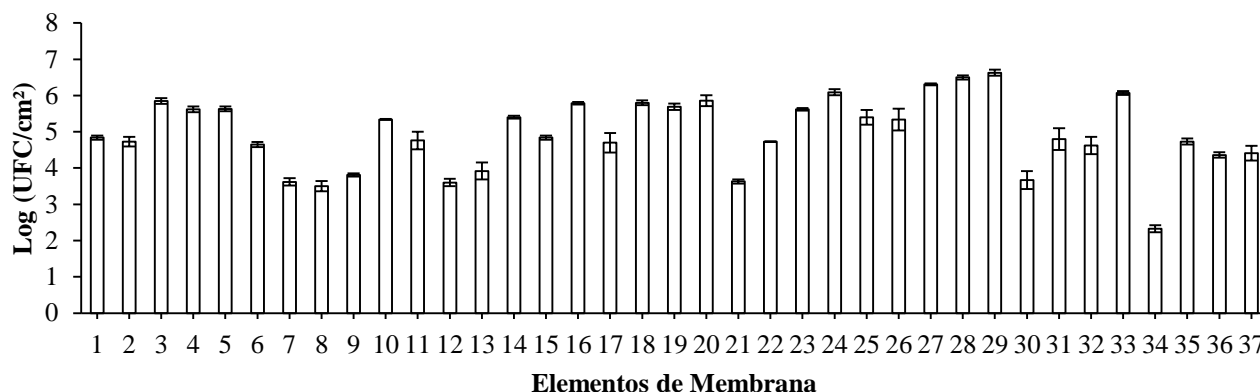


Figura 19 - Contagem de células viáveis (UFC/cm²) na camada de fouling das membranas.

4.2.4.3.2 Biofouling de Membranas

Todos os depósitos de membrana apresentaram um grande número de bactérias viáveis, variando de $2,1 \times 10^2$ UFC/cm² a $4,2 \times 10^6$ UFC/cm² (Figura 19). Membranas com uma maior proporção de material orgânico deveriam apresentar maior número de microrganismos quando comparadas com membranas colmatadas, principalmente, por material inorgânico. Entretanto, as diferenças nos números de células presentes nos três grupos não foram estatisticamente significativas. O grupo 1 apresentou $1,8 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^3$ UFC/cm², o segundo grupo de membranas mostrou um número de viáveis de $3,7 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^3$ UFC/cm² e o grupo 3, $9,2 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$ UFC/cm². Claramente, o número de bactérias viáveis não se mostrou como um bom indicador de *biofouling*.

Biofouling é definido como o crescimento de microrganismos em superfícies de uso industrial, neste caso, a superfície das membranas. O que distingue células planctônicas daquelas presentes em biofilmes é a matriz polimérica extracelular excretada por microrganismos contidos nos biofilmes. De acordo com Flemming e Wingender (2010), a matriz é constituída, basicamente, por carboidratos. Visando investigar a presença de biofilmes na superfície das membranas, proteínas e carboidratos foram quantificados das amostras de membrana (Figura 20).

A presença de proteínas foi detectada na maioria dos depósitos, mas em apenas 11 elementos, elas excederam 10% do peso seco (Figura 20). A análise dos depósitos destes 11 elementos mostrou uma clara correlação positiva entre a quantidade de proteína e o número de bactérias, apresentando uma correlação de Pearson de 0,92 (Figura 21A), sugerindo que, nestes casos, a origem protéica foi devido às células bacterianas. Os carboidratos também foram detectados na maioria dos depósitos, mas em apenas 5 elementos, a quantidade destes compostos excederam os 10% em relação ao peso seco (Figura 20). Como a formação de biofilme deveria

resultar na produção de grande quantidade de carboidratos, a correlação entre estes e bactéria (Figura 21B) assim como quantidade de matéria orgânica e bactéria (Figura 21C) também foi feita, porém não houve correlação em nenhum dos casos (correlação de Pearson de -0,5 e 0,27 respectivamente). Houve alguns depósitos com grande quantidade de carboidratos e pouca proteína, indicando que em muitos casos, os polissacarídeos foram provenientes da água de alimentação e não produzidos por microrganismos do biofilme na superfície das membranas.

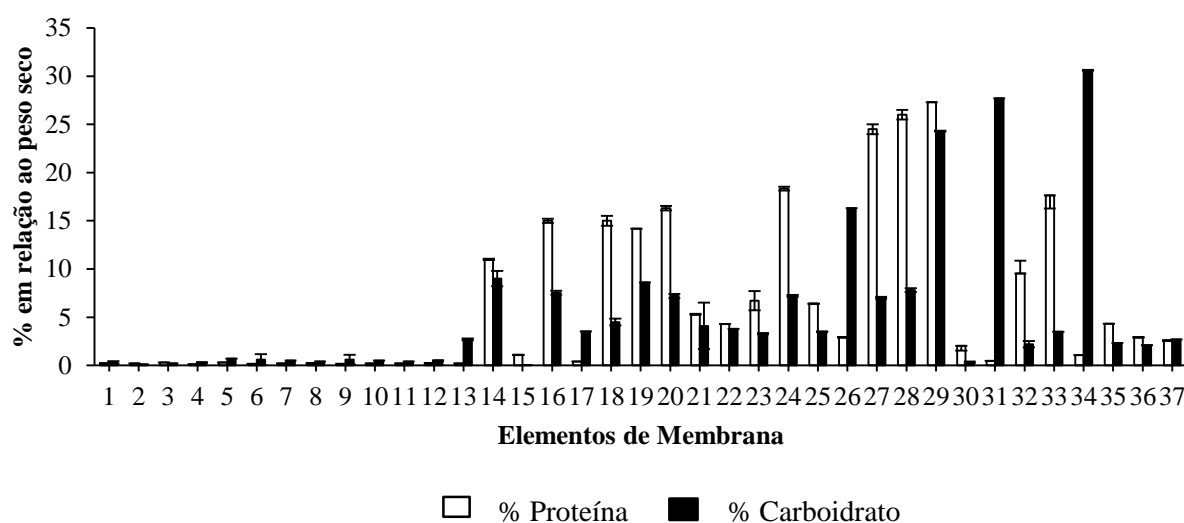


Figura 20 - Proporção de proteínas e carboidratos em relação ao peso seco das camadas de fouling das membranas.

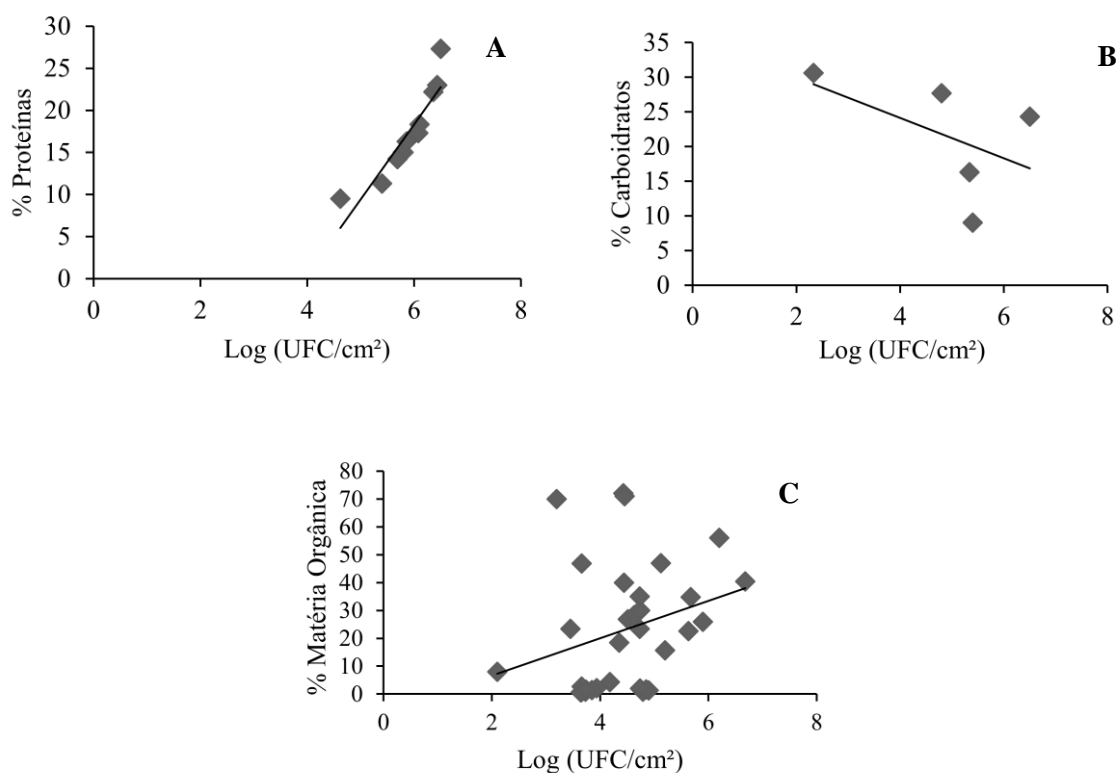


Figura 21 - Relação entre proteínas e log de bactérias viáveis nos depósitos onde a quantidade de proteína excedeu 10% do peso seco (A), entre carboidratos e células viáveis nos elementos onde os carboidratos excederam 10 % do peso seco (B) e entre matéria orgânica e células viáveis nos depósitos (C).

Bactérias viáveis, presentes na água de alimentação de um sistema de membranas, se depositam nas superfícies das membranas durante a operação do sistema. Essas bactérias representam um grande desafio para a autópsia de membranas, pois para a confirmação de *biofouling* como causa da colmatação de uma membrana, é necessário demonstrar que houve um crescimento microbiano (proliferação) nas superfícies dessas membranas. As simples técnicas de enumeração bacteriana, geralmente utilizadas em autópsias de membranas, claramente, não são capazes de diferenciar biofilme bacteriano de bactérias que foram incorporadas na camada de *fouling* pela rejeição da membrana (bactérias que não apresentaram crescimento sobre as membranas).

Em culturas puras de microrganismos, as células geralmente contribuem com menos de 10% do peso seco (Wingender et. al. 2009). A matriz exopolimérica é constituída por uma variedade de biopolímeros excretados pelos microrganismos do biofilme como: polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e substâncias húmicas (Jefferson, 2009). Os polissacarídeos,

entretanto, constituem a maior fração da matriz, com massa molecular variando de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 Daltons (Herzberg et. al. 2009). Grande parte destes carboidratos presentes na matriz são heteropolissacarídeos (constituídos de monômeros de açúcar neutros e carregados). Estes açúcares podem ser modificados por ligantes orgânicos e inorgânicos, que alteram suas propriedades físico-químicas. Os polissacarídeos mais freqüentes em matriz de biofilmes são: alginato, xantana e ácido colânico (Jefferson, 2009).

Análises de polissacarídeos foram feitas para obter um parâmetro para diferenciar células planctônicas que foram incorporadas na camada de *fouling* daquelas que cresceram na superfície das membranas, formando um biofilme. Mesmo com o grande número de bactérias viáveis encontradas nos elementos analisados, a quantidade de carboidratos presentes nas camadas de depósito foi pequena. Culturas puras de biofilmes de *Pseudomonas extremaustralis*, geralmente, apresentam quantidades variando de 2,83 – 3,71 mg/g de carboidratos por peso seco (Herzberg et. al. 2009). Os resultados obtidos nas autópsias de membranas mostraram que a maior parte da população bacteriana presente nas camadas de *fouling*, não era referente a microrganismos oriundos de biofilmes.

É importante considerar que polissacarídeos também podem ser depositados diretamente na camada de *fouling* a partir da água de alimentação. As partículas exopoliméricas transparentes (PET ou TEP em inglês) em sistemas aquáticos, por exemplo, se originam principalmente, de polissacarídeos liberados pelo fitoplâncton. Estas partículas estão presentes em águas marinhas, residuais e superficiais. As PET podem ser particulados (maior que $0,4 \mu\text{m}$) ou coloidais (menor que $0,4 \mu\text{m}$) (LEE et. al., 2015). Segundo experimento conduzido por Villacorte et. al., 2009, a concentração de PET em águas superficiais foi de 0,27 mg/L. Após dois tipos de pré-tratamento, utilizando águas superficiais para alimentação de sistemas de osmose reversa (A: coagulação, filtração rápida em areia, coagulação, ultrafiltração e antiescalante; B: coagulação, ultrafiltração e antiescalante), observou-se uma maior redução de PET no pré-tratamento A ($67,5 \mu\text{g/L}$). Cerca de 30-70% das PET presentes na água de alimentação foram depositadas nas membranas de osmose reversa (Villacorte, 2009).

Além disso, para uma identificação definitiva de biofilmes por análises de polissacarídeos, seria necessário uma caracterização de sua composição e, mais importante, a distribuição de polissacarídeos dentro das camadas de *fouling*. Carboidratos produzidos por microrganismos do biofilme se acumulam ao redor das células em crescimento, enquanto que polímeros de açúcares originários da corrente de alimentação teriam uma composição e distribuição diferentes.

A dinâmica microbiana de depósitos de membrana de osmose reversa precisa ser melhor estudada. Apesar do elevado número de células viáveis encontrado nos elementos analisados, na maioria destas membranas, estas células se acumulariam dentro de um curto período de tempo de operação destas membranas. Não existem dados de monitoramento sobre quantidade de microrganismos presentes em água de alimentação de sistemas de membranas utilizados neste experimento e, dados publicados de bactérias em águas de alimentação foram usados em alguns cálculos básicos. Dreszeret et. al. (2014) relataram um número de 2×10^3 UFC/mL na água de alimentação de uma planta de osmose reversa em Spannenburg – Holanda, pré-tratada por filtração rápida em areia seguido por correção de pH, remoção de dureza (abrandamento por precipitação química utilizando CaO e Na_2CO_3) e uma segunda filtração rápida em areia. Laxman et. al. (2015) relataram uma quantidade de bactéria de 3×10^4 UFC/mL em água de poço. Assumindo que as membranas foram operadas com um fluxo de 17 L/m²h para águas superficiais e 30 L/m²h para águas de poço, então uma população de 10^6 UFC/ mL se acumularia na superfície das membranas em 19,6 e 11 horas de operação utilizando águas de superfície e poço respectivamente. Todos os sistemas de membranas de osmose reversa operam por um período de tempo muito maior que o tempo necessário para atingir o número de células com água de superfície como alimentação. Por que não ocorre um maior acúmulo de microrganismos nas superfícies das membranas de osmose reversa em operação? Que fatores contribuem para este acúmulo não ocorrer? Uma alternativa seria a difusão de bactérias da camada de *fouling* de volta para a corrente de alimentação por mecanismos inerentes à concentração-polarização (Fish et. al. 2015). Entretanto, para este mecanismo ser eficiente, os organismos planctônicos depositados teriam que manter suas mobilidades individuais depois de serem incorporados na camada de *fouling*, um evento muito pouco provável devido às várias possibilidades de interação adesivas e coesivas entre células e outros compostos como: polímeros dissolvidos e materiais particulados. Outra alternativa para a remoção de células da camada de *fouling* seria a remoção mecânica, causada pela turbulência gerada pela corrente de alimentação. A morte e/ou lise de microrganismos incorporados nos depósitos de membrana também contribuem para a redução do número de células. A frequência que ambos os eventos ocorrem, porém, não é sabida.

Após a observação dos dados obtidos pelas autópsias de membranas e, principalmente, devido ao grande número de bactérias viáveis presentes nos depósitos, por que o *biofouling* não foi o tipo de *fouling* predominante nestes elementos, já que havia muitos microrganismos na superfície das membranas e um ambiente com presença de matéria orgânica (muitas delas biodegradáveis). Estudos de carbono orgânico assimilável em águas de superfície e de poço mostraram que pequenas quantidades de orgânicos biodegradáveis (< 100 µg/L) são necessários

para manter o crescimento de microrganismos heterotróficos (Derlon, 2014). Por que as células viáveis presentes nestas camadas de *fouling* não proliferam rapidamente e produzem biofilmes ricos em matriz polissacarídica? Talvez algum composto químico incorporado seja inibitório? Ou as limitações de difusão previnem o crescimento, apesar da água percolar continuamente através das camadas de *fouling*?

Claramente, o entendimento e o avanço das medidas de mitigação de incrustação biológica requer mais estudos fundamentais sobre os mecanismos de incorporação, retenção, proliferação e inativação de células microbianas em camadas de *fouling*.

4.2.5 Conclusões

Uma análise abrangente dos resultados das autópsias de 37 elementos de membrana de osmose reversa revelou a presença de um grande número de células bacterianas viáveis na maioria das membranas. Na maioria dos casos, essas células não pareciam crescer em biofilmes microbianos. A quantificação de polissacarídeos, nestes casos, não foi um indicador seguro para comprovar a presença de biofilmes microbianos em camadas de *fouling*.

O principal problema em sistemas de osmose reversa é a formação do *biofouling* sobre a superfície das membranas, porém, a formação destas estruturas em sistemas reais em operação parece diferir dos biofilmes de cultura pura formados nestas membranas, dificultando sua identificação. A utilização de microrganismos isolados destes elementos de membranas colmatados para a formação de biofilmes de cultura pura seria interessante para verificar se a formação destes seria similar em composição com o que foi encontrado em escala real.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochem.**72, 48-254, (1976).
- DARTON, T.; ANNUNZIATA, U.; DEL VIGO PISANO, F.; GALLEGGO, S. Membrane autopsy helps to provide solutions to operational problems. **Desalination**, v. 167, n. 1-3, p. 239-245, 2004.
- DRESZER, C.; FLEMMING, H-C; ZWIJNENBURG, A.;KRUTHOF, J.C.; VROUWENVELDER, J.S. Impact of biofilm accumulation on transmembraneand feed channel pressure drop: Effects of crossflow velocity, feed spacer and biodegradable nutrient. **Water Res.** 50, 200 – 211 (2014).
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chem.** 28, 350-356, (1956).
- DUDLEY, L.Y.; ANNUNZIATA, U.A.; ROBINSON, J.S.; LATHAM, L.J. Proc. IDA World Congress on Desalination and Water Sciences, Abu Dhabi, 4 (1995) 45.
- FISH, K. E., COLLINS, R., GREEN, N. H., SHARPE, R. L., DOUTERELO, I., OSBORN, A. M., BOXALL, J. B. Characterization of the Physical Composition and Microbial Community.
- FLEMMING, H.C. and WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Rev. Microbiol.** 8, 623-633 (2010).
- HERZBERG, M.; KANG, S.; ELIMELECH, M. Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Biofouling of Reverse Osmosis Membranes. **Environ. Sci. Technol.** 43, 4393–4398 (2009).
- JEFFERSON, K. K. Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends (ed. Ullrich, M.)175–186 (2009).

KARIME, M.; BOUGUECHA, S.; HAMROUNI, B. RO membrane autopsy of Zarzis brackish water desalination plant. **Desalination**, v. 220, p. 258–266, 2008.

LAXMAN, K.; MYINT, M. T. Z.; AL ABRI, M.; SATHE, P.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Desalination and disinfection of inland brackish ground water in a capacitive deionization cell using nanoporous activated carbon cloth electrodes. **Desalination**. 362, 126 – 132 (2015).

LEE, H.; PARK, C.; KIM, H.; PARK, H.; HONG, S. Role of transparent exopolymer particles (TEP) in initial bacterial deposition and biofilm formation on reverse osmosis (RO) membrane. **Journal of Membrane Science**. v. 494, p.25–31, 2015.

PEÑA, N.; GALLEGOA, S.; DEL VIGOA, F.; CHESTERSB, S.P. Evaluating impact of fouling on reverse osmosis membranes performance. **Desalination and Water Treatment**. v.51, p.958–968, 2013.

PONTIÉ, M.; RAPENNE, S.; THEKKEDATH, A.; DUCHESNE, J.; LEPARC, J.; SUTY, H. Tools for membrane autopsies and antifouling strategies in seawater feeds: a review. **Desalination**, v. 181, p. 75-90, 2005.

Structure of Biofilms within a Model Full-Scale Drinking Water Distribution System. *PLOS One*, 10 (2), Article number e0115824 , pp. 1-22 (2015).

VAN DER KOOIJ, D., VISSER, A. HIJNEN, W. A. M. Determining the Concentration of Easily Assimilable Organic Carbon in Drinking Water. *J. AWWA*, 74, 540-545, (1982).

VILLACORTE, L. O.; KENNEDY, M. D.; AMY, G. L.; SCHIPPERS, J. C. The fate of Transparent Exopolymer Particles (TEP) in integrated membrane systems: Removal through pre-treatment processes and deposition on reverse osmosis membranes. **Water Res.** 43, 5039-5052, (2009).

WINGENDER, J., STRATHMANN, M., RODE, A., LEIS, A., FLEMMING, H.-C. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods Enzymol.** 336, 302–314 (2001).

5.3 **CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE BIOFILMES DE CULTURA PURA ORIGINADOS DE BIOFOULING DE MEMBRANAS DE OSMOSE REVERSA COLMATADOS**

5.3.1 **Introdução**

5.3.1.1 *Biofouling em Sistemas de Membranas*

Um dos problemas operacionais mais sérios em sistemas de membranas é o *biofouling*. Este é definido como uma acumulação indesejável de microrganismos que pode ocorrer pela deposição, crescimento e metabolismo de células bacterianas ou flocos na superfície das membranas. As sequências consideradas na formação dos biofilmes incluem: alteração da superfície pela formação de um filme condicionante (macromoléculas, proteínas, etc..), adesão de células pioneiras planctônicas nas superfícies das membranas, formação de microcolônias por bioadesão primária e desenvolvimento de um biofilme maduro (Watnick; Kolter, 2000). Biofilmes podem ou não cobrir uniformemente o substrato, consistindo de uma ou mais camadas de microrganismos vivos ou mortos associados a produtos extracelulares. Bactérias acumulam nas membranas por dois processos: adesão (bioadesão e bioadsorção) e crescimento (Figura 22). O processo de bioadesão irá depender das propriedades dos microrganismos, da solução e da superfície (Ivnitsky et al., 2005).

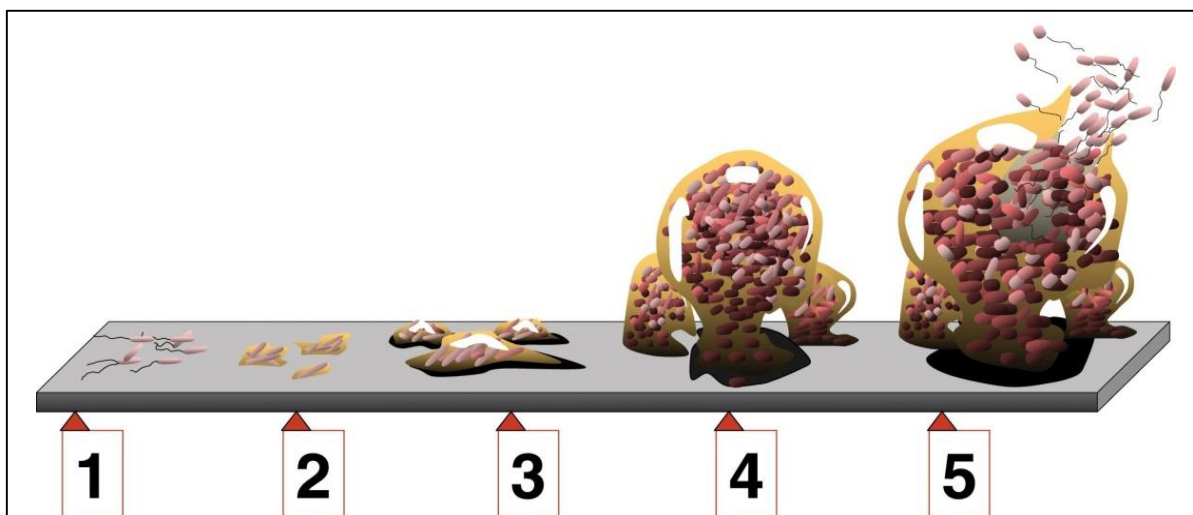


Figura 22 - 1 – Adesão inicial a uma superfície com filme condicionante; 2 – adesão irreversível; 3 e 4 – Maturação (com produção de EPS); 5 – Dispersão.

Fonte: Monroe (2007).

O crescimento de biofilmes está relacionado a uma fonte disponível de nutrientes. Microrganismos tendem a aderir em superfícies e crescer a partir do consumo de nutrientes captados da fase aquosa em contato com a superfície. Esses nutrientes englobam a fração de

matéria orgânica que a bactéria pode assimilar (FLEMMING et al., 1997), denominada Carbono Orgânico Assimilável (Assimilated Organic Carbon - AOC).

Em situações, nas quais os nutrientes são abundantes e/ou quando não há um agente antimicrobiano residual, as bactérias tendem a crescer e a produzir EPS, que constitui a principal causa da colmatção das membranas.

Considerando a conformação estrutural de sistemas de membrana espiral e as condições da superfície durante a fase de operação, os elementos de membrana oferecem condições para a adesão, acumulação e crescimento de microrganismos, tendo em vista que o ambiente na superfície de separação é confinado, com alta concentração de nutrientes e o estreito canal formado entre as folhas de membrana permitem apenas um fluxo tangencial com baixa velocidade (0.1 m/s) com turbulência limitada (AL-AHMAD et al., 2000).

Em resumo, uma célula bacteriana viável aderida na superfície da membrana, a camada de concentração-polarização com elevada concentração de nutrientes e as regiões de baixa turbulência, são fatores determinantes para a formação do *biofouling* (VROUWENVELDER, 2009).

O *Biofouling* demonstra ser um fenômeno de controle mais complexo quando comparado com outros tipos de *fouling* devido as suas particularidades, tendo em vista a capacidade que microrganismos têm de se multiplicar rapidamente, bem como fenômenos de transporte que auxiliam os microrganismos na colonização de outras superfícies. Mudanças nas concentrações de nutrientes, nas forças de cisalhamento, na temperatura, ou outros fatores ambientais, podem causar o desprendimento (*Sloughing*) de biofilmes, que levam ao aumento da contaminação da água e subsequente colonização de outras superfícies (VEZA et al., 2008).

A formação de *biofouling* em membranas pode ser influenciada pelas propriedades da superfície da membrana (hidrofobicidade, carga e rugosidade), propriedades químicas da água de alimentação (pH, força iônica e tipos de eletrólitos), propriedades da suspensão microbiana (tamanho, número e tipo de microrganismos), bem como parâmetros hidrodinâmicos (permeação e fluxo tangencial) (VEZA et al., 2008). Conforme apresentado nos trabalhos de Rijnaarts et al. (1999) e Morisaki; Tabuchi (2009), as forças repulsivas eletrostáticas existentes entre bactérias e superfícies diminuem à medida em que a concentração iônica do meio é aumentada.

A adesão de uma bactéria a uma superfície acontece em duas etapas: primeiro ocorre a adsorção reversível, quando a bactéria que se encontra no mínimo secundário consegue superar as forças repulsivas entre elas e a superfície. Na segunda etapa ocorre a adesão, que constitui uma interação permanente que envolve grande quantidade de energia. A adesão ocorre quando

polímeros secretados pelas bactérias formam pontes que conectam as bactérias às superfícies (STEVIK; AUSLAND; HANSSSEN, 2004).

Estudos têm demonstrado que a diminuição na dupla camada de repulsão eletrostática e o aumento na taxa de produção de permeado contribuem para um aumento na taxa de deposição de células microbianas sobre a membrana. Por exemplo, altas taxas de recuperação, rejeição de sais, concentração polarização, hidrofobicidade e rugosidade da membrana, são fatores correlacionados com altas taxas de deposição. Desta forma, membranas de osmose reversa retêm um maior número de células microbianas por unidade de tempo do que membranas de nanofiltração, não só porque membranas de osmose reversa são mais hidrofóbicas e rugosas, mas porque o fenômeno de concentração-polarização pode ser mais severo (SUBRAMANI; HOEK, 2008).

De acordo Nielsen e Jahn (1999) os componentes de um biofilme são a biomassa celular e as substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Em todos os biofilmes, a fração de EPS é predominante, constituindo de 50-80% da matéria orgânica total e proteínas. O EPS é o material de construção de agregados microbianos como os biofilmes e os flocos de lodo ativado. A presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos indica que o EPS é anfótero. A formação de áreas hidrofóbicas no EPS pode ser benéfica na adsorção de poluentes orgânicos, assim como, na redução do *fouling* (GUO et al., 2012).

O EPS é constituído de diferentes classes de macromoléculas orgânicas como: polissacarídeos, proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos, lipídeos e outros componentes poliméricos. São encontrados fora das células, em suas superfícies e nos espaços intercelulares entre elas. Normalmente, polissacarídeos e proteínas são as maiores frações que contribuem para a formação do *fouling*; devido a isto, a determinação da concentração de EPS é realizada pela aferição da concentração de proteínas e carboidratos. Geralmente, os carboidratos são mais hidrofílicos que as proteínas, contribuindo, em maior parte, na formação de *fouling* (Li et al., 2012).

Em sistemas de osmose reversa, o *biofouling* pode influenciar na performance das membranas, aumentando a queda de pressão ao longo dos elementos (alimentação-canal do concentrado), diminuindo a permeabilidade das membranas e, algumas vezes, aumentando a passagem de sais para o canal de permeado (Vrouwenvelder et al., 2010).

Geralmente, *biofouling* em sistemas de nanofiltração e osmose reversa pode ser prevenido por: redução na concentração de microrganismos e/ou redução da concentração de nutrientes por pré-tratamentos e limpeza química. A combinação destes dois meios de prevenção pode ser o melhor caminho na prevenção da formação de *biofouling* (GUO et al., 2012).

5.3.2 Objetivos

Verificar se biofilmes de cultura pura, obtidos de bactérias contidas em biofilmes de membranas de osmose reversa colmatadas, apresentam um padrão de crescimento e produção de EPS similares aos encontrados em *biofouling* de elementos reais em operação.

5.3.3 Materiais e Métodos

5.3.3.1 Amostras de Membranas

As amostras utilizadas no experimento foram obtidas de um elemento de osmose reversa novo (Modelo: RE-70-1812) (Figura 23). Foram montadas células de fluxo contendo estas amostras para a montagem do sistema utilizado no experimento (Figura 24).



Figura 23 - Elemento de osmose reversa novo (A) utilizado para obtenção de amostras (B).



Figura 24 - Duas células de fluxo montadas com amostras de membranas limpas dentro.

5.3.3.2 Sistema para Crescimento de Biofilme de Cultura Pura

Após a montagem das células de fluxo, estas foram conectadas a um reservatório contendo meio de cultura definido (glicose 1 g/L; dihidrogenofosfato de amônio 5 g/L; bifosfato de potássio 1 g/L; cloreto de sódio 5 g/L e sulfato de magnésio 0,2 g/L) para a formação de

biofilme de cultura pura sobre as amostras de membrana. Para cada bactéria inoculada para a formação do biofilme, foram utilizadas 3 células de fluxo em série (Figura 25).

Antes da rotação do sistema, houve um período de incubação de 12 horas a 37 °C em meio definido para cada bactéria. Após este período, iniciou-se a circulação no sistema para o crescimento de biofilme de cultura pura nas amostras de membrana. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

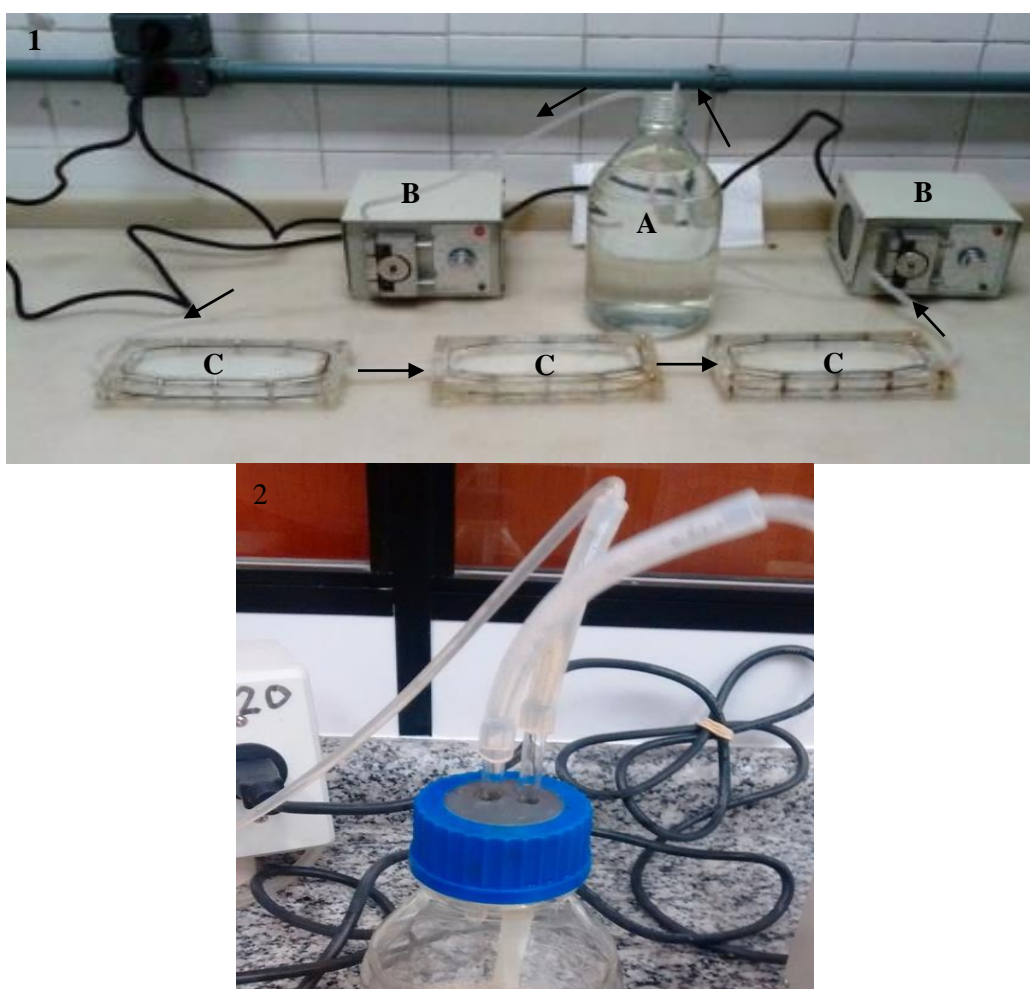


Figura 25 - Sistema montado para o crescimento de biofilme de cultura pura (1). Reservatório (A), bombas peristálticas (B), células de fluxo (C). Vedação do reservatório para evitar contaminação (2).

5.3.3.3 Obtenção e Crescimento de Biofilmes de Cultura Pura nas Amostras

5.3.3.3.1 Isolamento de Bactérias

Três diferentes bactérias foram isoladas de diferentes amostras de membranas de osmose reversa colmatadas utilizadas na indústria. Estas foram processadas e inoculadas em meio LB

ágar (Merck) para crescimento e seleção de diferentes colônias (diferentes cores e formatos). Três diferentes colônias foram isoladas pelo método de esgotamento em placa e incubadas em meio BHI (Merck) para crescimento e posterior conservação das bactérias em freezer (-80 °C). Devido à dificuldade de diferenciação de outras colônias, foi utilizada uma quarta bactéria já isolada (*Pseudomonas Aeruginosa*) de uma aluna de doutorado do laboratório (conservada em freezer -80 °C). Esta bactéria é muito freqüente em sistemas de osmose reversa e muito utilizada em experimentos de biofilme em bancada.

5.3.3.3.2 Extração e Precipitação de DNA Genômico

As colônias foram repicadas em caldo BHI (24h, 37°C). 1,5 mL deste pré-inóculo foi transferido para microtubos e os mesmos foram centrifugados por 2 minutos a 12.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 500 µL de tampão TE. Posteriormente, foi adicionado 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Foi adicionado um volume igual de fenol tamponado-clorofórmio (fenol:clorofórmio:álcoolisolamílico/25:24:1) à amostra de DNA. Estas foram agitadas vigorosamente em vórtex por 20 segundos e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente para separar as fases. Com uma pipeta, o sobrenadante foi removido e transferido para um novo tubo. Foi então adicionado um volume igual de clorofórmio (clorofórmio:álcoolisoamílico/24:1), e procedeu-se como descrito para a adição de fenol. Os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, cuidadosamente removido e transferido para um novo tubo. Ao volume final foi adicionado 1/10 do mesmo de acetato de sódio 3M pH 5 e 2 volumes de etanol 100%. Os tubos foram invertidos para homogeneização. As amostras foram precipitadas no gelo seco por 5 minutos ou a -80°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Os tubos foram secos em estufa 37°C por 30 minutos. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e depois purificado por kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega, Madison, USA).

5.3.3.3.3 PCR com primer universal (Adaptado de RAJI et al. 2008)

O DNA purificado serviu como molde para a reação de PCR utilizando-se os *primers* genéricos 27 F (5´- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3´) e 1492 R (5´- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3´). A reação foi efetuada com os seguintes componentes (volume total da reação de 25µL): tampão (100 mM Tris-HCl pH 8,8 e 500 mM KCL 0.8%; 1x), MgCl₂ (2,5 mM),

dNTP's (0,25 mM), *primers* (0,4 μ M cada) e Taq polimerase (Sinapse Inc, São Paulo, SP, Brasil; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 49 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 3 minutos (sendo que os passos 2, 3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C. O produto final do PCR foi analisado em gel de agarose 1%, fotodocumentado sob luz UV e analisado com o programa *ScientificImages Systems 1D 3.6* (Kodak, São José dos Campos, S.P., Brasil). O DNA amplificado foi novamente purificado (GeneJET PCR Purification Kit-Fermentas, Lituânia) e utilizado na reação de sequenciamento.

5.3.3.3.4 Sequenciamento das Amostras

As amostras foram encaminhadas para o Instituto de Biociências da USP (departamento de Genoma Humano) para seqüenciamento. As três espécies bacterianas identificadas foram: *Bacillus anthracis* (anexo 1), *Bacillus cereus* (anexo 2), *Bacillus thuringiensis* (anexo 3). Cada espécie obtida, mais a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, foi utilizada para o crescimento de cultura pura de biofilme nas amostras de membrana limpas.

5.3.3.4 Biofouling (Análises)

Para cada microrganismo utilizado no crescimento de biofilme nas amostras de membrana, um período de três semanas foi utilizado para cada experimento. Cada experimento foi feito em duplicata e incluiu os seguintes procedimentos:

- Após a primeira semana, uma das três células de fluxo foi retirada do sistema da figura 25 e foram feitas as seguintes análises: peso seco, quantificação de matéria orgânica, quantificação de proteínas e açúcares e quantificação de viáveis.
- No final da segunda semana, a segunda célula de fluxo foi retirada para as análises de peso seco, quantificação de matéria orgânica, quantificação de proteínas e açúcares e quantificação de células viáveis.
- Após a terceira semana, a última célula de fluxo foi retirada para realização das análises feitas nas demais amostras.

Todas as amostras foram trituradas em liquidificador na potência máxima por 3 minutos e peneiradas (abertura de 75 μ m) para retenção dos fragmentos de membranas antes da realização das análises.

5.3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca FEI, modelo Quanta 600 FEG, para uma visualização mais detalhada da formação de biofilme nas amostras após 7, 14 e 21 dias em contato com meio de cultura definido.

5.3.4 Resultados e Discussão

5.3.4.1 Formação de Biofilmes nas Amostras de Membrana

5.3.4.1.1 Desprendimento de Biofilmes (Sloughing)

Durante as três semanas em que o sistema ficou em operação para cada cultura microbiana, foi observada a formação de uma grande quantidade de biofilmes formados. Nas duas últimas semanas de circulação, frequentemente, observou-se o desprendimento de biofilmes nas amostras (Figura 26).

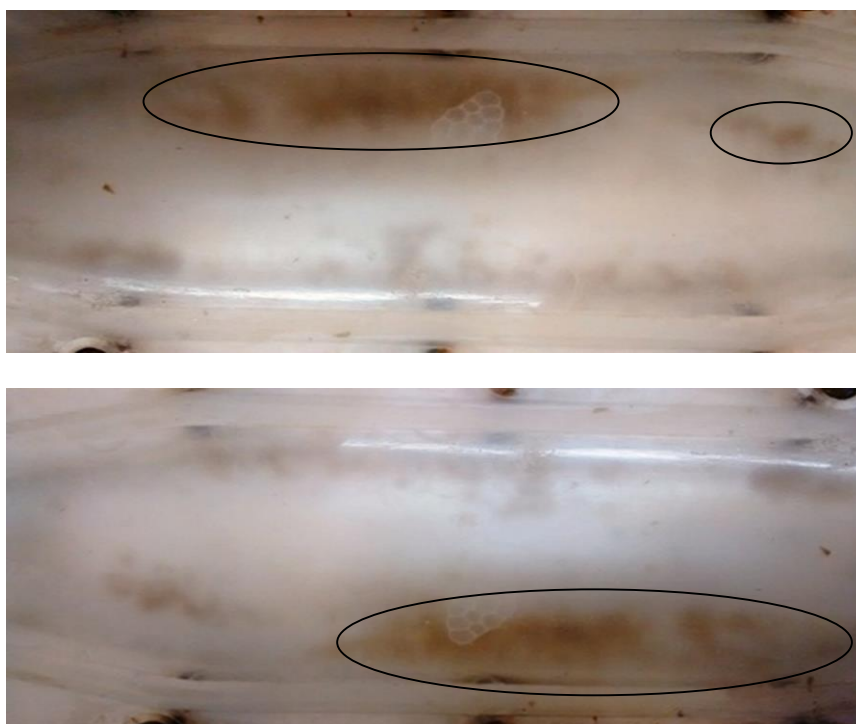


Figura 26 - Formação de grande quantidade de biofilme em todas as culturas circuladas no sistema (elipses pretas).

5.3.4.1.2 *Bacillus anthracis*

Após inoculação em meio de cultura definido e circulação no sistema, foi observada a formação de biofilmes nas amostras de membranas (Figura 27). As micrografias mostraram um aumento nítido na produção de EPS e no número de bactérias com o tempo.

As análises dos biofilmes formados nos diferentes tempos mostraram uma predominância de matéria orgânica (média de 71,7%), sendo grande parte constituída por carboidratos (média de 24,5%) e proteínas (média de 19,36%) (Tabela 4). De acordo com a tabela 4, o número de células viáveis aumentou com o tempo.

Foi observada uma correlação forte entre o aumento na quantidade de proteínas e no número de células viáveis (correlação de Pearson de 0,79), e uma correlação muito forte entre a quantidade de carboidratos com o número de viáveis (correlação de Pearson de 0,9). Já em relação à quantidade de material orgânico, não foi observado correlação com o aumento de células viáveis (correlação de Pearson de -0,01) (Figura 28).

Tabela 4 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (*Bacillus anthracis*) em diferentes períodos.

Amostras	Peso Seco (mg/cm²)	% Matéria Orgânica	% Carboidratos	% Proteínas	Células Viáveis (UFC/cm²)*
1 ^a semana	0,4 ± 0,029	71,9 ± 0,2	19,3 ± 0,37	17,4 ± 0,64	1,06 x 10 ⁷
2 ^a semana	0,5 ± 0,01	71,0 ± 4,6	21,9 ± 0,51	20,5 ± 0,61	9,58 x 10 ⁷
3 ^a semana	0,6 ± 0,02	72,2 ± 2,4	32,2 ± 0,04	20,2 ± 1,41	4,04 x 10 ⁸

* Desvio padrão ± 15%

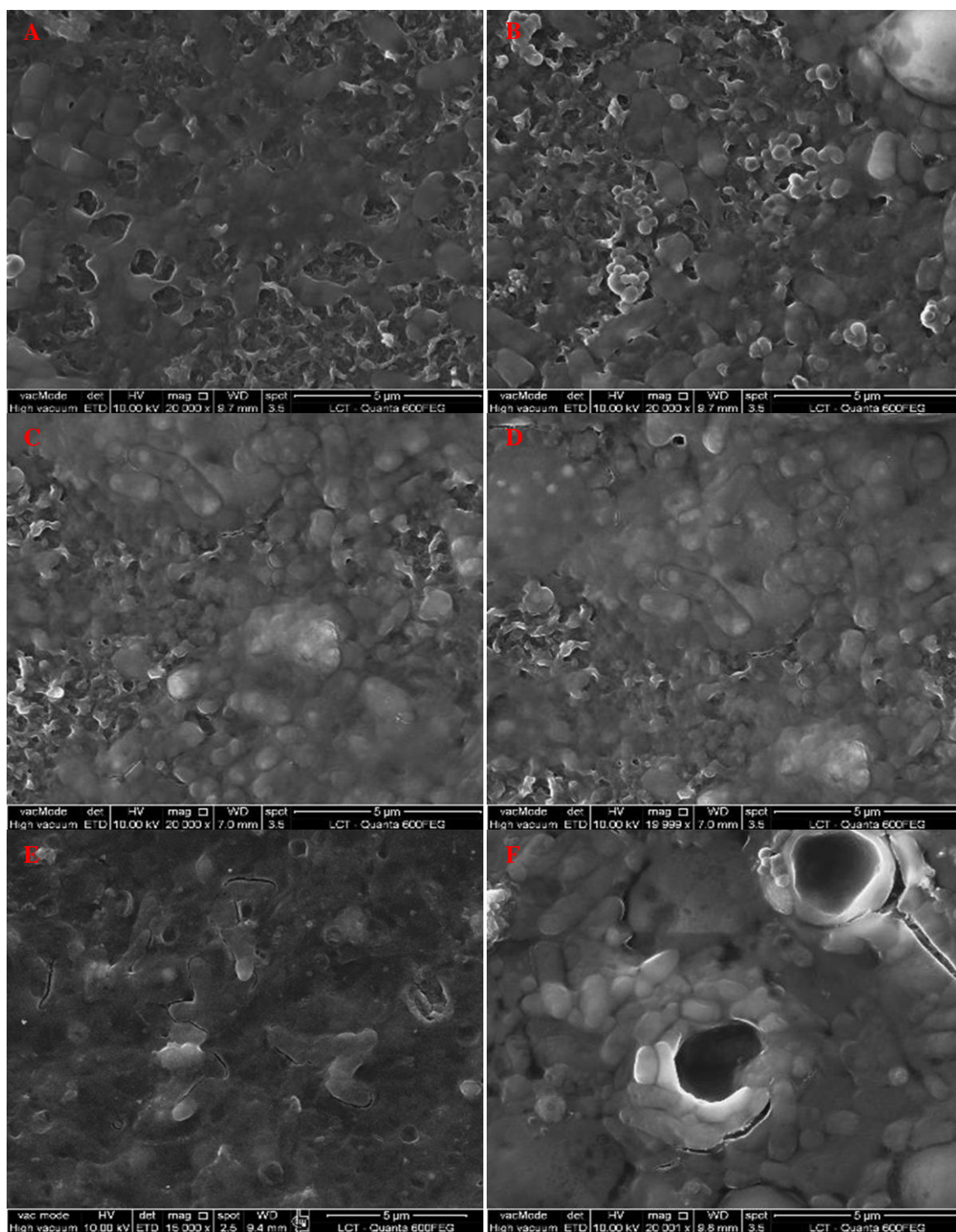


Figura 27 - Crescimento de *Bacillus anthracis* nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).

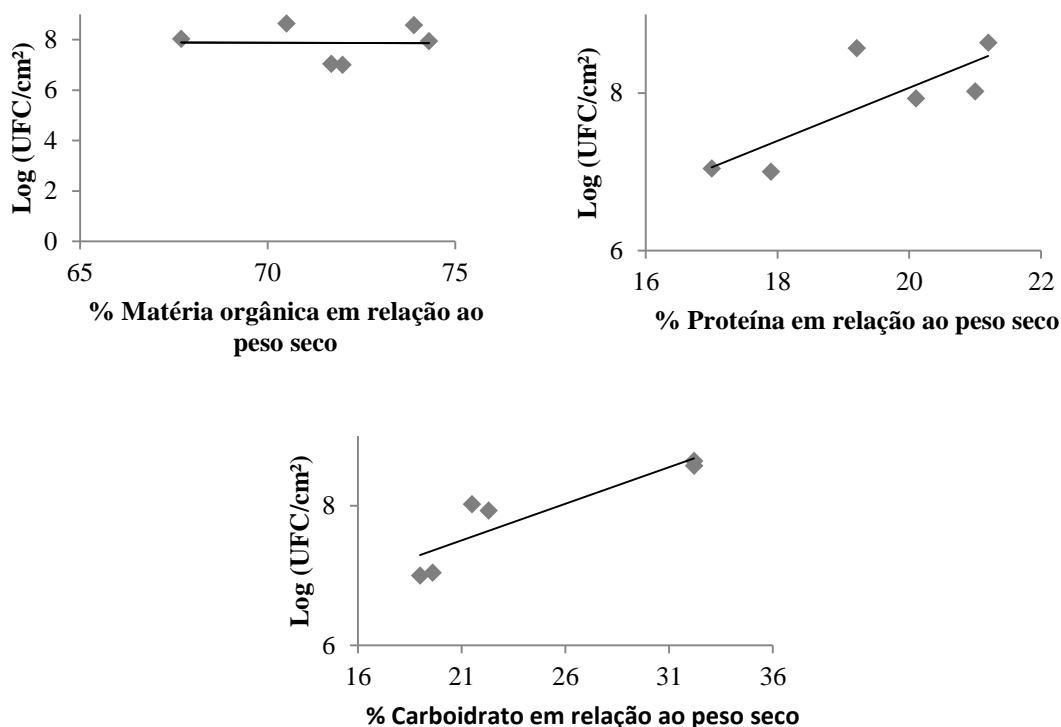


Figura 28 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilmes de *Bacillus anthracis*.

5.3.4.1.3 *Bacillus cereus*

Após inoculação em meio de cultura definido e circulação no sistema, foi observada a formação de biofilmes nas amostras de membranas (Figura 29). As micrografias mostraram um aumento nítido na produção de EPS e no número de bactérias, principalmente, na terceira semana.

As análises dos biofilmes formados nos diferentes tempos mostraram uma predominância de matéria orgânica (média de 69,2%), sendo grande parte constituída por carboidratos (média de 14,9 %) e proteínas (média de 14,7 %) (Tabela 5). De acordo com a tabela 5, o número de células viáveis aumentou com o tempo.

Foi observada uma correlação forte entre o aumento na quantidade de proteínas e carboidratos com o aumento no número de viáveis (correlação de Pearson de 0,83 e 0,70 respectivamente). Já em relação à quantidade de material orgânico, não foi observado correlação com o aumento de células viáveis (correlação de Pearson de 0,14) (Figura 30).

Tabela 5 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (*Bacillus cereus*) em diferentes períodos.

Amostras	Peso Seco (mg/cm²)	% Matéria Orgânica	% Carboidratos	% Proteínas	Células Viáveis (UFC/cm²)*
1 ^a semana	0,3 ± 0,01	69,0 ± 2,3	12,7 ± 2,8	12,3 ± 0,3	7,85 x 10 ⁵
2 ^a semana	0,3 ± 0,03	68,5 ± 0,3	12,9 ± 1,1	14,7 ± 1,5	4,15 x 10 ⁶
3 ^a semana	0,5 ± 0,02	70,2 ± 2,3	19,3 ± 0,4	17,1 ± 0,9	9,25 x 10 ⁶

* Desvio padrão ± 15%

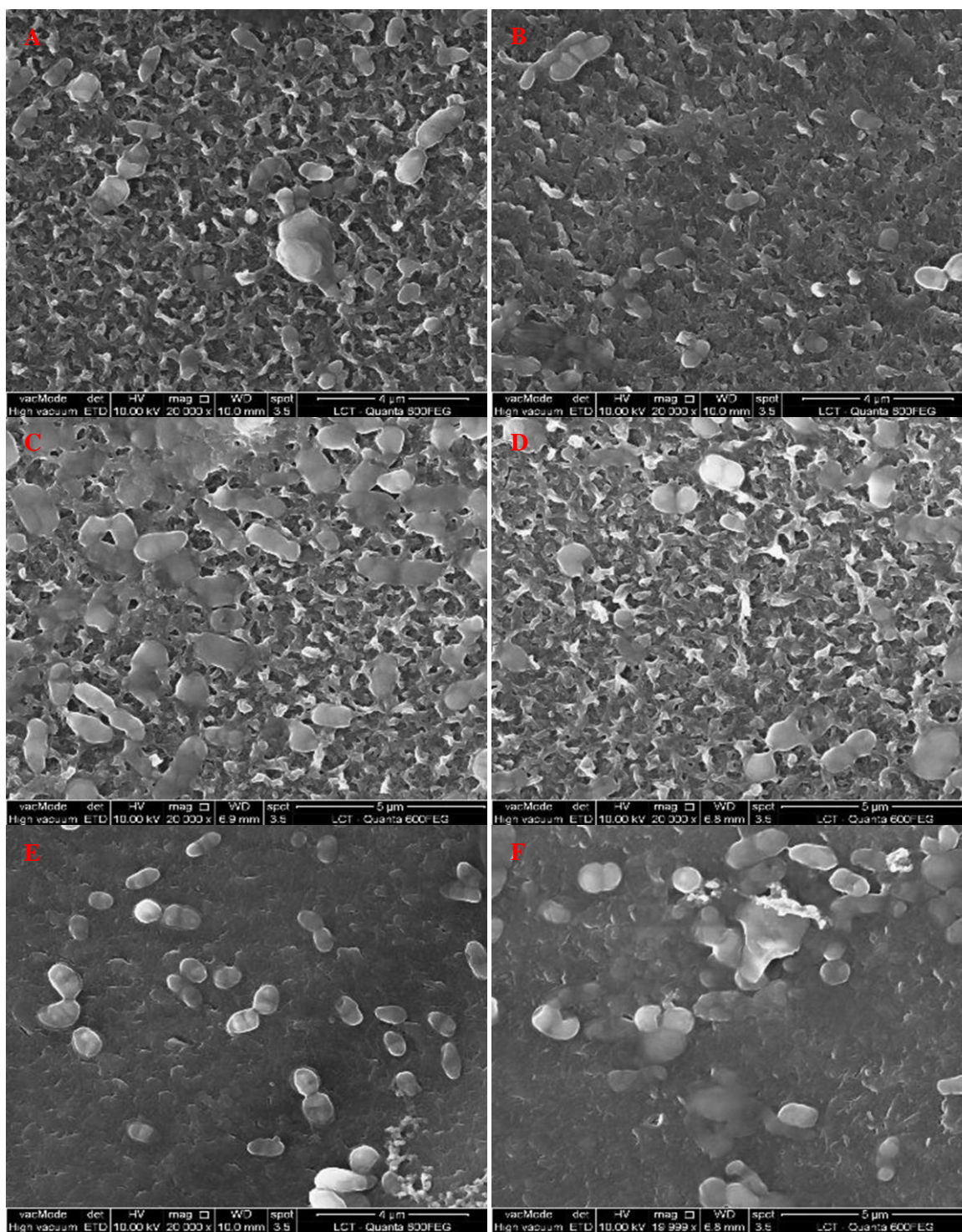


Figura 29 - Crescimento de *Bacillus cereus* nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).

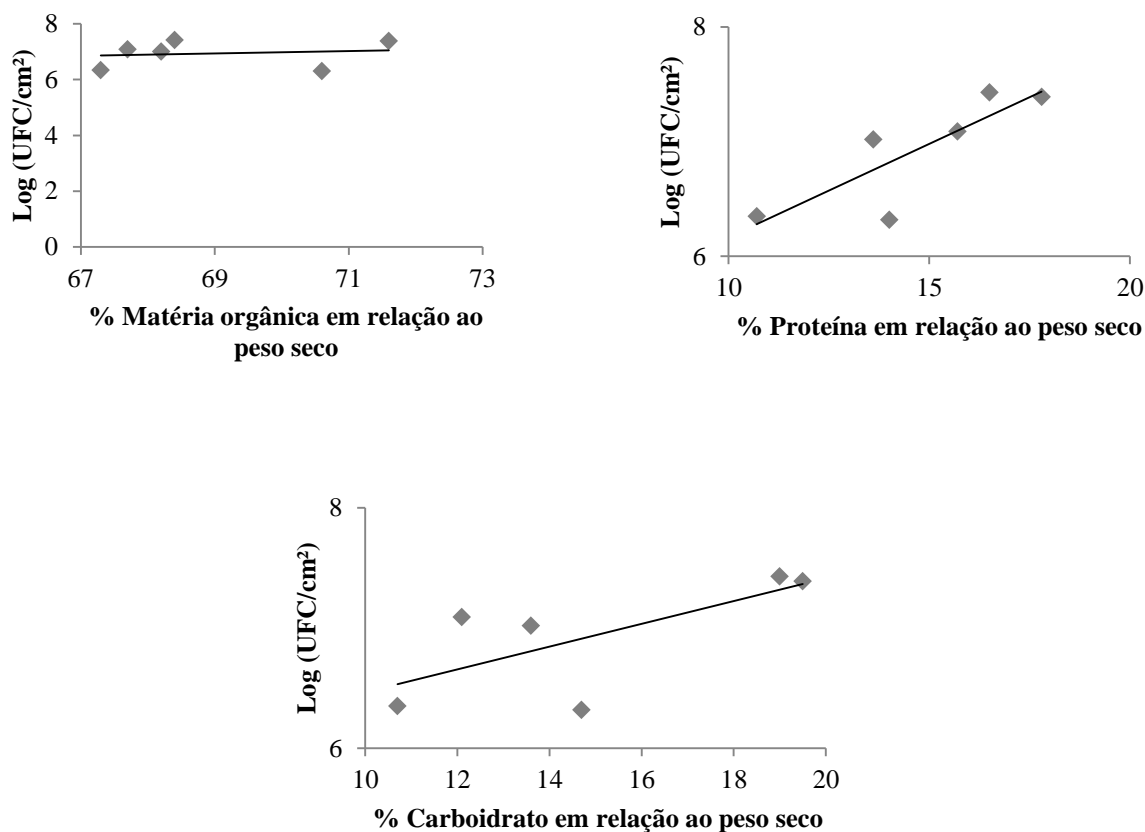


Figura 30 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilme de *Bacillus cereus*.

5.3.4.1.4 *Bacillus thuringiensis*

Após inoculação em meio de cultura definido e circulação no sistema, foi observada a formação de biofilmes nas amostras de membranas (Figura 31). As micrografias mostraram uma grande produção de EPS logo na primeira semana de circulação no sistema e uma grande quantidade de bactérias.

As análises dos biofilmes formados nos diferentes tempos mostraram uma predominância de matéria orgânica (média de 63,4 %), sendo grande parte constituída por carboidratos (média de 18,53 %) e proteínas (média de 10,0 %) (Tabela 6). De acordo com a tabela 6, o número de células viáveis aumentou com o tempo.

Foi observada uma correlação muito forte entre o aumento na quantidade de proteínas e carboidratos com o aumento no número de viáveis (correlação de Pearson de 0,90 e 0,92 respectivamente). Já em relação à quantidade de material orgânico, foi observada uma correlação forte com o aumento de células viáveis (correlação de Pearson de 0,71) (Figura 32).

Tabela 6 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofimes (*Bacillus thuringiensis*) em diferentes períodos.

Amostras	Peso Seco (mg/cm²)	% Matéria Orgânica	% Carboidratos	% Proteínas	Células Viáveis (UFC/cm²)*
1 ^a semana	0,6 ± 0,01	57,1 ± 7,68	10,9 ± 1,5	7,8 ± 0,35	1,36 x 10 ⁶
2 ^a semana	0,7 ± 0,03	63,4 ± 5,93	17,3 ± 0,8	10,0 ± 0,44	1,13 x 10 ⁷
3 ^a semana	0,8 ± 0,03	69,7 ± 0,37	27,4 ± 0,1	12,2 ± 1,64	2,76 x 10 ⁷

* Desvio padrão ± 15%

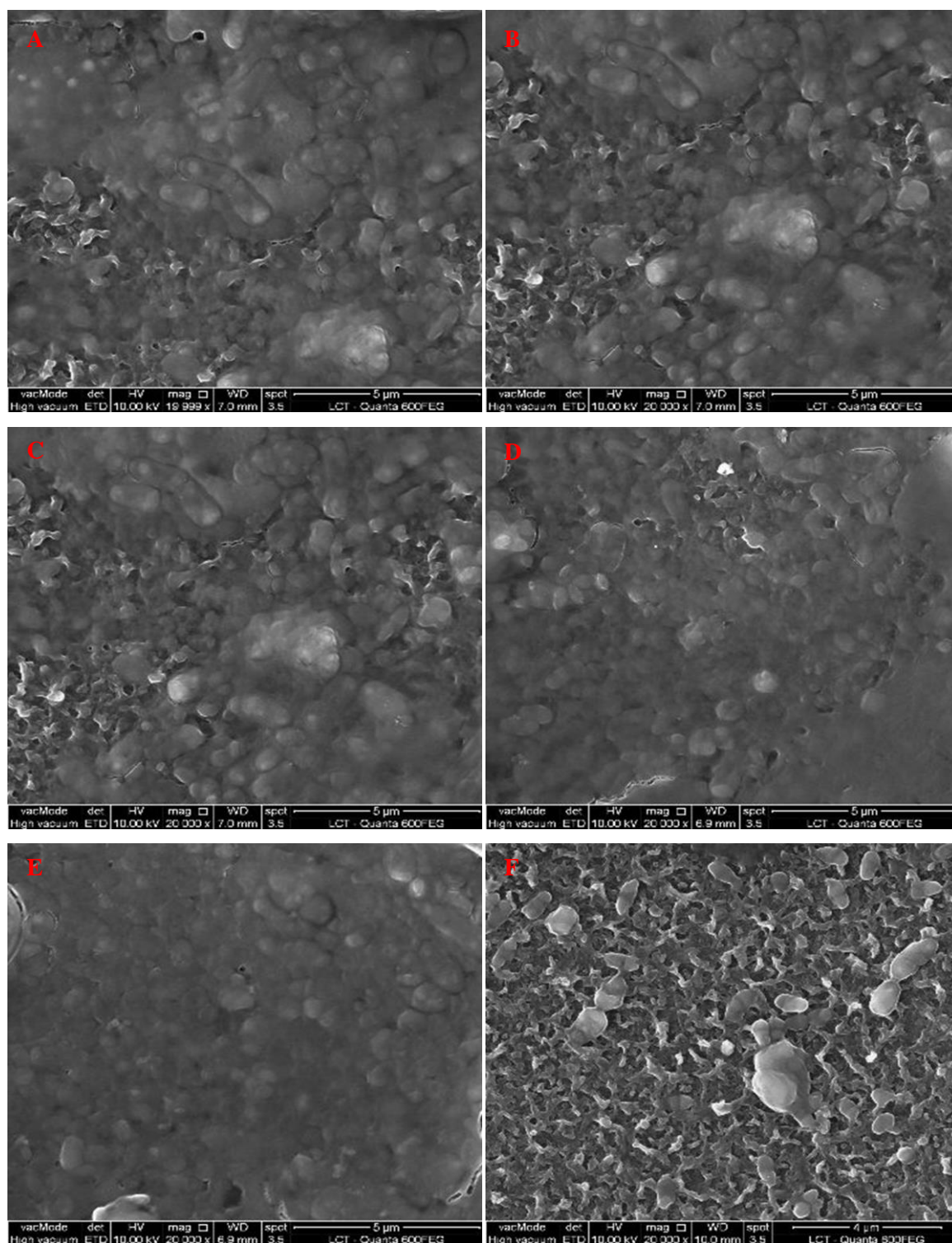


Figura 31 - Crescimento de *Bacillus thuringiensis* nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).

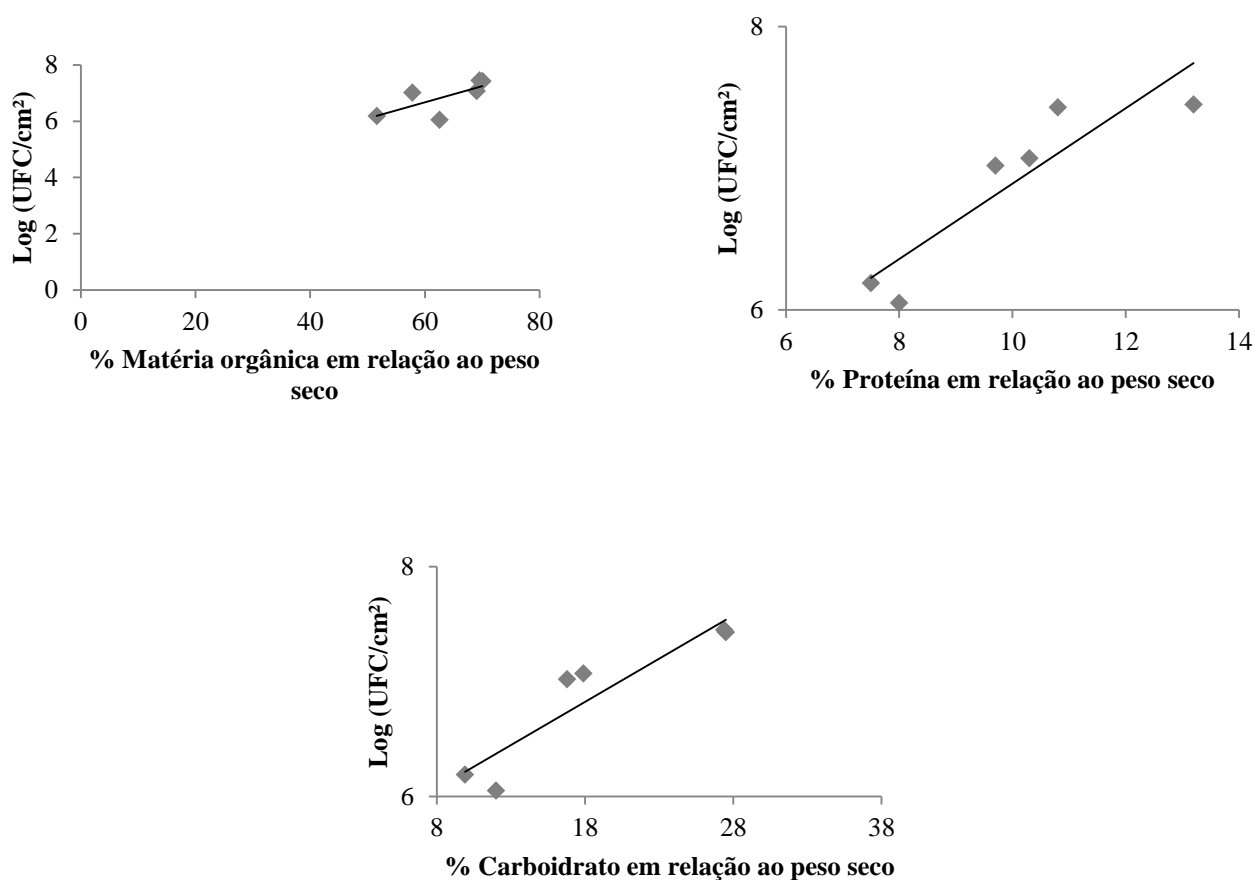


Figura 32 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilme de *Bacillus thuringiensis*.

5.3.4.1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Após inoculação em meio de cultura definido e circulação no sistema, foi observada a formação de biofilmes nas amostras de membranas (Figura 33). As micrografias mostraram, logo na primeira semana, uma grande quantidade de bactérias imersas em uma matriz.

As análises dos biofilmes formados nos diferentes tempos mostraram uma predominância de matéria orgânica (média de 74,0 %), sendo grande parte constituída por carboidratos (média de 17,6 %) e proteínas (média de 14,2 %) (Tabela 7). De acordo com a tabela 7, o número de células viáveis aumentou com o tempo.

Foi observada uma correlação forte apenas entre o aumento na quantidade de carboidratos com o aumento no número de viáveis (correlação de Pearson de 0,84). Já em relação à quantidade de material orgânico e proteínas, não foi observado correlação com o aumento de células viáveis (correlação de Pearson de -0,001 e -0,17 respectivamente) (Figura 34).

Tabela 7 - Peso seco, quantificação de matéria orgânica, carboidratos, proteínas e células viáveis nas amostras de biofilmes (*Bacillus thuringiensis*) em diferentes períodos.

Amostras	Peso Seco (mg/cm²)	% Matéria Orgânica	% Carboidratos	% Proteínas	Células Viáveis (UFC/cm²)*
1 ^a semana	0,4 ± 0,06	74,2 ± 1,41	10,5 ± 0,08	15,2 ± 1,6	1,29 x 10 ⁷
2 ^a semana	0,6 ± 0,04	70,6 ± 1,90	20,4 ± 2,54	12,6 ± 0,9	2,43 x 10 ⁷
3 ^a semana	0,7 ± 0,05	76,9 ± 4,12	22,1 ± 1,60	15,0 ± 1,0	3,22 x 10 ⁷

* Desvio padrão ± 15%

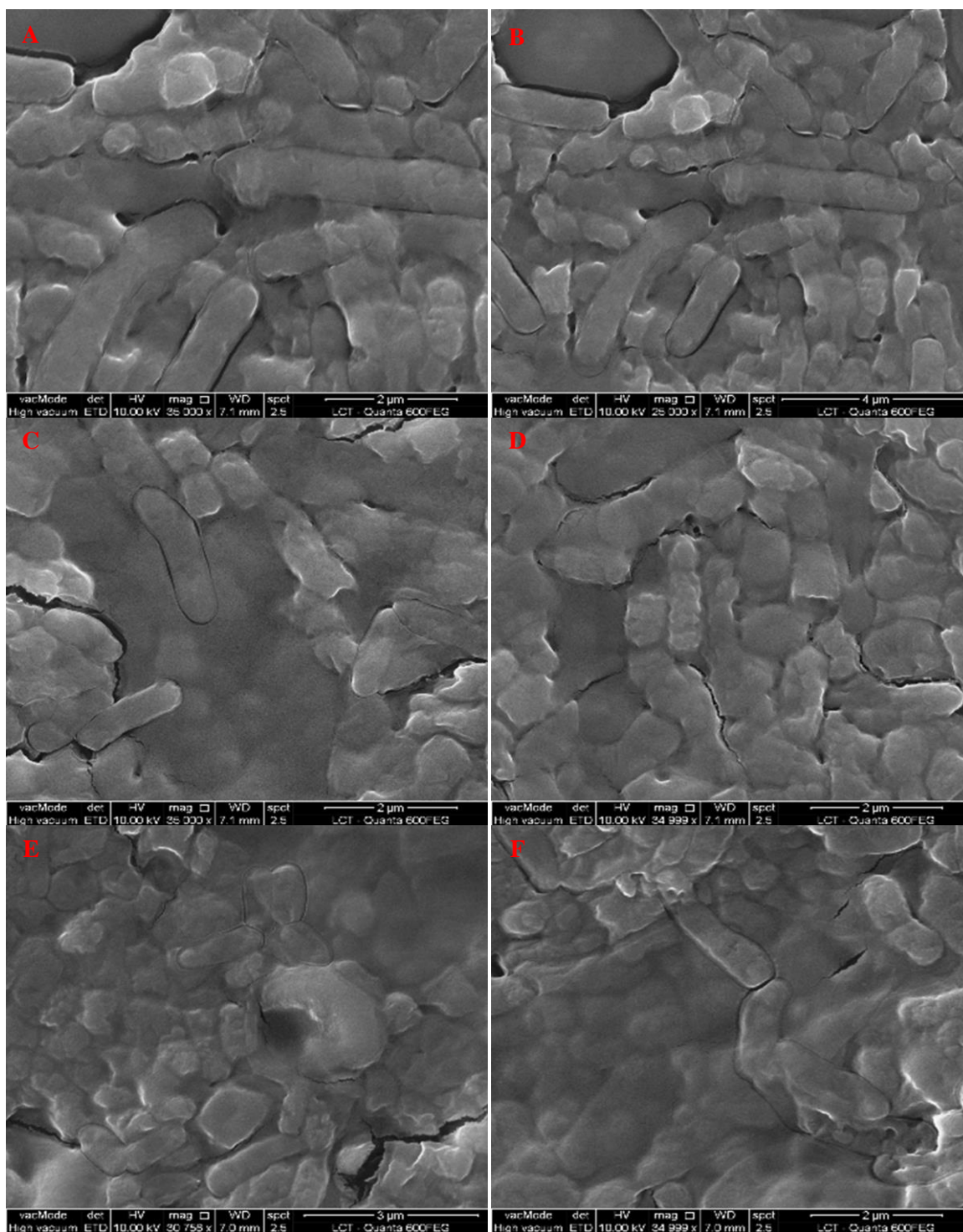


Figura 33 - Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de membranas na primeira semana (A e B), segunda semana (C e D) e terceira semana (E e F).

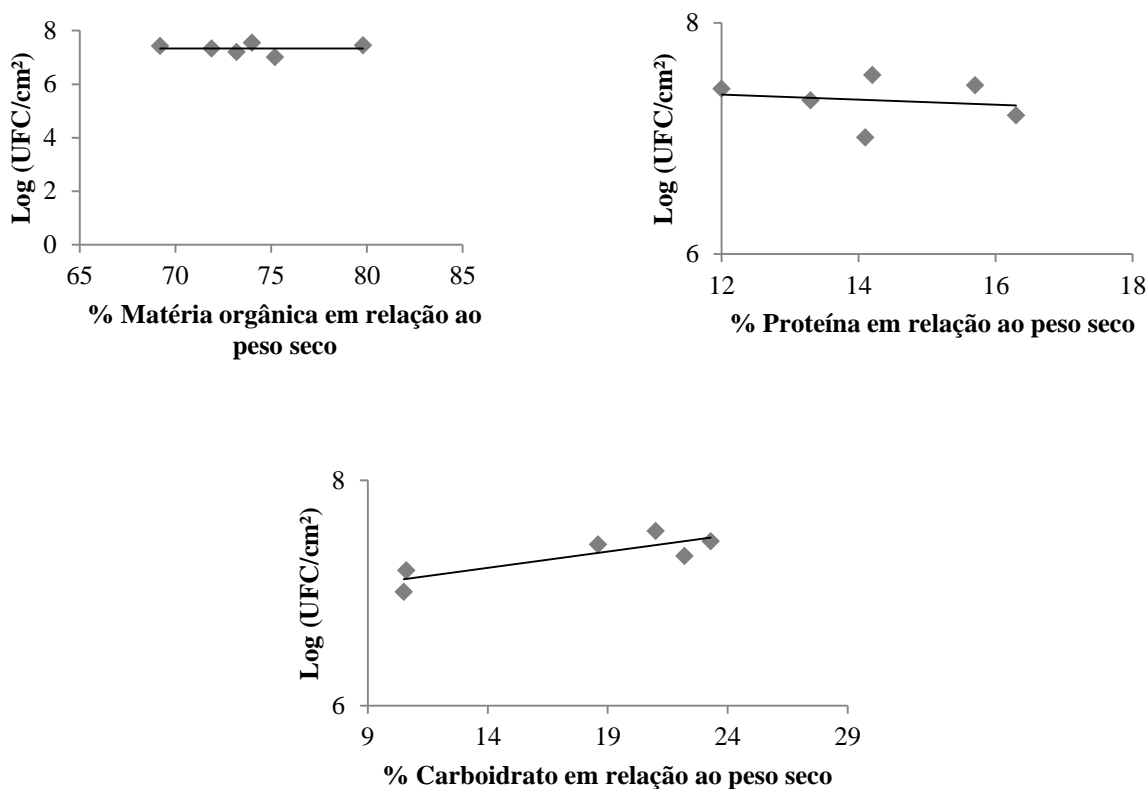


Figura 34 - Gráficos de correlação entre % de matéria orgânica, % de proteínas e % de carboidratos em relação ao log de células viáveis de dados obtidos de análises de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

A formação de biofilme de cultura pura mostrou uma forte correlação entre a quantidade de carboidratos e proteínas com o aumento do número de células e, conseqüentemente, na produção de matriz exopolimérica (exceção dos biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa*, na qual não houve correlação no aumento de proteínas com um aumento de viáveis). A matriz exopolimérica é constituída por uma variedade de biopolímeros excretados pelos microrganismos do biofilme como: polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e substâncias húmicas (Jefferson, 2009). Os polissacarídeos, entretanto, constituem a maior fração da matriz, com massa molecular variando de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 Daltons (Herzberg et al. 2009). Grande parte destes carboidratos presentes na matriz são heteropolissacarídeos (constituídos de monômeros de açúcar neutros e carregados). Estes açúcares podem ser modificados por ligantes orgânicos e inorgânicos, que alteram suas propriedades físico-químicas. Os polissacarídeos mais freqüentes em matriz de biofilmes são: alginato, xantana e ácido colânico (Jefferson, 2009).

Apesar deste experimento ter sido realizado sem permeação, sem pressão da água de alimentação (velocidade de escoamento baixa), configuração diferente de um elemento de osmose reversa e objetivando apenas a formação de *biofouling*, ficou claro que biofilmes formados em sistemas reais em operação diferem, estruturalmente, de biofilmes de cultura pura formados em bancada pois, mesmo apresentando um grande número de células viáveis (média de $4,9 \times 10^5$ de acordo com os resultados apresentados no capítulo 2), a quantidade de proteínas e, principalmente, de carboidratos, que são macromoléculas presentes em maiores proporções na matriz exopolimérica, se manteve baixa em biofilmes formados em sistemas reais de osmose reversa. Já em biofilmes de cultura pura, a quantidade de proteínas e carboidratos, após três semanas, apresentou valores superiores a 10 e 15% em relação ao peso seco respectivamente, em todos os biofilmes (quantidade superior aos biofilmes de sistemas reais). Barnes et. al, (2014) utilizando *Pseudomonas aeruginosa*, mostrou que a quantidade de carboidratos em volume foi equivalente a 40% do volume de células viáveis.

Algumas suposições podem ser feitas para explicar estas diferenças como: a produção de EPS pode ser menor e/ou ocorre maior desprendimento de biofilmes em sistemas reais em operação, devido a uma maior velocidade de escoamento da água (fluxo de 17 L/m²h para águas superficiais e 30 L/m²h para águas de poço) e maior turbilhonamento da água de alimentação (presença de espaçadores de alimentação) nesses sistemas; a quantidade de matéria orgânica assimilável é mais baixa para a formação de biofilmes em sistemas reais ou, simplesmente, as células bacterianas ficam aderidas nas superfícies das membranas com uma taxa de reprodução muito baixa sendo desprendidas de tempos em tempos ou ficam retidas sem se reproduzir em sistemas reais de osmose reversa. Estudos de carbono orgânico assimilável em águas de superfície e de poço mostraram que pequenas quantidades de orgânicos biodegradáveis (< 100 µg/L) são necessários para manter o crescimento de microrganismos heterotróficos (Derlon, 2014).

5.3.5 Conclusão

Biofilmes de cultura pura, quando comparados com biofilmes presentes em *fouling* de membranas de osmose reversa colmatadas, diferem na composição do EPS, apresentando quantidades maiores de biomoléculas (proteínas e carboidratos) e uma correlação entre aumento de células viáveis com maior quantidade de carboidratos, o que não foi observado em *fouling* de membranas colmatadas

Parâmetros como quantificação de carboidratos e, muitas vezes, quantificação de proteínas parecem ser úteis na quantificação e na determinação da presença de *biofouling* de cultura pura formados.

A formação de biofilmes em sistemas de osmose reversa é inevitável. Esta estrutura biológica, geralmente, é considerada no aspecto de colmatação biológica, mas não de colmatação química, ou seja, uma possível influência destas estruturas na deposição de sais.

REFERÊNCIAS

- AL-AHMAD, M.; ALEEM, F. A. A.; MUTIRI, A.; UBAISY, A. Biofouling in RO membrane systems: part 1: fundamentals and control. **Desalination**, v. 132, p.173-179, 2000.
- BARNES, R. J.; RATNAHARIKA, R.; CHUA, B. F.; JIUN, L.; AUNG, T.; BARRAUD, N.; ANTHONY, A. F.; KJELLEBERG, S.; RICE, S. A. The roles of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides in biofouling of reverse osmosis membranes and nitric oxide induced dispersal. **Journal of Membrane Science**. v. 466 p. 161-172, 2014.
- FLEMMING, H-C.; SCHAULE, G.; GRIEBE, T.; SCHMITT J.; TAMACHKIAROWA, A. Biofouling – the Achilles heel of membrane processes. **Desalination**, v. 113, p. 215 225, 1997.
- GUO, W.; HAO NGO, H.; LI, J. A mini-review on membrane fouling. **Bioresource Technology**, v.122, p. 27–34, 2012.
- HERZBERG, M.; ELIMELECH, M. C. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. **Journal of Membrane Science**. v. 295, p. 11-20, 2007.
- HERZBERG, M.; KANG, S.; ELIMELECH, M. Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Biofouling of Reverse Osmosis Membranes. **Environ. Sci. Technol.** 43, 4393–4398 (2009).
- IVNITSKY, H.; KATZ, I.; MINZ, D.; SHIMONI, E.; CHEN, Y.; TARCHITZKY, J.; SEMIAT, R.; DOSORETZ, C.G.; 2005. Characterization of membrane biofouling in nanofiltration processes of wastewater treatment. **Desalination**, v. 185, p. 255–268, 2005.
- JEFFERSON, K. K. Bacterial Polysaccharides. *Current Innovations and Future Trends* (ed. Ullrich, M.)175–186 (2009).
- LAKSHMINARAYANAN, V.; PONNUSWAMY, R.; RENGARAJU, B. Screening, Purification and Characterization of β -Glucan from a Novel Strain *Bacillus cereus* LVK13 (KC 898956). **International Journal of ChemTech Research**. v.8, p. 1156-1162, 2015.

LI, J.; YANG, F.; LIU, Y.; SONG, H., LI, D.; CHENG, F. Microbial community and biomass characteristics associated severe membrane fouling during start-up of a hybrid anoxic–oxic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v.103, p.43–47, 2012.

MORISAKI, H.; TABUCHI, H. Bacterial attachment over a wide range of ionic strengths. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, p. 51–55, 2009.

RIJNAARTS, H. H. M.; NORDE, W.; LYKLEMA, J.; ZEHNDER, A. J. B. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 14, p. 179–195, 1999.

STEVIK, T. K.; AA, K.; AUSLAND, G.; HANSSSEN, J. F. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. **Water Research**, v. 38, p.1355–1367, 2004.

SUBRAMANI, A.; HOEK, E. M. V. Biofilm formation, cleaning, re-formation on polyamide composite membranes. **Desalination**, v. 257, p. 73–79, 2010.

THOMPSON, J.; LIN, N.; LYSTER, E.; ARBEL, R.; KNOELL, T.; GILRON, J., COHEN, Y. RO membrane mineral scaling in the presence of a biofilm. **Journal of Membrane Science**. v. 415, p. 181–191, 2012.

VEZA, J. M.; ORTIZ, M.; SADHWANI, J. J.; GONZALEZ, J. E.; SANTANA, F. J. Measurement of biofouling in seawater: some practical tests. **Desalination**, v. 220, p. 326–334, 2008.

VROUWENVELDER, J. S. **Biofouling of spiral wound membranes**. 2009. Ph. D Thesis - Delft University of Technology, Delft, The Netherlands, 2009.

VROUWENVELDER, J.S.; BEYER, F.; DAHMANI, K.; HASAN, N.; GALJAARD, G.; KRUIHOF, J.C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Phosphate limitation to control biofouling. **Water Research**, v. 44, p. 3454–3466, 2010.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 2675–2679, 2000.

6.4 CAPÍTULO 4: INFLUÊNCIA DE BIOFILMES NA DEPOSIÇÃO DE SAIS

6.4.1 Introdução

Compostos inorgânicos podem causar incrustações quando ocorre precipitação na membrana, devido à hidrólise e oxidação durante a filtração. O termo “deposição mineral” é utilizado para diferenciar deposição causada por sais inorgânicos da deposição causada por deposição orgânica e crescimento de microrganismos (*biofouling*). Dois mecanismos principais (cristalização e deposição de particulados) desempenham funções importantes na formação do *fouling* inorgânico na superfície das membranas. Durante a cristalização, a deposição na superfície da membrana ocorre devido à precipitação de íons, enquanto que na deposição de particulados, a deposição ocorre devido ao transporte convectivo de partículas coloidais da solução para a superfície das membranas. Ambas cristalização e deposição de particulados resultam na diminuição da solubilidade de sais inorgânicos (GUO et al., 2012).

A retenção de solutos pela membrana aumenta a sua concentração na camada – limite para valores acima dos que ocorrem na zona de mistura total no canal de alimentação. Conseqüentemente, estabelece-se um gradiente de concentração da superfície da membrana em direção ao canal do concentrado. Este processo é o principal responsável pelo acúmulo de partículas, macromoléculas e íons na superfície de membranas.

Particularmente, em sistemas de osmose reversa, os sais dissolvidos são concentrados de 4 a 10 vezes, podendo exceder suas solubilidades, precipitando nas membranas. A formação de depósitos é suportada pela concentração polarização da corrente de alimentação diretamente na superfície da membrana. Uma vez que a solução passa através de uma membrana seletiva que separa componentes da solução, a concentração dos compostos separados começa a aumentar na superfície da membrana. Este fenômeno não ocorre apenas em membranas de osmose reversa, mas também, em outros tipos de membranas (KOLK et al., 2013).

No equilíbrio, a concentração de um soluto na zona de concentração-polarização, depende da taxa de transporte do soluto em direção à membrana, da taxa de difusão do soluto de volta ao meio e, do fluxo do soluto através da membrana (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001):

$$J_{c_{PS}} = J_{c_{CS}} - D_s \left(\frac{d_{c_{PS}}}{dx} \right)$$

Onde J: fluxo de permeado; c_{PS} : concentração de soluto no permeado; c_{CS} : concentração do soluto no canal de concentrado; D_s : taxa de difusão do soluto; $d_{c_{PS}}/dx$: gradiente de concentração do soluto na zona de concentração-polarização.

A concentração de soluto na superfície da membrana pode ser calculada a partir da seguinte relação (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001):

$$c_{ms} = c_{cs} \exp(k_{mcp} r)$$

Onde c_{ms} : concentração do soluto na superfície da membrana; c_{cs} : concentração do soluto no concentrado; k_{mcp} : constante empírica que varia de 0,6 e 0,9 para módulos comerciais e r : o coeficiente de rejeição do soluto pela membrana. Assim, quanto maior a concentração de sais na corrente de alimentação, maior será a probabilidade de ocorrer deposição de inorgânicos na superfície das membranas (ZHANG et al., 2007).

A cristalização e deposição de sais na superfície das membranas podem ser afetadas por alguns parâmetros físico-químicos como:

- a) Rugosidade da superfície: sabe-se que a superfície polida possui menos cristais no final de uma experiência de cristalização em comparação com uma superfície áspera. Isto porque um aumento na aspereza da superfície aumenta a energia livre da mesma, contribuindo para um aumento da adesividade e melhorando a captura de cristais (SHIRAZI et al., 2012).
- b) Supersaturação: a principal causa da deposição de sais é a supersaturação. Quando a solubilidade de um sal é excedida, o sal precipita e forma incrustação. Um aumento na supersaturação aumenta a taxa de nucleação (HASSON et al., 2001). Se a região de supersaturação for, na interface líquido membrana, ocorrerá precipitação direta na membrana. Entretanto, se a região de supersaturação for distante da superfície da membrana, cristais irão se formar na solução e migrarão para as membranas como partículas formando uma deposição sólida (CHEN et al., 2006). Existe, geralmente, um período de tempo decorrido entre o alcance da supersaturação e o aparecimento dos primeiros cristais, que pode ser referido como indução ou o período de iniciação. A magnitude do período de iniciação é governada pelo grau da supersaturação, da temperatura e turbulência (LINNIKOV, 2000).
- c) Taxa de cisalhamento: a cristalização na solução ou na superfície das membranas será de acordo com a velocidade do regime de operação do sistema. Com o aumento da velocidade de escoamento da água de alimentação, a probabilidade de agregação na superfície da membrana diminui pois, o fenômeno da concentração polarização é menos significativo em uma velocidade de escoamento maior. Esta velocidade maior também aumenta a força de cisalhamento na superfície da membrana fazendo com que ocorra uma

- maior difusão e transporte dos depósitos da membrana para a solução (SHIRAZI et al., 2012).
- d) Solução química: a solução química tem um importante efeito na carga de superfícies poliméricas. Taborek et. al. (2000) mostrou o efeito da cristalização de soluções contendo alta concentração de uma grande variedade de sais. Cada sal exibiu formações cristalinas diferentes, formando cavidades entre eles que permitiram a deposição de partículas suspensas, diminuindo a coesão cristalina. Na presença de um eletrólito indiferente (1:1), todas as superfícies poliméricas (incluindo as membranas de osmose reversa) são positivamente carregadas em baixo pH e, negativamente carregado em altos valores de pH (SHIRAZI et al., 2012). Além disso, o pH da solução, a força iônica e a carga da superfície da membrana afetam as interações eletrostáticas entre a membrana e os depósitos (*fouling*). Como resultado, uma deposição insignificante foi observada quando a carga de repulsão ocorreu entre a membrana e as incrustações, a uma força iônica baixa (CHEN et al., 2006).
- e) Tamanho da partícula e concentração: partículas grandes são estericamente prejudicadas na deposição na superfície das membranas e elas são mais facilmente “varridas” por forças axiais. Uma água de alimentação mais concentrada aumenta o fluxo convectivo de partículas na superfície da membrana. Consequentemente, uma maior deposição ocorre com partículas de menor tamanho e em maior concentração (SHIRAZI et al., 2012).
- f) Temperaturas da membrana e da solução: poucos estudos foram feitos para investigar o efeito das temperaturas da solução e da membrana na formação do *fouling* inorgânico. A temperatura afeta a viscosidade da água, a solubilidade e o coeficiente de transferência de massa de sais inorgânicos ou partículas. Como resultado, o fluxo de permeado aumenta em temperaturas maiores, e assim, o transporte convectivo de depósitos para a membrana é mais significativo (*fouling* mais severo). Contudo, o coeficiente de transporte de massa e a difusão da camada de *fouling* para a solução também aumenta com o aumento da temperatura. A temperatura também afeta a solubilidade e a supersaturação de sais (HASSON et al., 2001).
- g) Membrana hidrofílica: uma membrana hidrofílica permite que sua superfície forme um filme de água. Materiais hidrofílicos possuem uma habilidade em formar ligações de hidrogênio com a água. Quanto maior a tendência de um material se associar com a água por pontes de hidrogênio, mais hidrofílico será o material. Geralmente, espera-se que partículas hidrofóbicas possuam um maior potencial de causar *fouling* em membranas

hidrofóbicas. Para ambas, membranas e partículas hidrofílicas, suas interações dependem de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (SHIRAZI et al., 2012).

6.4.1.2 Sulfato de Bário

Fouling inorgânico sempre ocorre na superfície das membranas de osmose reversa devido ao aumento da concentração de sais perto da membrana causado pela concentração polarização. Os principais compostos presentes neste tipo de deposição são: carbonato de cálcio (CaCO_3), sulfato de cálcio (CaSO_4), sulfato de bário (BaSO_4) e sílica (SiO_2) (FRITZMANN et al., 2007).

Sulfato de bário é, particularmente, um problema em sistemas de osmose reversa devido à sua baixa solubilidade (10^{-5} mol/L em água pura). Além disso, quando não detectado inicialmente, o sulfato de bário (barita) forma incrustações resistentes ao tratamento químico convencional utilizado na limpeza química de membranas (BOERLAGE et al., 2000).

6.4.2 Objetivos

Verificar se existe alguma influência da presença de biofilmes microbianos em membranas de osmose reversa na deposição de sais nas mesmas.

6.4.3 Materiais e Métodos

6.4.3.1 Membranas Utilizadas no Experimento

As membranas utilizadas no experimento foram obtidas de um elemento de osmose reversa novo (Modelo: RE-70-1812) (Figura 35). Estas amostras foram inseridas em células de fluxo de acrílico (células de fluxo) para montagem do sistema utilizado no experimento (Figura 36). Estas células de fluxo de acrílico possuem aberturas nas duas extremidades, possibilitando a conexão entre elas.

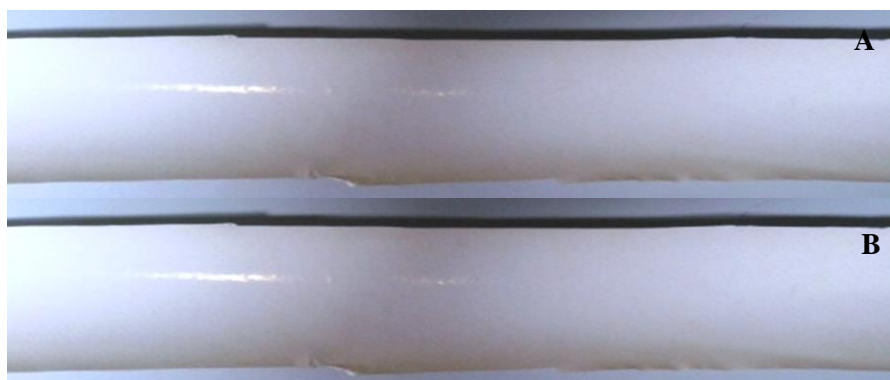


Figura 35 - Elemento de osmose reversa novo (A) utilizado para obtenção de amostras (B).



Figura 36 - Duas células de fluxo montadas com amostras de membranas limpas dentro.

6.4.3.2 Montagem do Sistema

O sistema de circulação de fluidos foi montado utilizando duas bombas peristálticas (Milan, modelo: MSR) e três placas de acrílico em série (Figura 37). Mangueiras de silicone de 5 mm de diâmetro foram utilizadas na conexão entre as diferentes partes do sistema (reservatório, bombas peristálticas e células de fluxo).

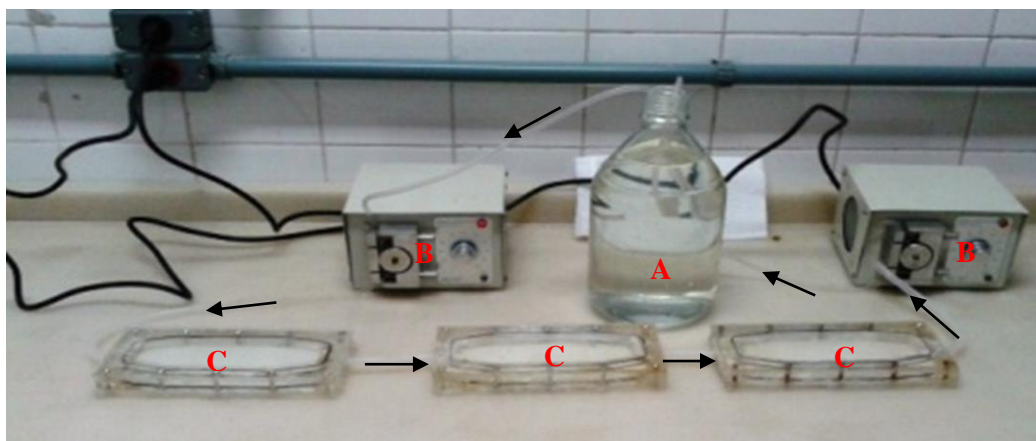


Figura 37 - Sistema montado. (A) Reservatório, (B) Bombas peristálticas e (C) Placas de acrílico contendo amostras de membranas em série. As setas em preto mostram o percurso do fluido no sistema após o funcionamento.

6.4.3.3 Crescimento de Biofilmes Complexos nas Amostras

Após a montagem do sistema de circulação de fluidos, o reservatório foi preenchido com água da raia olímpica da USP (trocada de dois em dois dias) e colocado em funcionamento por 15 dias ininterruptos, utilizando a potência máxima das bombas peristálticas (vazão de 4,7 L/h), para o crescimento de biofilmes nas amostras.

6.4.3.4 Crescimento de Biofilmes de Cultura Pura nas Amostras

Foram utilizadas as quatro espécies de bactéria utilizadas no capítulo 3 (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas Aeruginosa*). Cada espécie obtida foi utilizada para o crescimento de cultura pura de biofilme nas amostras de membrana limpas. Cada cultura foi inoculada em meio de crescimento complexo (BHI, Merk), por 12 horas a 37 °C e, posteriormente, circulada no sistema da figura 37 por quinze dias para a formação de biofilmes nas amostras de membrana (o meio de cultura BHI contido no reservatório foi trocado de dois em dois dias).

6.4.3.5 Solução Salina

Para a verificação da influência dos biofilmes na deposição de sais, foi adicionado 2 mg de sulfato de bário (solubilidade de 2,44 mg/L em água a 20 °C) em 1 L de água autoclavada da raia olímpica da USP. Esta solução foi colocada no reservatório do sistema e circulada por 15 dias ininterruptos, utilizando a potência máxima das bombas, nas amostras de membranas limpas

e 15 dias com amostras contendo biofilmes complexos e de cultura pura. A solução do reservatório foi trocada de dois em dois dias.

6.4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca FEI, modelo Quanta 600 FEG para uma visualização mais detalhada da formação de biofilmes nas amostras após contato por 15 dias com água da raia olímpica e 15 dias após contato com meio complexo BHI.

6.4.3.7 Análise Elementar (FRX)

A análise elementar foi realizada por energia dispersiva de raios X que não detecta os elementos com peso molecular abaixo de 12 u (H, He, Li e Be) e alcança uma profundidade de 15 nm. Para esta quantificação foi utilizado o equipamento Axios Advanced da Panalytical, localizado no laboratório LCT na Engenharia de Minas da Poli-USP. Esta análise teve como objetivo verificar, principalmente, a proporção de bário e enxofre nas amostras com biofilmes e amostras limpas após contato por 15 dias com água da raia autoclavada com concentração de 2 mg/L de sulfato de bário.

6.4.4 Resultados e Discussão

6.4.4.1 Crescimento de Biofilmes Complexos nas Amostras

Após 15 dias ininterruptos de circulação da água da raia sobre as amostras de membranas limpas, observou-se a formação de biofilmes microbianos por toda a extensão das amostras (Figura 38). Este crescimento ocorreu devido à presença de microrganismos e matéria orgânica assimilável presentes na água da raia olímpica da USP.

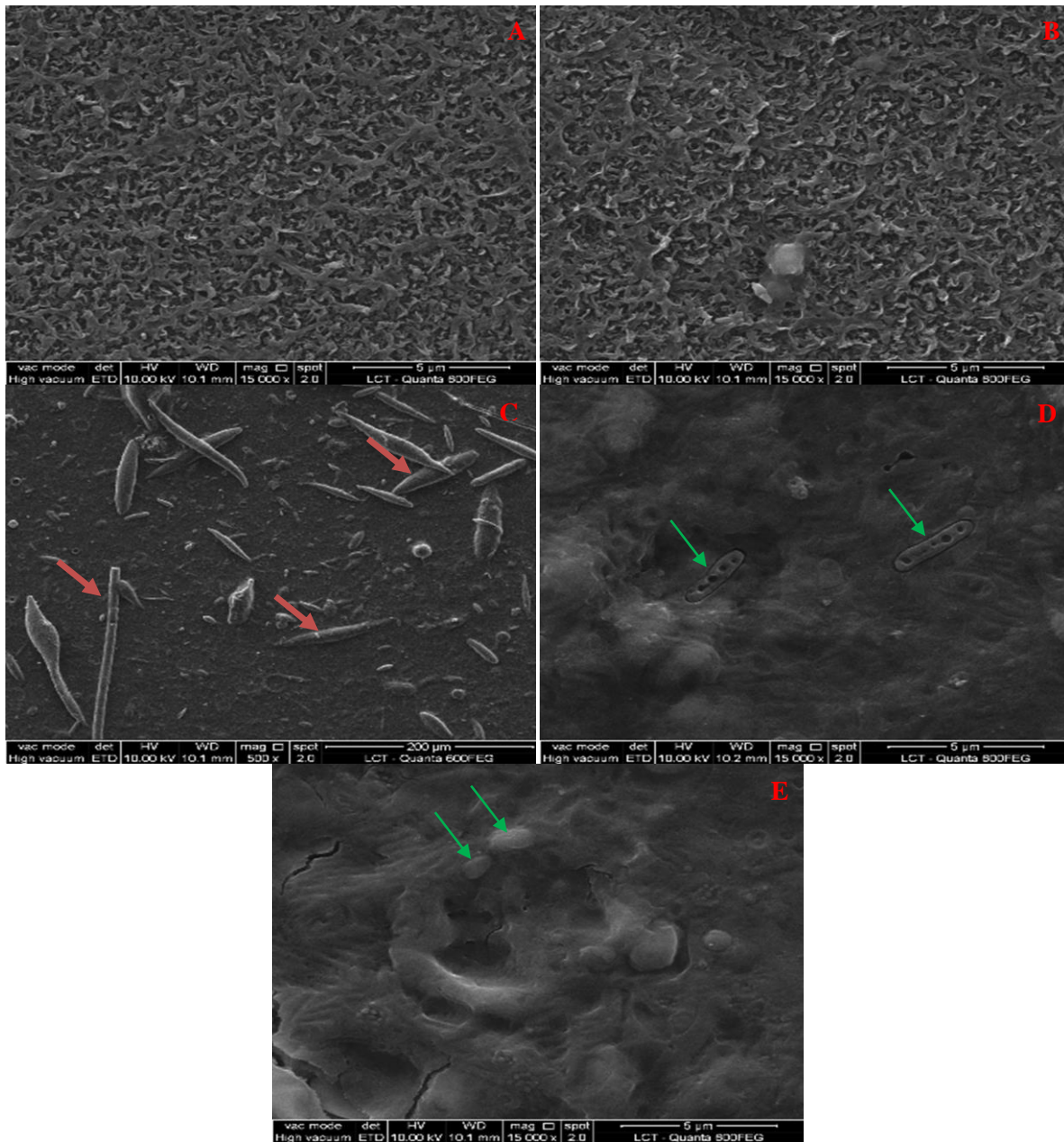


Figura 38 - Micrografias eletrônicas das amostras de membranas limpas (A e B), e após 15 dias em contato com a água da raia olímpica da USP (C, D e E). Presença de algas (setas vermelhas em C), bactérias (setas verdes em D e E) e grande quantidade de material amorfo.

6.4.4.2 Crescimento de Biofilmes de Cultura Pura nas Amostras

Posteriormente ao crescimento das culturas puras em meio complexo e sua circulação nas amostras por 15 dias ininterruptos, observou-se a formação de biofilme por toda a extensão das amostras (Figura 39). Apesar de todas as bactérias isoladas e identificadas apresentarem morfologia em forma de bastonetes, pelas imagens é possível verificar algumas diferenças como: tamanho, forma, quantidade de matriz produzida e crescimento de cada uma.

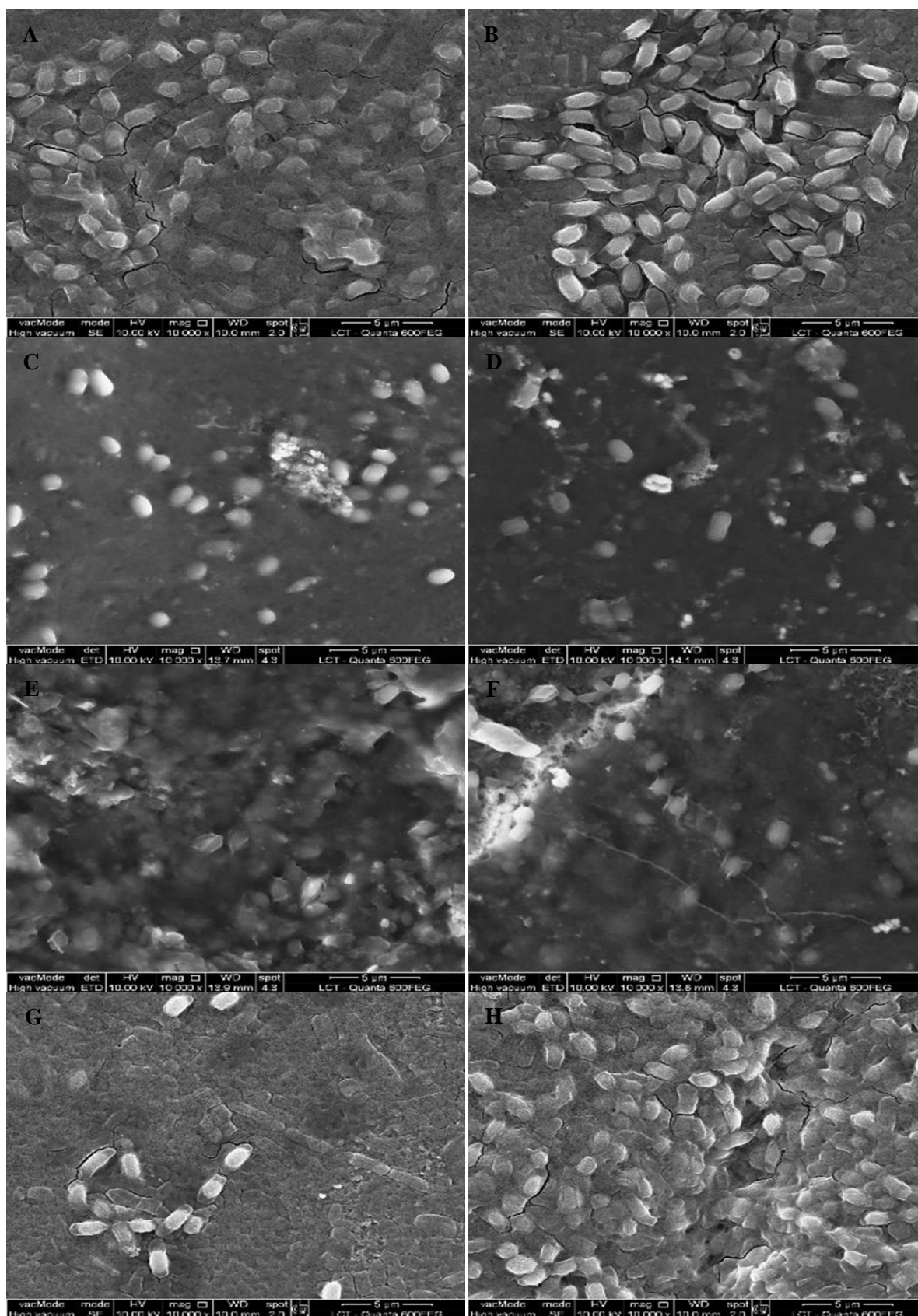


Figura 39 - Micrografias eletrônicas mostrando os biofilmes de cultura pura formados nas amostras. Biofilmes formados pelas culturas: *Bacillus anthracis* (A e B), *Bacillus cereus* (C e D), *Bacillus thuringiensis* (E e F) e *Pseudomonas aeruginosa* (G e H).

6.4.4.3 Análise Elementar das Amostras

6.4.4.3.1 Amostras Limpas Após Circulação com Solução de BaSO₄ (2 mg/L)

A análise elementar das três amostras de membrana sem biofilmes em suas superfícies não detectou a presença de bário, mesmo após a circulação de solução de sulfato de bário (2 mg/L) por 15 dias ininterruptos. As três amostras foram comparadas com uma amostra de membrana limpa (sem circulação da solução). As diferenças observadas na quantificação elementar deveram-se, provavelmente, à adsorção de íons e moléculas presentes na água da raia na superfície das membranas que foram circuladas com solução de BaSO₄ (Tabela 8).

Tabela 8 - Quantificação elementar de amostras de membrana sem biofilmes após 15 dias em contato com solução contendo 2 mg/L de BaSO₄.

Elementos	Membrana Limpa	Amostra sem biofilme após circulação da solução de BaSO ₄	Amostra sem biofilme após circulação da solução de BaSO ₄	Amostra sem biofilme após circulação da solução de BaSO ₄
F	<0,001	0,531	0,583	1,05
Na ₂ O	5,45	0,376	0,457	0,593
MgO	<0,001	0,118	0,089	0,068
Al ₂ O ₃	0,058	3,02	1,41	1,21
SiO ₂	0,076	9,18	4,24	4,56
P ₂ O ₅	0,059	0,217	0,152	0,188
SO ₃	92,2	84,2	90,7	89,9
Cl	0,634	0,602	0,671	0,731
K ₂ O	0,060	0,183	0,162	0,160
CaO	0,113	0,235	0,224	0,206
TiO ₂	1,31	1,02	1,17	1,14
MnO	<0,001	0,025	<0,001	<0,001
Fe ₂ O ₃	0,055	0,242	0,157	0,152
NiO	<0,001	0,015	<0,001	0,016
CuO	<0,001	<0,001	<0,001	0,010
ZnO	0,007	0,016	0,012	0,013
Br	0,005	0,004	<0,001	<0,001
BaO	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

6.4.4.3.2 Amostras com Biofilmes Complexos após Circulação com Solução de BaSO₄ (2 mg/L)

A análise elementar das amostras contendo biofilmes complexos mostrou ausência do elemento bário nas amostras de membrana limpa e com biofilmes onde não houve circulação da solução de BaSO₄. Nas amostras contendo biofilmes complexos na qual houve circulação da

solução por 15 dias, observou-se a presença do elemento bário em duas das três amostras (Tabela 9). A não presença de bário na amostra com biofilme que houve circulação da solução pode ter sido devido à amostra ser a última na série de três no sistema, havendo assim, pouca quantidade de íons bário na solução.

A figura 40 mostra uma análise qualitativa (mapa EDS) obtida pela microscopia eletrônica de alguns elementos químicos presentes nos biofilmes complexos. Pelo mapa EDS foi verificado a presença de elementos como: ferro, enxofre, silício, bário, alumínio e carbono.

Tabela 9 - Quantificação elementar de amostras de membrana com biofilmes complexos aderidos.

Elementos	Membrana Limpa	Amostra com Biofilme sem circulação da solução de (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme sem circulação da solução de (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme com circulação da solução de (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme com circulação da solução de (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme com circulação da solução de (BaSO ₄)
F	<0,001	1,72	1,38	0,694	1,09	1,70
Na ₂ O	4,73	0,537	0,373	0,478	0,712	0,973
MgO	<0,001	0,383	0,561	0,292	0,167	0,077
Al ₂ O ₃	0,091	7,39	7,22	9,72	4,68	0,821
SiO ₂	0,126	10,1	9,45	16,2	7,64	1,16
P ₂ O ₅	0,089	1,28	2,07	0,699	0,329	0,156
SO ₃	92,5	75,0	75,1	64,5	79,5	91,9
K ₂ O	0,112	0,386	0,412	0,500	0,281	0,206
CaO	0,156	0,453	0,494	0,515	0,327	0,325
TiO ₂	1,33	1,16	1,29	1,14	1,20	1,39
MnO	0,022	0,132	0,179	0,131	0,031	0,059
Fe ₂ O ₃	0,077	0,776	0,904	1,14	0,521	0,164
CuO	<0,001	<0,001	0,012	<0,001	<0,001	<0,001
ZnO	0,008	0,011	0,012	0,014	0,022	0,018
Cl	0,786	0,663	0,564	0,479	0,643	0,949
Sb ₂ O ₃	<0,001	<0,001	<0,001	0,078	<0,001	0,130
BaO	<0,001	<0,001	<0,001	3,44	2,89	<0,001

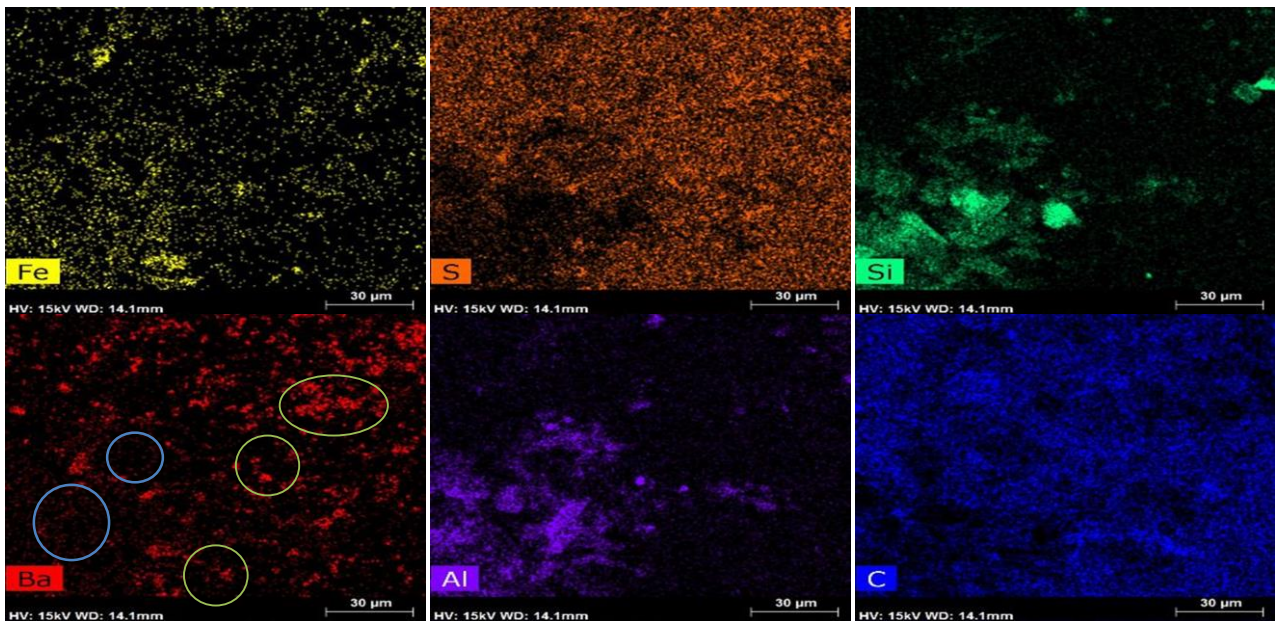


Figura 40 - Mapa EDS de alguns elementos químicos presentes nas amostras de biofilmes complexos sobre as amostras de membrana após circulação da solução de BaSO₄. Os aglomerados (círculos verdes no elemento bário por exemplo) indicam a presença dos elementos. Os pontos sem aglomeração representam ruído (círculos azuis).

6.4.4.3.3 Amostras com Biofilmes de Cultura Pura após Circulação com Solução de BaSO₄ (2 mg/L)

6.4.4.3.3.1 biofilme de cultura pura (*Bacillus anthracis*)

As amostras de membrana com biofilme de cultura pura (*Bacillus anthracis*) apresentaram o elemento bário na análise elementar das amostras após circulação da solução de BaSO₄ por 15 dias (exceto a última amostra da série), indicando uma correlação da presença desses microrganismos na incorporação de íons bário presentes na solução (Tabela 10).

A figura 41 mostra um mapa EDS obtido pela microscopia eletrônica de alguns elementos químicos presentes nos biofilmes. De acordo com este mapa, elementos como: ferro, alumínio, bário, enxofre, silício e potássio foram detectados.

Tabela 10 - Quantificação elemental das amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (*Bacillus anthracis*) aderidos.

Elementos	Membrana Limpa	Amostra com biofilme sem circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme sem circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme e com circulação da solução de (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme e com circulação da solução de (BaSO ₄)	Amostra com Biofilme e com circulação da solução de (BaSO ₄)
F	<0,001	1,65	1,38	1,65	1,11	1,20
Na ₂ O	4,31	1,05	1,32	0,695	1,05	0,754
MgO	<0,001	0,383	0,427	0,540	0,291	0,325
Al ₂ O ₃	0,085	3,39	2,22	3,46	1,53	2,47
SiO ₂	0,215	5,16	5,45	6,55	3,16	4,15
P ₂ O ₅	0,073	1,28	2,07	2,70	1,67	2,01
SO ₃	92,6	83,4	83,1	80,7	87,5	85,5
Cl	0,772	0,632	0,852	0,679	0,820	0,720
K ₂ O	0,131	0,475	0,454	0,429	0,351	0,461
CaO	0,200	0,365	0,394	0,376	0,332	0,452
TiO ₂	1,37	1,57	1,18	1,37	1,45	1,52
MnO	0,030	0,025	<0,001	<0,001	0,028	0,031
Fe ₂ O ₃	0,081	0,356	0,186	0,339	0,226	0,162
NiO	<0,001	0,021	0,012	0,016	0,018	0,021
CuO	0,022	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ZnO	<0,001	0,043	0,045	0,034	0,008	0,008
BaO	<0,001	<0,001	<0,001	0,375	0,297	<0,001

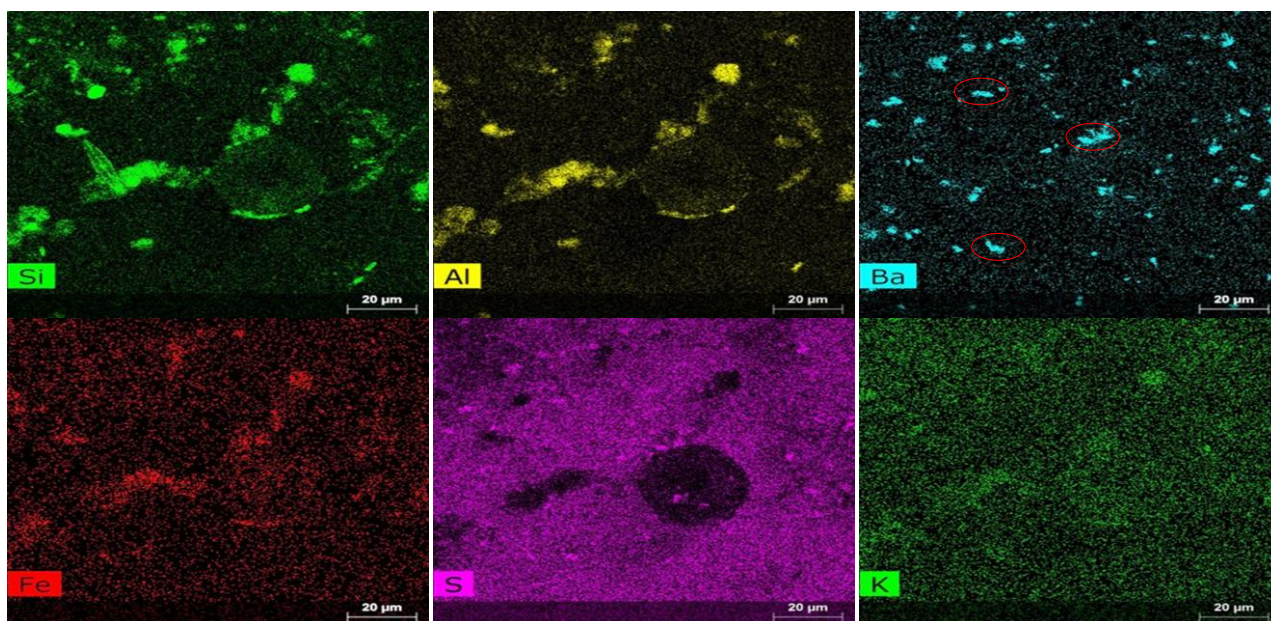


Figura 41 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (*Bacillus anthracis*) sobre as amostras de membrana. Os aglomerados (círculos vermelhos) indicam a presença do elemento bário nas amostras.

6.4.4.3.3.2 biofilme de cultura pura (*Bacillus cereus*)

As amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (*Bacillus cereus*) apresentaram o elemento bário na análise elementar das amostras após circulação da solução de BaSO₄ por 15 dias (exceto a última amostra da série), indicando uma correlação da presença desses microrganismos na incorporação ou adsorção destes íons (Tabela 11).

A figura 42 mostra um mapa EDS obtido pela microscopia eletrônica de alguns elementos químicos presentes nos biofilmes. Pelo mapa, elementos como: bário, alumínio, enxofre, silício, carbono e oxigênio foram detectados.

Tabela 11 - Quantificação elementar de amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (*Bacillus cereus*) aderidos.

Elementos	Membrana Limpa	Amostra de biofilme sem circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra de biofilme sem circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme e com circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme e com circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme e com circulação da solução (BaSO ₄)
F	<0,001	0,654	1,34	0,804	1,07	<0,001
Na ₂ O	5,64	1,23	2,06	1,65	0,941	1,48
MgO	<0,001	0,467	0,478	0,273	0,329	0,387
Al ₂ O ₃	0,123	0,584	2,75	3,12	2,48	0,714
SiO ₂	0,344	1,65	2,54	3,27	2,60	1,42
P ₂ O ₅	0,150	0,786	1,47	1,18	1,13	2,34
SO ₃	90,4	78,3	80,4	85,8	88,0	52,4
Cl	0,623	1,87	1,11	1,21	1,00	1,70
K ₂ O	0,153	0,639	1,76	0,343	0,276	1,92
CaO	0,176	0,378	1,87	0,239	0,298	2,46
TiO ₂	2,26	12,67	2,67	1,38	1,30	26,6
MnO	<0,001	<0,001	0,583	0,021	<0,001	0,709
Fe ₂ O ₃	0,123	0,345	0,75	0,250	0,190	2,02
NiO	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,017	<0,001
CuO	<0,001	<0,001	0,067	0,120	<0,001	<0,001
ZnO	<0,001	<0,001	0,25	0,020	<0,001	5,84
BaO	<0,001	<0,001	<0,001	0,325	0,376	<0,001

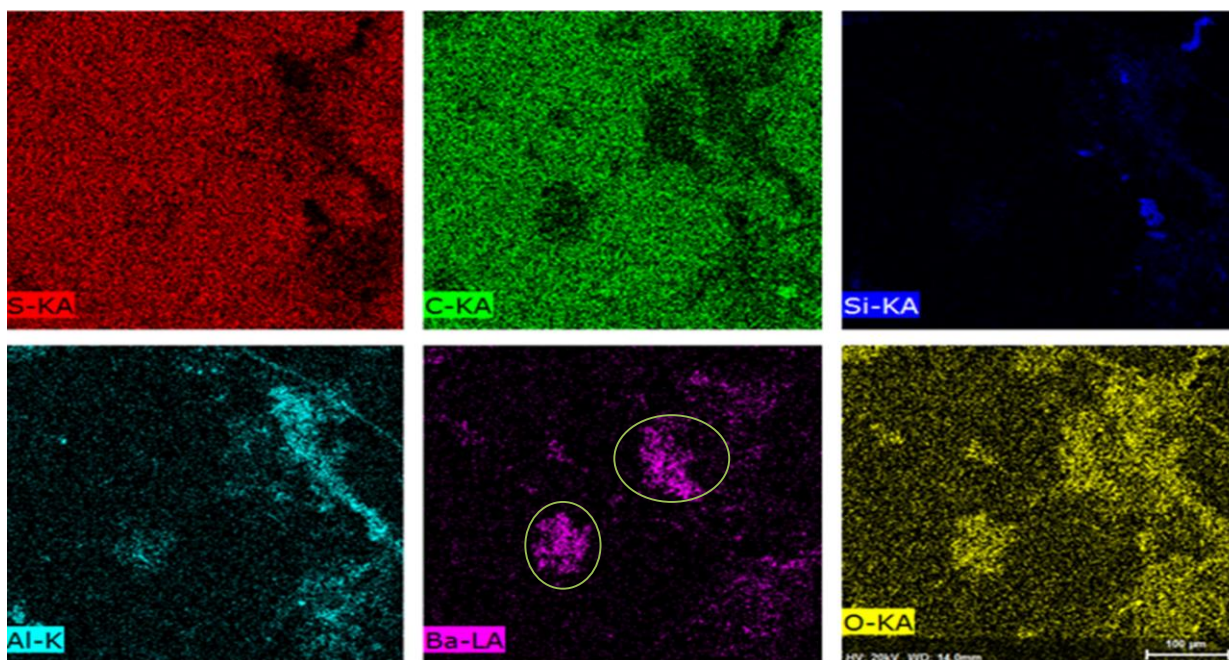


Figura 42 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (*Bacillus cereus*) sobre as amostras de membrana. Os aglomerados (círculos verdes) indicam a presença do elemento bário.

6.4.4.3.3 biofilme de cultura pura (*Bacillus thuringiensis*)

As amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (*Bacillus thuringiensis*) não apresentaram o elemento bário na análise elementar das amostras após circulação da solução de BaSO_4 por 15 dias, não indicando uma correlação da presença desses microrganismos na assimilação de íons bário (Tabela 12).

A figura 43 mostra um mapa EDS obtido pela microscopia eletrônica de alguns elementos químicos presentes nos biofilmes. Pelo mapa, elementos como: bário, alumínio, enxofre, silício, carbono e oxigênio foram detectados.

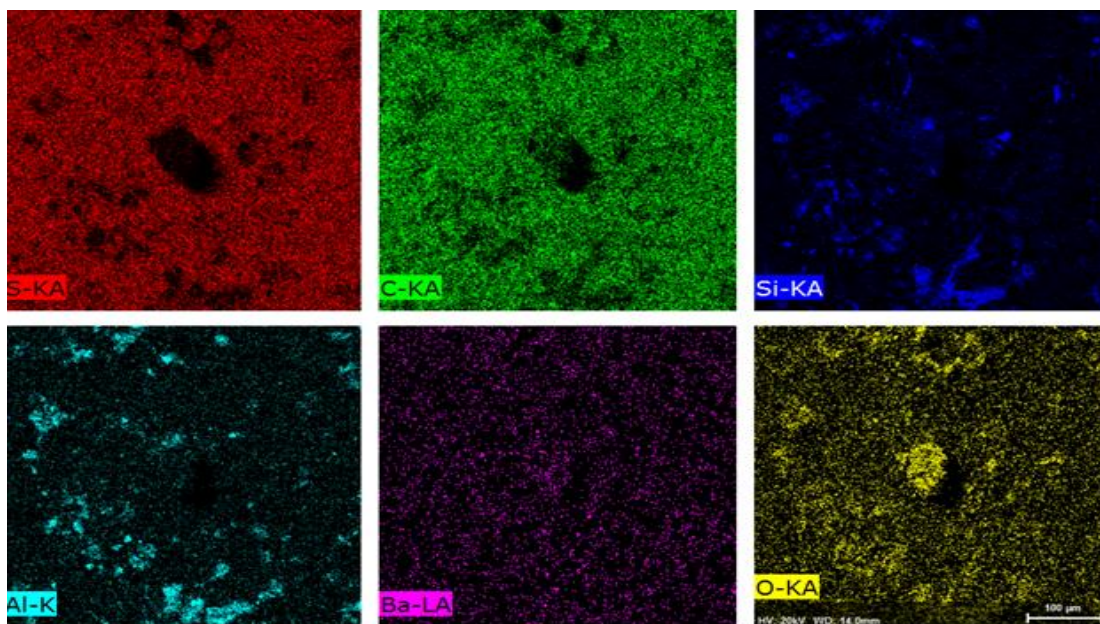


Figura 43 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (*Bacillus thuringiensis*) sobre as amostras de membrana. Ausência de aglomerados para o elemento bário. Os pontos sem aglomeração indicam apenas ruído do equipamento.

6.4.4.3.3.4 biofilme de cultura pura (*Pseudomonas aeruginosa*)

De acordo com a tabela 13, as amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (*Pseudomonas aeruginosa*) não apresentaram o elemento bário na análise elemental das amostras após circulação da solução de $BaSO_4$ por 15 dias, não indicando uma correlação da presença desses microrganismos na deposição de sais.

A figura 44 mostra um mapa obtido pela microscopia eletrônica de alguns elementos presentes nos biofilmes. Pelo mapa, elementos como: bário, alumínio, enxofre, silício, carbono e oxigênio foram detectados.

Tabela 13 - Quantificação elementar das amostras de membrana com biofilmes de cultura pura (*Pseudomonas aeruginosa*) aderidos.

Elementos	Membrana Limpa	Amostra com biofilme sem circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme sem circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme e com circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme e com circulação da solução (BaSO ₄)	Amostra com biofilme e com circulação da solução (BaSO ₄)
F	<0,001	0,765	0,855	0,942	<0,001	<0,001
Na ₂ O	0,498	0,534	1,45	0,841	1,40	0,456
MgO	0,297	0,143	0,567	0,244	0,314	<0,001
Al ₂ O ₃	5,96	4,56	4,45	4,47	6,66	0,111
SiO ₂	6,77	0,432	0,985	5,32	9,97	0,246
P ₂ O ₅	0,812	0,564	1,65	0,741	1,43	0,210
SO ₃	82,4	88,1	83,5	84,3	76,6	96,1
Cl	0,862	1,658	1,87	0,923	1,16	0,883
K ₂ O	0,387	0,445	0,765	0,319	0,440	0,161
CaO	0,301	0,158	0,423	0,331	0,363	0,219
TiO ₂	1,29	1,67	2,54	1,30	1,27	1,48
MnO	0,021	0,043	0,045	0,022	<0,001	<0,001
Fe ₂ O ₃	0,359	0,134	0,543	0,272	0,401	0,144
CuO	<0,001	<0,001	0,023	<0,001	0,019	<0,001
ZnO	0,009	<0,001	0,015	0,015	0,015	<0,001
BaO	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

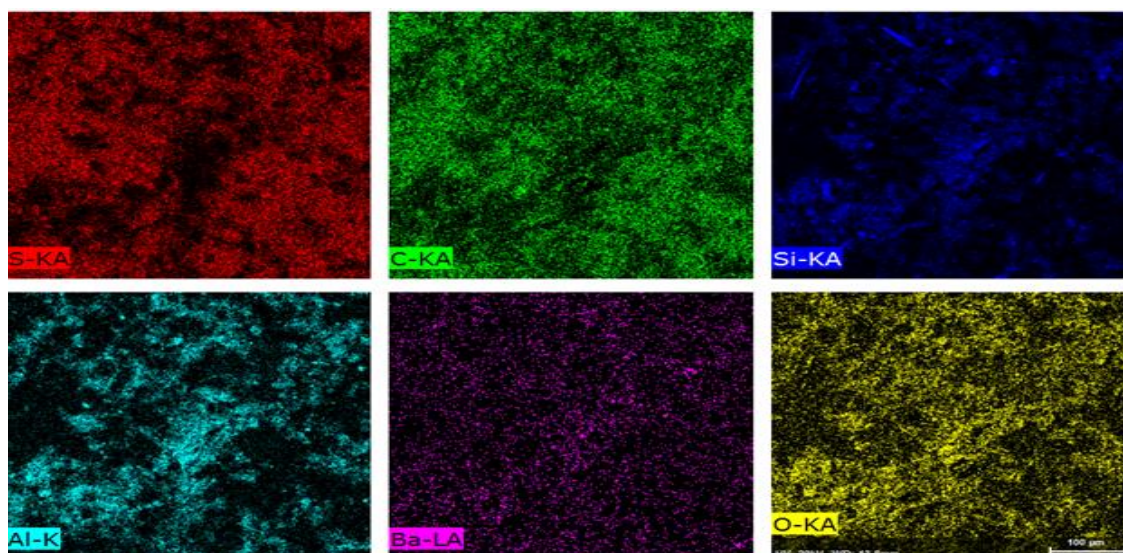


Figura 44 - Mapa EDS de elementos presentes nas amostras de biofilmes de cultura pura (*Pseudomonas aeruginosa*) sobre as amostras de membrana. Ausência de aglomerados para o elemento bário.

Mesmo não havendo permeação, observou-se uma influência de biofilmes complexos e alguns biofilmes de cultura pura na deposição de sais ou em uma espécie de troca iônica ocorrida pela interação de componentes da água com a matriz do biofilme. De acordo com Tortora (2012), as paredes celulares de bactérias gram-positivas possuem ácidos teicóicos em suas superfícies. Estes ácidos possuem carga negativa e podem unir e regular o movimento de cátions para dentro e para fora da célula. Todos os biofilmes de cultura pura exceto o de *Pseudomonas aeruginosa* eram constituídos por microrganismos gram-positivos. A única bactéria gram-positiva que não apresentou resultados positivos na incorporação de íons ou deposição de sais foi *Bacillus thuringiensis*, indicando que a influência de biofilmes na deposição estaria mais relacionada com a constituição química da matriz, que é diferente para cada tipo de microrganismo.

Diversas espécies de *Bacillus* produzem uma variedade de EPS como: levana (polímero, constituído por unidades de frutose vinculadas por ligações glicosídicas do tipo β), β -1,3-Glucano (polissacarídeos de monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β). São um grupo diversificado de moléculas que podem variar no que diz respeito à massa molecular, a solubilidade, a viscosidade, e a configuração tridimensional), e heteropolímeros principalmente compostos por açúcares neutros e conjugados de açúcar e proteína. Alguns EPS de *Bacillus* são excelentes emulsificantes e capazes de remover metais pesados (Lakshminarayanan, 2015).

Em sistemas de osmose reversa reais em operação, na qual ocorre permeação e, conseqüentemente, concentração de íons na solução (principalmente nos últimos elementos do vaso), a presença de biofilmes deve influenciar na deposição de sais nestes elementos. Thompson et al., 2012, em um trabalho envolvendo permeação de membranas de osmose reversa de bancada, concluiu que um biofilme pré-formado na membrana aumenta a deposição de sais devido a um aumento da concentração polarização. Herzberg e Elimelech (2007), concluíram que a resistência hidráulica causada pelos biofilmes é devido ao EPS produzido e não devido à presença apenas de células microbianas; estas seriam responsáveis pelo aumento da pressão osmótica transmembrana causada pelo aumento da concentração polarização.

6.4.5 Conclusão

Os resultados obtidos neste experimento mostraram que a presença de biofilmes em sistemas de osmose reversa possui algum tipo de interferência nos íons e compostos presentes na solução (seja na deposição de sais ou na troca iônica), agravando problemas como: queda de produção e danos às membranas. Como a presença de biofilmes nestes sistemas é inevitável, a deposição de sais, considerada apenas nos últimos elementos dos vasos de pressão, pode também, ser um problema em outros elementos que não estejam localizados no final dos vasos de pressão.

REFERÊNCIAS

BOERLAGE, S. F. E.; KENNEDY, M. D.; BREMERE, I.; WITKAMP, G. J.; VAN DER HOEK, J. P.; SCHIPPER, J. C. Stable barium sulphate supersaturation in reverse osmosis. **Journal of Membrane Science**. v.179, p. 53–68, 2000.

CHEN, D.; WEAVERS, L. K.; WALKER, H.W.; LENHART, J.J. Ultrasonic control of ceramic membrane fouling by natural organic matter and silica particles. **Journal of Membrane Science**. v.276, p.135–144, 2006.

FRITZMANN, C.; LÖWENBERG, J.; WINTGENS, T.; MELIN, T. State-of-the-art of reverse osmosis desalination. **Desalination**. v.216, p.1–76, 2007.

GUO, W.; HAO NGO, H.; LI, J. A mini-review on membrane fouling. **Bioresource Technology**, v.122, p. 27–34, 2012.

HASSON, D.; DRAK, A.; SEMIAT, R. Inspection of CaSO₄ scaling on RO membranes at various water recovery levels. **Desalination**. v.139, p.73–81, 2001.

HERZBERG, M.; KANG, S.; ELIMELECH, M. Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Biofouling of Reverse Osmosis Membranes. **Environ. Sci. Technol.** 43, 4393–4398 (2009).

LAKSHMINARAYANAN, V.; PONNUSWAMY, R.; RENGARAJU, B. Screening, Purification and Characterization of β -Glucan from a Novel Strain Bacillus cereus LVK13 (KC 898956). **International Journal of ChemTech Research**. v.8, p. 1156-1162, 2015.

LINNIKOV, O.D. Investigation of the initial period of sulphate scale formation Part 3. Variations of calcium sulphate crystal growth rates at its crystallization on a heat exchange surface. **Desalination**. v.128, p.47–55, 2000.

LI, J.; SANDERSON, R. D. In situ measurement of particle deposition and its removal in micro-filtration by ultrasonic time domain reflectometry. **Desalination**. v.146, p.169-175, 2002.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso**. Edição. São Paulo: ABES, 2001. 234 p.

SHIRAZI, S.; LIN, C.; CHEN, D. Inorganic fouling of pressure-driven membrane processes - A critical review. **Desalination**. v. 250, p. 236–248, 2010.

TABOREK, J.; AOKU, T.; RITTER, R. B.; PAELN, J. W.; KNUDSEN, J.G. Fouling the major unresolved problem in heat transfer. **Chemical Engineering Progress**. v.68, p.59-67, 2000.

THOMPSON, J.; LIN, N.; LYSTER, E.; ARBEL, R.; KNOELL, T.; GILRON, J., COHEN, Y. RO membrane mineral scaling in the presence of a biofilm. **Journal of Membrane Science**. v. 415, p. 181–191, 2012.

ZHANG, P.; ZHANG, G.; WANG, W. Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 207-210, 2007.

7.5 **CAPÍTULO 5: LIMPEZA QUÍMICA E RECUPERAÇÃO BACTERIANA EM MEMBRANAS DE OSMOSE REVERSA**

7.5.1 **Introdução**

7.5.1.1 *Limpeza Química de Membranas*

Embora, na teoria, a causa para a formação dos diversos tipos de *fouling* possa ser prevenida por um pré-tratamento adequado da água de alimentação, na prática, esses problemas podem ser apenas retardados. Este fato requer ações apropriadas para conter os efeitos negativos causados pelo *fouling* e aumentar ao máximo o tempo de vida das membranas. Além disso, operações de limpeza química de membranas em intervalos regulares são inevitáveis (KOLK et al., 2013).

A limpeza química é a técnica mais utilizada para a recuperação de membranas, principalmente, em sistemas de osmose reversa.

Manter o fluxo de permeado continua sendo um desafio em sistemas de osmose reversa, principalmente, devido ao *fouling* de membranas. Compostos orgânicos (geralmente matéria orgânica natural e microrganismos), compostos inorgânicos como: CaCO_3 , CaSO_4 , BaSO_4 , SiO_2 e colóides, podem depositar sobre a superfície das membranas, diminuindo o fluxo de permeado (ESPINASSE et al., 2012).

Os agentes de limpeza mais comumente utilizados em sistemas de membranas são: ácidos, bases, surfactantes, enzimas, agentes complexantes, desinfetantes e a combinação destes agentes.

De acordo com Tragardh (1989), limpeza é definida como um processo no qual os substratos removidos não fazem parte do material. Os objetivos dos procedimentos de limpeza química e desinfecção são: obter uma estrutura que é fisicamente limpa (promovendo fluxo e separação adequados em operações subsequentes), quimicamente inerte (livre de resíduos que podem contaminar o produto e biologicamente limpo (no qual uma redução adequada de microrganismos pode ser alcançada) (D'SOUZA; MAWSON, 2007). Para alcançar estes propósitos, alguns cuidados devem ser tomados: os agentes químicos utilizados não devem danificar a membrana (pH e temperatura extremos), o processo de limpeza e sua frequência devem ser otimizados para minimizar efeitos adversos na vida útil das membranas, os produtos químicos utilizados devem ter uma disposição final adequada e minimização dos gastos com água e interrupção frequente do processo (TRAGARDH, 1989; LAWRENCE et al., 1998).

Uma limpeza inadequada em sistemas de filtração por membranas pode acarretar em aumentos nos custos de filtração como apontados por Hall (1992):

1. Um agente de limpeza muito agressivo pode resultar em uma deterioração irreversível da membrana e um aumento da substituição das mesmas no sistema. Tipicamente, o custo na troca de membranas constitui cerca de 25-30% do custo total do sistema.
2. Um procedimento de limpeza química incorreto aumenta o consumo de energia, os custos com operadores e uma redução na produtividade.
3. Protocolos incorretos de limpeza resultarão em perda do fluxo e/ou contaminação do produto.

7.5.1.2 Agentes Químicos Utilizados

Limpeza é uma reação heterogênea entre o agente e a camada de *fouling*. Para uma limpeza adequada da membrana, o agente químico utilizado deve possuir as seguintes características (D'SOUZA; MAWSON, 2007):

1. Uma concentração adequada, com boa solubilidade e fácil lavagem.
2. Dissolver o *fouling* e mantê-lo em solução, para prevenir seu posterior depósito nas superfícies que foram limpas.
3. Formar pouca espuma.
4. Boa compatibilidade com o material da membrana e outros componentes do sistema como juntas de cola e espaçadores.
5. Deve promover a desinfecção de superfícies úmidas.

Os principais agentes de limpeza química são (MADAENI; SAMIEIRAD, 2010):

- Bases

Hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) são substâncias inorgânicas altamente alcalinas que se dissolvem rapidamente em água liberando íons hidróxidos. Sua alta alcalinidade promove uma rápida hidrólise de proteínas e outros resíduos orgânicos e uma eficiente saponificação de gorduras e óleos em temperaturas acima de 50 °C. Soluções desses compostos em pH entre 11-12 são recomendados para a remoção de *fouling* contendo proteínas e outros compostos orgânicos. A presença de íons hidróxido pode promover a ruptura da camada de *fouling* por mecanismos como: aumento da força iônica, aumento da solubilidade de compostos orgânicos e aumento do pH. O aumento do pH deve resultar em um aumento da carga negativa de compostos orgânicos, devido a desprotonação de grupos carboxílicos e fenólicos. Em pH 11, a maioria dos grupos funcionais presentes em águas residuais é desprotonada e, além disso, os compostos adquirem carga negativa. Sob estas condições, as interações repulsivas entre

os constituintes do *fouling* facilitam a liberação e o transporte destes da superfície da membrana para a solução (ANG et al., 2011).

- Ácidos

Ácidos são utilizados, principalmente, para dissolver precipitados de sais inorgânicos ou óxidos. Ácido nítrico ou ácido fosfórico são, frequentemente, utilizados na limpeza de membranas. Entretanto, a utilização de ácido cítrico vem aumentando devido à sua brandura e facilidade de enxágue (D'SOUZA; MAWSON, 2007).

- Surfactantes

São compostos que possuem, em sua estrutura, regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Interações entre a membrana e o surfactante são dominadas por reações hidrofílicas/hidrofóbicas.

Os surfactantes agem sobre a membrana de diversas formas: facilitam a remoção de depósitos, suspendem materiais (auxiliando na solubilização e emulsificação), estabilizam espumas, adsorvem em superfícies melhorando suas propriedades e agem como biocidas (MARRIOTT, 1997).

Existem quatro classes gerais de surfactantes: aniônico, não iônico, catiônico e anfótero. Os dois primeiros são recomendados para o uso em limpeza de membranas. Surfactantes aniônicos apresentam carga negativa quando dissociado em água e são normalmente vendidos como sais de sódio, potássio e amônio. Surfactantes não iônicos são surfactantes que não se ionizam em solução; formam pouca espuma, independente do pH, são facilmente removidos porém, geralmente, são menos efetivos que os agentes aniônicos.

- Enzimas

A utilização de enzimas é geralmente empregada se a limitação de pH da membrana for 10 ou abaixo, ou se uma grande quantidade de depósito estiver presente. A enzima protease é comumente adicionada em detergentes enzimáticos (KRACK, 1995). Uma aplicação de enzimas, geralmente empregada com sucesso, é quando altas concentrações de proteínas estão presentes nos depósitos.

A utilização de enzimas na limpeza de membranas oferece algumas vantagens quando comparadas com os regimes tradicionais de limpeza (ácido ou básico) dentre elas, temos a maior biodegradabilidade, menor agressão às membranas e poucos problemas referentes à poluição.

Alguns problemas referentes ao uso de enzimas estão no fato delas possuírem limites de tolerância ao pH, a agentes surfactantes e detergentes (KUMAR; TIWARI, 1999).

- Agentes Quelantes

EDTA é um dos agentes complexantes utilizados para a remoção do *fouling* em sistemas de membranas filtrantes. Existem seis posições moleculares na molécula de EDTA que poderiam contribuir para a formação de ligações de hidrogênio e complexos com os materiais presentes nos depósitos localizados na superfície das membranas (MOHAMMADI et al., 2002).

- Desinfetantes e Sanitizantes

Muitos detergentes possuem características desinfetantes porém, a aplicação de um sanitizante é uma prática comum para a redução de microrganismos. Um sanitizante adequado não deve agredir as membranas e sua aplicação deve ser acessível a todas as partes do sistema, incluindo as regiões do concentrado e permeado das membranas (D'SOUZA; MAWSON, 2007).

Peróxido de hidrogênio e hipocloritos são desinfetantes efetivos que podem ser utilizados em muitos polímeros orgânicos utilizados na fabricação de membranas. A utilização de hipocloritos, entretanto, diminui a vida útil das membranas e sua utilização deve ser feita com cuidado. Dicloroisocianúrico é um sanitizante satisfatório mas, o dióxido de cloro, é pouco efetivo (BOHNER; BRADLEY; 1992). Produtos contendo ácido peracético são bons sanitizadores pois, são compatíveis com a maioria das membranas e podem passar através de membranas de osmose reversa, permitindo a sanitização do permeado. Produtos baseados em compostos quaternários de amônio e iodo, não podem ser utilizados, devido à sua adsorção na superfície das membranas, causando a queda do fluxo de permeado e danos nas membranas (KRACK; 1995).

- Cloreto de Sódio (NaCl)

A utilização de cloreto de sódio como agente de limpeza tem sido feita em diversas pesquisas de bancada, apresentando resultados significativos. De acordo com Ang et al. (2011), o cloreto de sódio mostrou-se efetivo na limpeza de amostras de membranas de osmose reversa colmatadas com matéria orgânica hidrofílica como o alginato.

- Água

Ciclos de limpeza de membranas consomem grande quantidade de água pura. Pré-filtros devem ser utilizados para remover sólidos em suspensão e contaminação bacteriológica; além de manter o nível de compostos orgânicos reduzidos para evitar o crescimento de biofilmes.

A presença de ferro, manganês, sílica e outros sais podem formar depósitos sobre as membranas, podendo alterar a atividade de agentes utilizados na limpeza química; devido a esses problemas, deve-se utilizar água deionizada (produzida por troca iônica) ou água permeada de osmose reversa durante o processo de limpeza.

Atualmente, outras metodologias de limpeza estão sendo estudadas como, por exemplo, a utilização de dióxido de carbono supercrítico (SC CO₂) para a remoção, principalmente, de matéria orgânica (*biofouling*) em superfícies de membranas de osmose reversa (MUN et al., 2012). O dióxido de carbono supercrítico não é tóxico, possui e é um potente antimicrobiano (MUN et al., 2012); porém, sua utilização é inviável devido ao alto custo na obtenção do dióxido de carbono neste estado.

7.5.1.3 Frequencia de Limpeza

Os fabricantes de membranas, geralmente, recomendam uma limpeza química quando:

- Ocorre uma queda do fluxo de permeado em 10%.
- A passagem de sais aumentar de 5-10%.
- Quando a diferença de pressão entre a alimentação e o concentrado aumentar de 10-15% (DOW, 2010-).

Na maioria dos casos, a limpeza só é realizada quando existe um maior impacto sobre os indicadores de performance (fluxo de permeado, pressão diferencial – alimentação e concentrado e passagem de sais) por diferentes razões. Deve ser considerado que os depósitos, geralmente, não se distribuem por igual sobre a superfície das membranas. Em outras palavras, uma queda do fluxo de permeado de 10% causada, por exemplo, por incrustação, não significa que todos os elementos têm uma perda de performance de 10%. A deposição de sais começa onde ocorre maior concentração (nos últimos elementos da planta) e ocorre muito pouco nos primeiros elementos. Isto significa que os últimos elementos, provavelmente, já possuem uma incrustação severa, enquanto que o fluxo de permeado de todo o sistema caiu apenas 10%. (KOLK et al., 2013).

7.5.1.4 Duração e os Passos de uma Limpeza

Para uma limpeza química adequada em membranas de osmose reversa, é importante verificar a composição química da água de alimentação, tentando entender como e se determinados componentes poderão formar o *fouling* nas membranas, além disso, uma autópsia adequada de elementos colmatados irá determinar o tipo de *fouling* predominante, auxiliando assim, na utilização correta de produtos químicos na limpeza.

Existem diferentes regimes de limpeza e a escolha do produto utilizado para esta finalidade irá depender do tipo de membrana, do produto tratado e do design do sistema (WAGNER, 1996). Um ciclo típico de limpeza, descrito por Tragardh (1989), consiste nos seguintes procedimentos: lavagem com água para remover os produtos, limpeza em um ou mais passos, lavagem com água para remover detergentes e depósitos remanescentes e uma desinfecção final.

O tempo de lavagem (utilizando água de permeado) depende do tamanho da planta do sistema, mas geralmente, o tempo utilizado varia entre 5 e 20 minutos; em plantas com pouca área de membrana o tempo pode ser menor, enquanto que em plantas de grande dimensão, um tempo maior é requerido (KRACK, 1995). Durante todo o processo de lavagem, o concentrado deve ser descartado, e a lavagem deve continuar até a corrente do concentrado ficar limpa e neutra. O aumento do fluxo devido à lavagem com água ocorre devido à remoção de materiais solúveis e adsorvidos. Além disso, uma lavagem efetiva é um importante processo do ciclo de limpeza pois, resíduos podem reduzir a eficácia de um agente de limpeza subsequente ou de um agente sanitizante (D'SOUZA; MAWSON, 2007).

A maioria dos regimes de limpeza consiste na utilização de uma solução básica seguida de uma solução ácida, utilizando a lavagem com água do permeado entre as etapas. Para membranas poliméricas, também é comum a utilização de uma solução básica com cloro depois da limpeza ácida pois, uma segunda limpeza alcalina, aumenta o fluxo de permeado (BOHNER E BRADLEY; 1992). O tempo de circulação de cada agente de limpeza depende do tamanho de cada planta e pode exceder trinta minutos em grandes sistemas de membranas; além disso, um aumento exagerado do tempo de limpeza pode diminuir o fluxo de permeado subsequente, mostrando que a variável tempo pode ser otimizada (MAKARDIJ et al., 1999).

Uma vez caracterizado o *fouling* sobre a membrana, um ou mais produtos químicos poderão ser utilizados na limpeza. Estes agentes podem ser preparados manualmente ou, comprados de empresas específicas. É comum a utilização de diferentes agentes químicos na limpeza química de membranas. Tipicamente, uma limpeza com pH alto é utilizada primeiro para a remoção de depósitos como óleo ou material biológico, seguida por uma limpeza com baixo pH objetivando a remoção de depósitos inorgânicos. Em alguns casos, esta sequência é invertida ou apenas uma solução de limpeza é requerida para a limpeza das membranas. Outros protocolos utilizam detergentes para a remoção de matéria e detritos orgânicos e agentes quelantes como o EDTA, utilizado para a remoção de material coloidal e incrustação de sulfato. A utilização incorreta da sequência desses produtos durante a limpeza, pode dificultar ainda mais a remoção dos depósitos (HYDRANAUTICS, 2011).

7.5.1.5 Aspectos Físicos para Limpeza de Membranas

Os principais parâmetros físicos que afetam os processos de limpeza são: temperatura, concentração (atividade química), energia mecânica (abrangendo combinações apropriadas de pressão e taxa de fluxo) e tempo. Para limpeza de membranas, o design do sistema, o tipo de depósito sobre as membranas, a qualidade da água e o material da membrana devem ser considerados quando se varia um ou mais parâmetros descritos acima (ANG et al., 2006).

7.5.1.6 Efetividade da Limpeza Química

A verificação de uma limpeza química adequada pode ser realizada por indicações indiretas como: composição, aspecto visual e cheiro da última porção da água de lavagem (RABILLER et. al., 2002). A autópsia de membranas é uma ferramenta importante que auxilia na verificação da eficácia de uma limpeza pois, utiliza métodos sofisticados como: microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X e espectroscopia de infravermelho; porém, esta técnica é destrutiva e não utilizada durante a rotina industrial. Daí a importância em se desenvolver metodologias que comprovem a eficácia de uma limpeza química in-situ.

Para aplicações em campo, a restauração do fluxo de permeado é a melhor maneira de se verificar a eficiência de uma limpeza química.

Praticamente não há pesquisas executadas com rigor científico de limpeza química de membranas de osmose reversa oriundas de plantas em operação comercial (real).

7.5.2 Objetivos

Verificar a ação de alguns compostos químicos utilizados em limpeza química de membranas (HCl, NaOH, EDTA e SDS) em elementos de osmose reversa industriais colmatados, predominantemente, por diferentes tipos de *fouling*, e em bactérias presentes em biofilmes formados em amostras de membranas contidas em células de fluxo.

7.5.3 Materiais e Métodos

7.5.3.1 Limpeza Química em Membranas de Uso Industrial Colmatadas

7.5.3.1.1 Amostras de Membrana

As amostras foram coletadas de três diferentes elementos de osmose reversa colmatados enviados por diferentes empresas para autópsia. Estas foram cortadas, de diversas regiões dos elementos (entrada e saída), e mantidas em geladeira até o procedimento de limpeza química de bancada.

7.5.3.1.2 Autópsia dos Elementos

A caracterização do *fouling* na superfície das membranas foi feita pelas seguintes análises: quantificação de peso seco, material orgânico, proteínas, carboidratos, unidades formadoras de colônia e análise elementar por fluorescência de raios X.

7.5.3.1.3 Limpeza Química de Bancada (análise qualitativa)

Para o teste de limpeza química de bancada foi utilizado um béquer e um agitador magnético para simular um fluxo tangencial sobre a superfície das membranas. Durante o procedimento de limpeza química, as amostras de membrana foram fixadas utilizando fita adesiva na parede do béquer, mantendo-as fixas (Figura 45).



Figura 45 - Amostras de membranas de osmose reversa durante o procedimento de limpeza química de bancada.

7.5.3.1.4 Reagentes Utilizados na Limpeza Química

Os reagentes utilizados foram: solução de ácido clorídrico (Synth, pH = 2), solução de hidróxido de sódio (Synth, pH = 12), ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (Synth, 2 mM) e dodecil sulfato de sódio (Synth, 10 mM). As soluções foram preparadas utilizando água mili-Q.

7.5.3.1.5 Procedimentos de Limpeza

Diferentes tempos foram testados para cada solução utilizada na limpeza (10, 20 e 30 minutos). Testes de combinação de soluções também foram realizados (ácido + base, base + ácido, EDTA + ácido, EDTA + base, SDS + ácido e SDS + base). Água mili-Q foi utilizada por

10 minutos antes, entre (quando mais de uma solução foi utilizada) e após a utilização das soluções de limpeza.

7.5.3.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca FEI, modelo Quanta 600 FEG para uma visualização mais detalhada da ação das soluções na remoção do *fouling*.

7.5.3.2 Teste de Limpeza Química em Bactérias Contidas em Biofilmes

7.5.3.2.1 Amostras de Membranas

As amostras utilizadas no experimento foram obtidas de um elemento de osmose reversa novo (Modelo: RE-70-1812) (Figura 46). Foram montadas células de fluxo contendo estas amostras para a montagem do sistema utilizado no experimento (Figura 47).

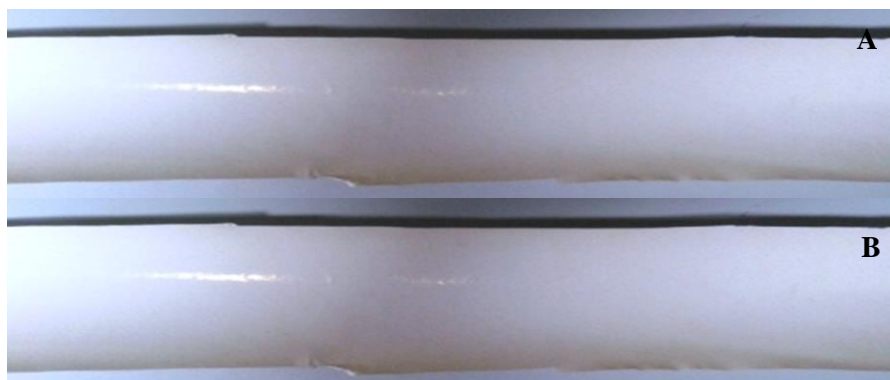


Figura 46 - Elemento de osmose reversa novo (A) utilizado para obtenção de amostras (B).



Figura 47 - Duas células de fluxo montadas com amostras de membranas limpas dentro.

7.5.3.2.2 Sistema para Crescimento de Biofilme Complexo

Após a montagem das células de fluxo, estas foram levadas até o galpão montado na raia olímpica da USP para serem conectadas, em paralelo, a tubulações por onde água bruta da raia olímpica pudesse circular constantemente nestas células de fluxo para a formação de biofilmes sobre as amostras de membranas (Figura 48). O fluxo de água em cada célula foi de 8 L/h.

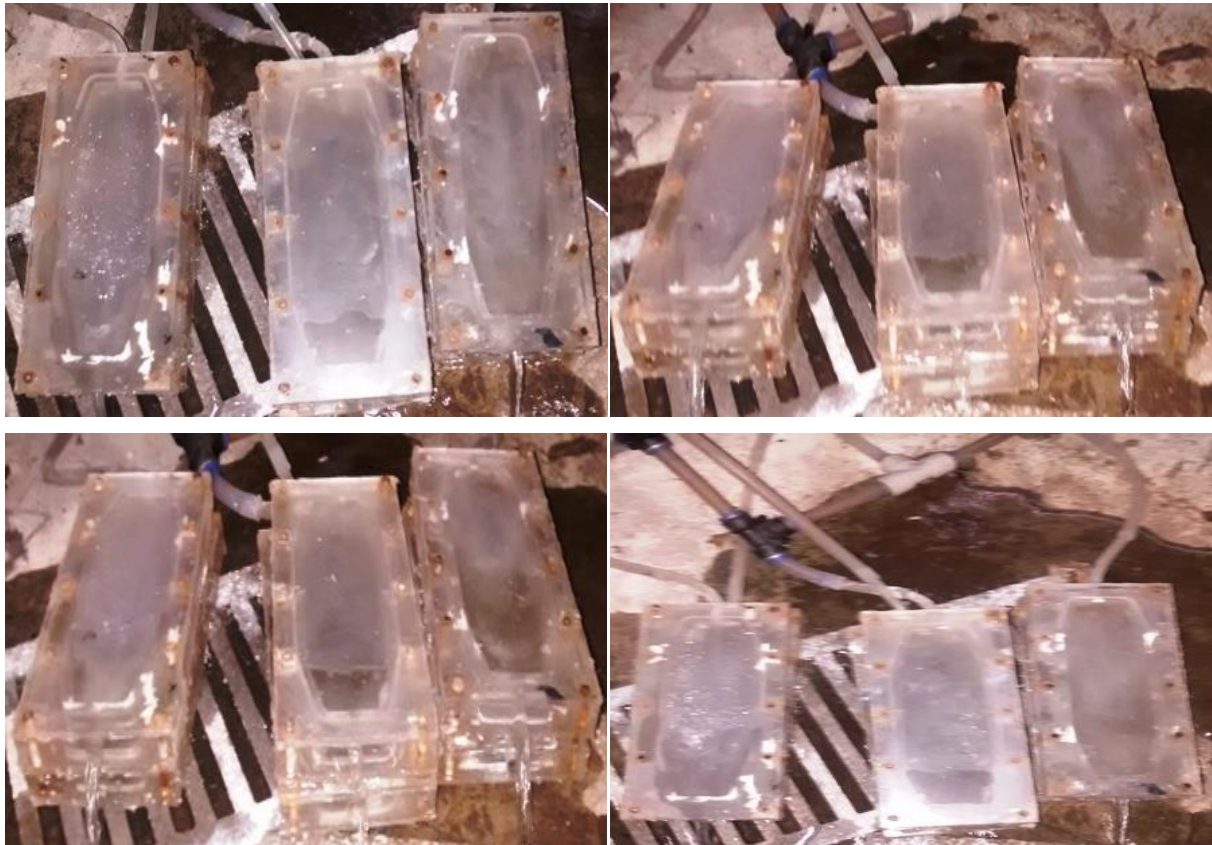


Figura 48 - Sistema montado na raia olímpica da USP para o crescimento de biofilmes.

7.5.3.2.3 Compostos Químicos Testados

Foram testados os seguintes compostos químicos para limpeza das amostras de membranas após crescimento de biofilmes: ácido clorídrico (pH = 2), hidróxido de sódio (pH = 12), EDTA (2 mM) e SDS (10 mM). Para cada composto testado, foram utilizadas 6 células de fluxo que ficaram conectadas no sistema por 15 dias ininterruptos para o crescimento de biofilmes.

7.5.3.2.4 Procedimento para Limpeza Química das Amostras

A limpeza química das amostras foi realizada em béquer com agitação magnética para simular um fluxo tangencial na superfície das membranas (Figura 49). As amostras foram fixadas em uma das extremidades do recipiente, com fita adesiva, para mantê-las fixas na parede do béquer durante o procedimento de limpeza.

7.5.3.2.5 Procedimento para Teste de Limpeza e Recuperação Microbiana

Os procedimentos para o teste de cada produto químico utilizado foram os seguintes:

- 2 células de fluxo: foram retiradas as amostras após 15 dias em contato com água da raia olímpica da USP, trituradas com 200 mL de água destilada em liquidificador, na potência máxima por 3 minutos, para o desprendimento e desagregação do biofilme e feita a contagem de células viáveis em meio R2A (Merk).
- 2 células de fluxo: foram retiradas as amostras após 15 dias em contato com água da raia, feita a lavagem das amostras com o produto químico (na temperatura ambiente) a ser testado em béquer por 30 minutos (Figura 49) e, posteriormente, estas foram trituradas em liquidificador para posterior contagem de células viáveis em meio R2A (Merk).
- 2 células de fluxo: foram retiradas as amostras após 15 dias em contato com água da raia olímpica, feita a lavagem das amostras com o produto químico a ser testado em béquer por 30 minutos, remontagem das células de fluxo com as amostras após lavagem e montagem de um sistema para circulação da água da raia olímpica autoclavada nestas células por quinze dias ininterruptos (Figura 50) para, logo em seguida, fazer a trituração das amostras e contagem de células viáveis em meio R2A (Merk). O reservatório contendo água da raia autoclavada foi trocado de dois em dois dias.

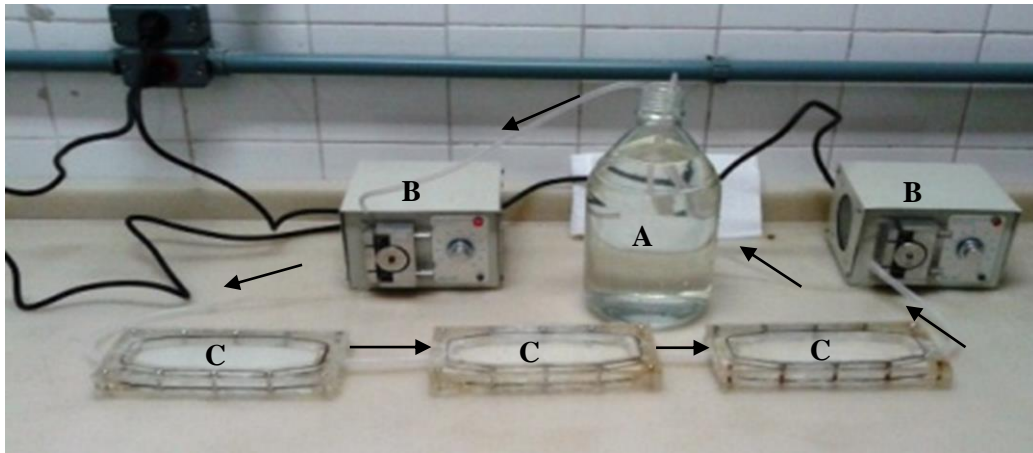


Figura49 - Sistema de circulação de água da raia autoclavada nas amostras de membrana após lavagem química. Reservatório (A), bombas peristálticas (B) e células de fluxo (C).

7.5.3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca FEI, modelo Quanta 600 FEG, para uma visualização mais detalhada da formação de biofilme nas amostras após 15 dias em contato com água bruta da raia olímpica.

7.5.4 Resultados e Discussão

7.5.4.1 Limpeza Química em Membranas de Uso Industrial Colmatadas

7.5.4.1.1 Caracterização do Fouling do Elemento Analisado

O objetivo desta análise foi verificar a causa da colmatagem dos elementos analisados. Os diferentes elementos foram denominados elementos 1, 2 e 3.

A tabela 24 mostra os resultados obtidos de peso seco, porcentagem de matéria orgânica, unidades formadoras de colônia e quantificação de proteínas e carboidratos nas amostras de membranas analisadas. Grande parte do fouling presente nos elementos 2 e 3 foi de origem orgânica; já o elemento 1, apresentou predominância de fouling inorgânico.

Tabela 14 - Caracterização do fouling nas amostras de membranas.

Amostras	Peso Seco (mg/cm ²)	% Matéria Orgânica *	UFC (colônias/cm ²) ^a	% proteínas *	% carboidratos *
Elemento 1	0,67 ± 0,14	19,5 ± 1,64	1,32 x 10 ⁴	6,8 ± 1,2	1,9 ± 0,37
Elemento 2	0,44 ± 0,09	56,1 ± 12,8	1,61 x 10 ⁵	1,06 ± 0,27	15,61 ± 5,38
Elemento 3	0,72 ± 0,09	47,0 ± 6,3	1,23 x 10 ⁵	0,46 ± 0,07	7,61 ± 0,08

* Porcentagem referente ao peso seco.

^a Desvio padrão de ± 30%.

Na quantificação elementar, os teores apresentados foram determinados por análise semi-quantitativa sem padrões com análise de elementos químicos de flúor a urânio, em espectrômetro por fluorescência de raios x (Tabela 25). Esta análise evidenciou uma quantidade predominante de compostos contendo alumínio, silício e ferro nos três elementos. Grande quantidade de cálcio também foi encontrada no *fouling* proveniente do elemento 1.

Tabela 15 - Análise semi-quantitativa, valores expressos em % de óxidos, normalizados a 100%.

Amostra de Fouling	Elemento 1 (%)	Elemento 2 (%)	Elemento 3 (%)
Al ₂ O ₃	30,9	11,1	16,2
SiO ₂	25,13	44,6	54,4
P ₂ O ₅	2,6	3,70	5,08
SO ₃	5,4	3,44	1,90
Cl	0,15	0,59	0,35
K ₂ O	0,33	1,53	2,46
CaO	21,9	1,42	1,60
TiO ₂	2,29	0,80	1,77
Cr ₂ O ₃	0,05	6,57	2,30
MnO	0,08	0,24	0,12
Fe ₂ O ₃	10,25	19,6	11,2
NiO	0,13	0,84	0,18
CuO	0,02	0,78	0,31
ZnO	0,69	0,15	0,07
SrO	0,02	nd	0,01
SnO ₂	0,02	2,02	0,18
Na ₂ O	Nd	0,56	0,66
MgO	Nd	1,90	1,85

nd = elemento não detectado.

A autópsia mostrou que o elemento 1 colmatou, principalmente, por *fouling* inorgânico e/ou coloidal. O alto conteúdo de cálcio ocorreu pela grande concentração de íons cálcio e contra-íons na água de alimentação, que aumentou ainda mais devido à permeação da água pelos elementos de membrana, excedendo o limite de solubilidade de alguns sais de cálcio (como o CaSO_4), que precipitaram. A presença de ferro e alumínio ocorreu, provavelmente, por problemas no pré-tratamento da água de alimentação, onde sais de alumínio e ferro são utilizados em processos de coagulação e floculação; estes elementos também podem estar associados ao silício e oxigênio nos silicatos. O silício presente, provavelmente, ocorreu na forma de silicatos e sílica. A sílica além de ser abundante, é de difícil tratamento depositando-se nas membranas, geralmente, na forma polimerizada (PEÑA et al., 2013).

A colmatação do elemento 2 foi causada por material orgânico e inorgânico em proporções semelhantes. Grande parte da matéria orgânica presente foi devido à presença de carboidratos. De acordo com Liu e Fang (2005), o EPS produzido pelos microrganismos do biofilme é composto, predominantemente, de carboidratos. O cheiro de amônia verificado neste elemento pode ser devido à presença de microrganismos, como cianobactérias, presentes no tanque de alimentação, que fixam nitrogênio, transformando-o em amônia, que em água, forma íons amônio (TORTORA, 2003). Quanto ao material inorgânico observado, a grande quantidade de silício observada está relacionada com a presença de sílica e silicatos na água de alimentação. A presença de ferro e alumínio deve-se a utilização de compostos como sulfato de alumínio e cloreto férrico no pré-tratamento da água de alimentação e na presença destes nos silicatos (FAROOK e SHEIKH, 2013). *Verificar comentário acima*

Grande parte dos depósitos contidos no elemento 3 foi de origem orgânica porém, provavelmente, houve uma predominância de matéria orgânica natural como ácidos húmicos e fúlvicos (pouca quantidade de carboidratos, indicando pouca quantidade de EPS e, conseqüentemente, pouco biofilme formado). Quanto ao material inorgânico observado, a grande quantidade de silício observada está relacionada, também, com a presença de sílica e silicatos na água de alimentação. A presença de ferro e alumínio deve-se a utilização de compostos como sulfato de alumínio e cloreto férrico no pré-tratamento da água de alimentação e na presença destes nos silicatos.

7.5.4.1.2 *Teste de Limpeza Química*

Este teste foi realizado visando verificar a ação de diferentes produtos químicos, em diferentes combinações, com tempos de ação variados, na remoção do *fouling* presente nas amostras das membranas analisadas.

7.5.4.1.2.1 *limpeza ácida*

A utilização de uma solução de ácido clorídrico em pH 2 mostrou-se eficaz na remoção de boa parte do depósito contido nas amostras do elemento 1. Observou-se uma maior remoção aumentando-se o contato da amostra com a solução ácida. O melhor resultado foi observado após 30 minutos de limpeza, no qual boa parte do *fouling* foi removida (Figura 51). As amostras provenientes dos elementos 2 e 3 não apresentaram remoção mesmo após 30 minutos de contato.

7.5.4.1.2.2 *limpeza alcalina*

O teste de limpeza utilizando uma solução de hidróxido de sódio com pH de 12 não foi muito eficiente na remoção dos depósitos presentes nas amostras dos três elementos de membranas, como observado na figura 52. Mesmo após 30 minutos de contato com a solução de hidróxido de sódio, nenhuma remoção visível foi observada.

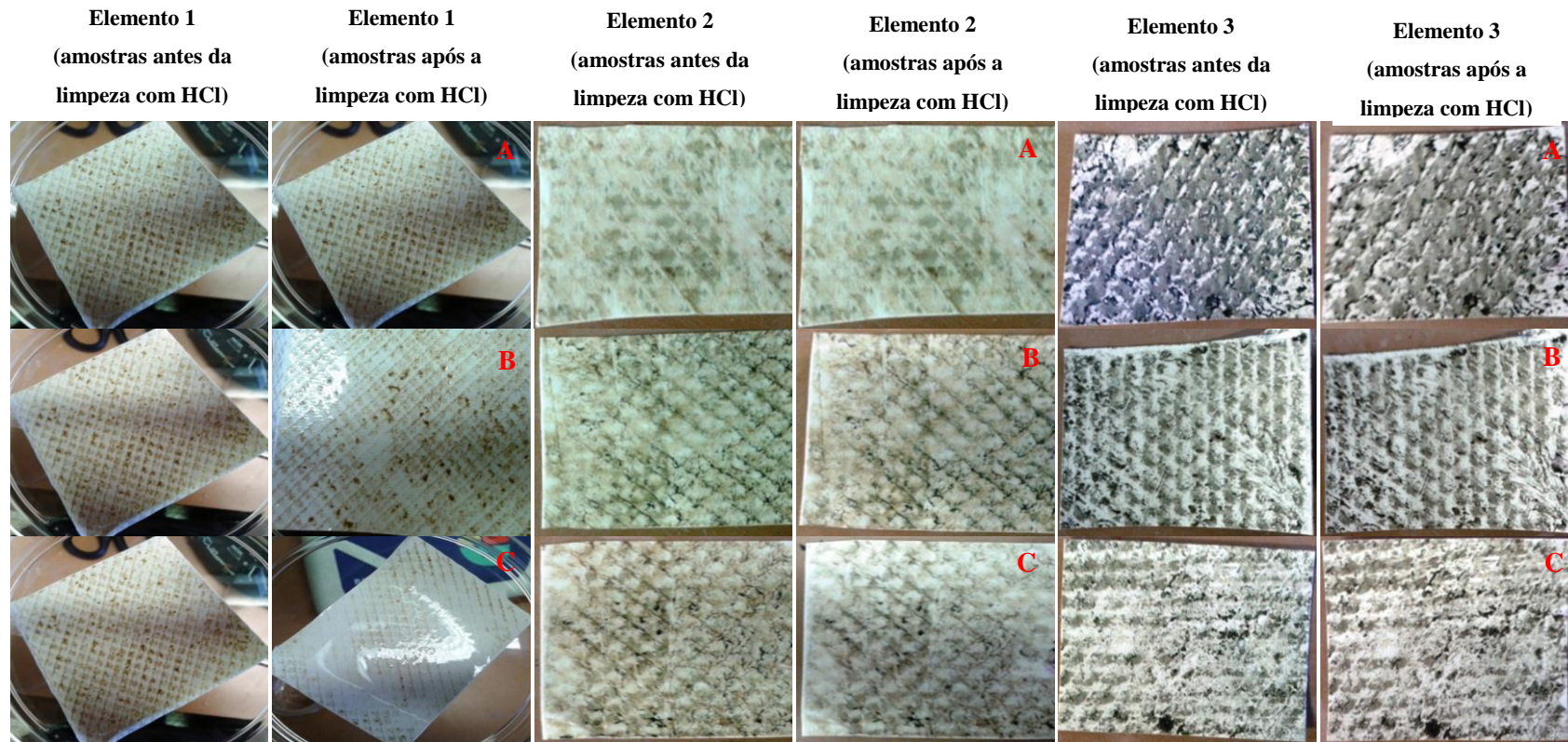


Figura 49 - Limpeza química das amostras de membranas utilizando solução de ácido clorídrico em pH 2. As figuras das amostras após a utilização da solução ácida referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

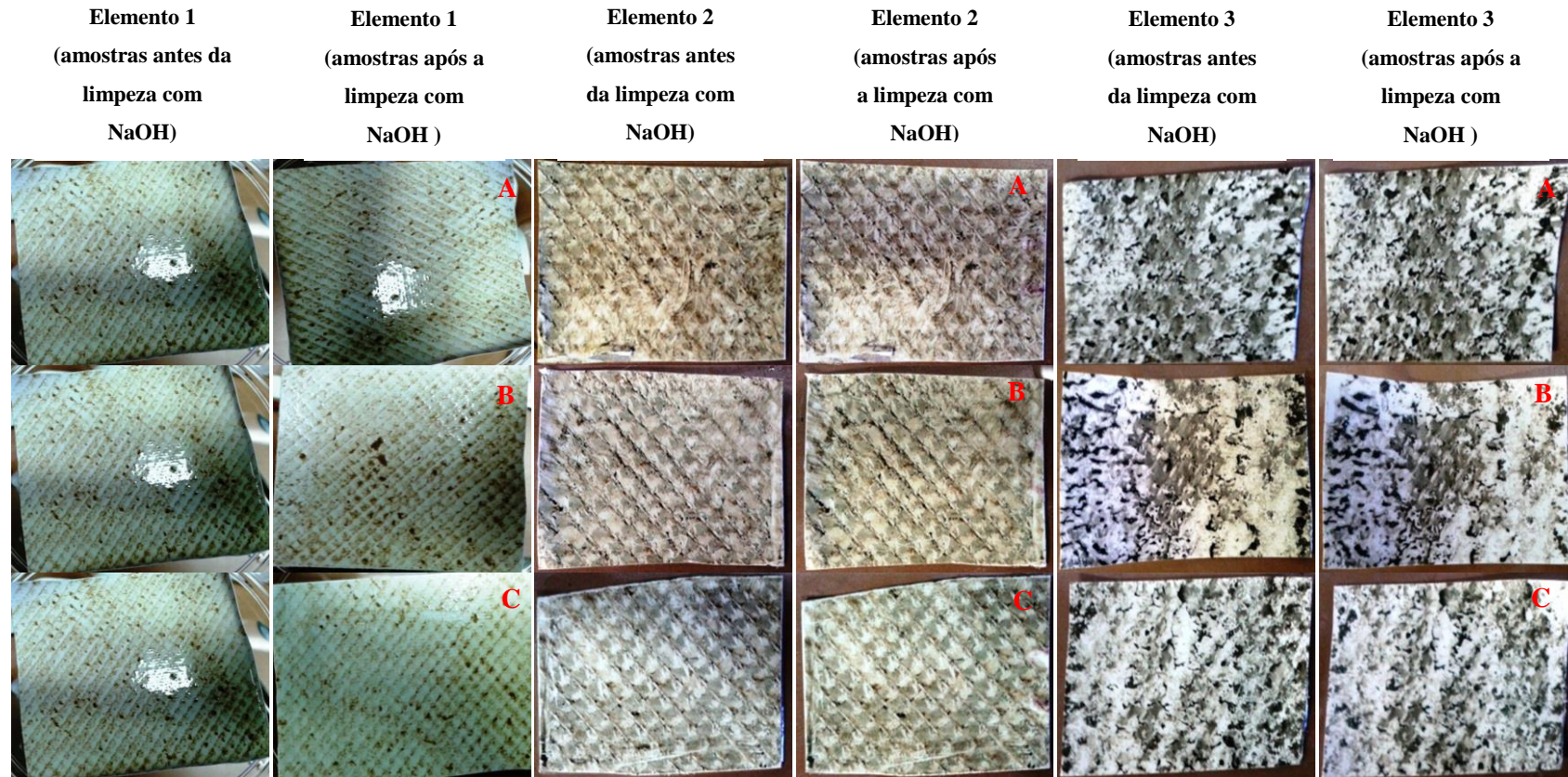


Figura 50 - Limpeza química das amostras de membrana utilizando solução de hidróxido de sódio em pH 12. As figuras das amostras após a utilização da solução alcalina referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos (imagens de cima para baixo).

7.5.4.1.2.3limpeza (Ácido + Base)

A utilização da combinação de duas soluções (ácida e básica) no procedimento de limpeza apresentou remoção do *fouling* com apenas 10 minutos de limpeza em cada solução nas amostras dos elementos 1 e 3. Após 30 minutos de contato em cada solução, as amostras dos três elementos apresentaram remoção considerável, principalmente, nas amostras dos elementos 1 e 2, no qual houve uma remoção de depósitos em toda região das amostras (Figura 53).

7.5.4.1.2.4limpeza (Base + Ácido)

A inversão das soluções utilizadas na limpeza das amostras de membranas colmatadas do item 4.1.2.3, apresentou remoção nas amostras dos elementos 1 e 2. No primeiro elemento, houve remoção a partir de 20 minutos de limpeza em cada solução; já no segundo, apenas com 30 minutos de contato em cada solução observou-se remoção de parte dos depósitos. Nas amostras do elemento 3 não foi observado remoção do *fouling* mesmo após 30 minutos de contato em cada solução (Figura 54).

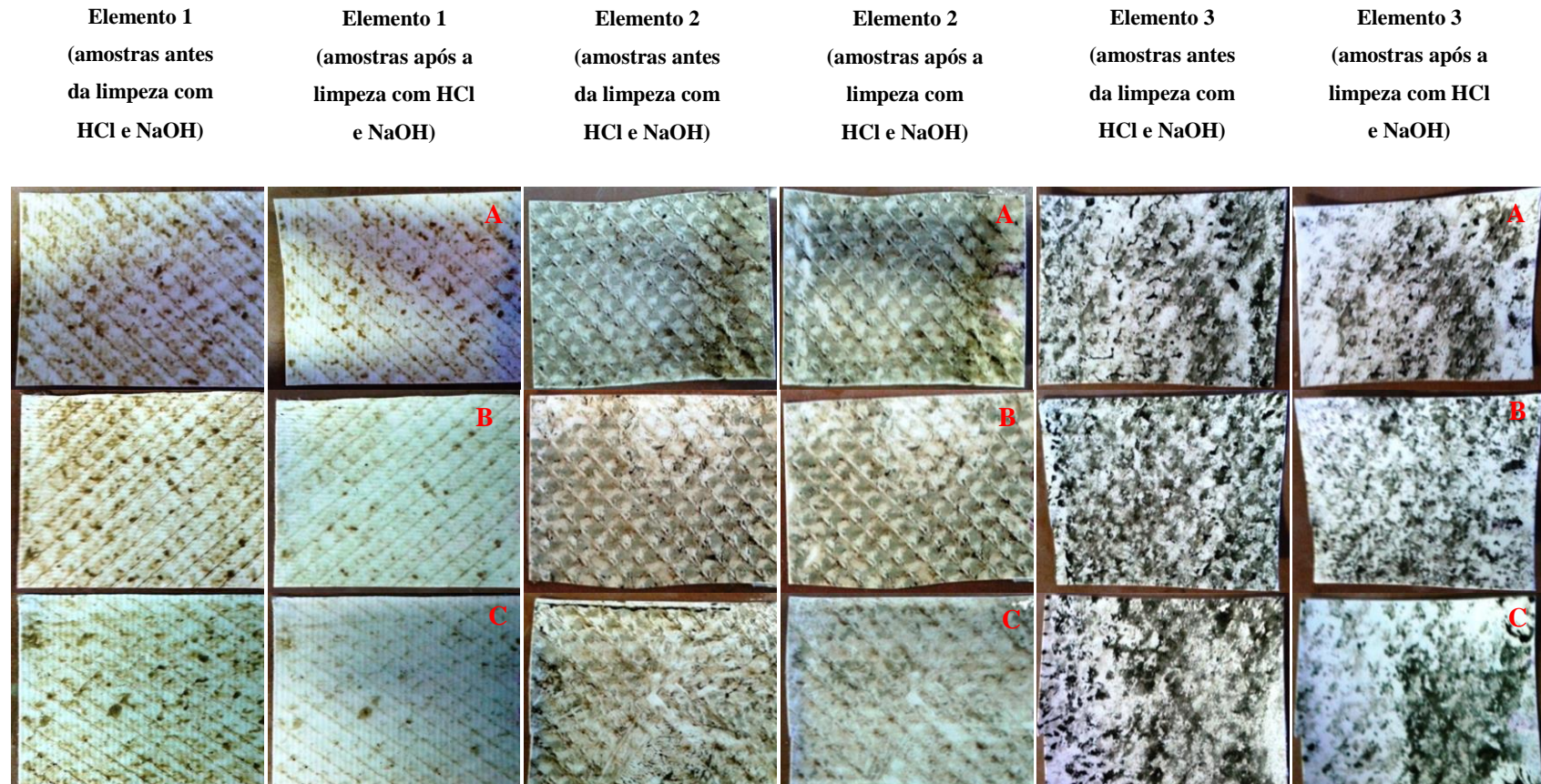


Figura 51 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de ácido clorídrico em pH 2 e, posteriormente, uma solução de hidróxido de sódio em pH 12. As figuras das amostras após a utilização das soluções de limpeza referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

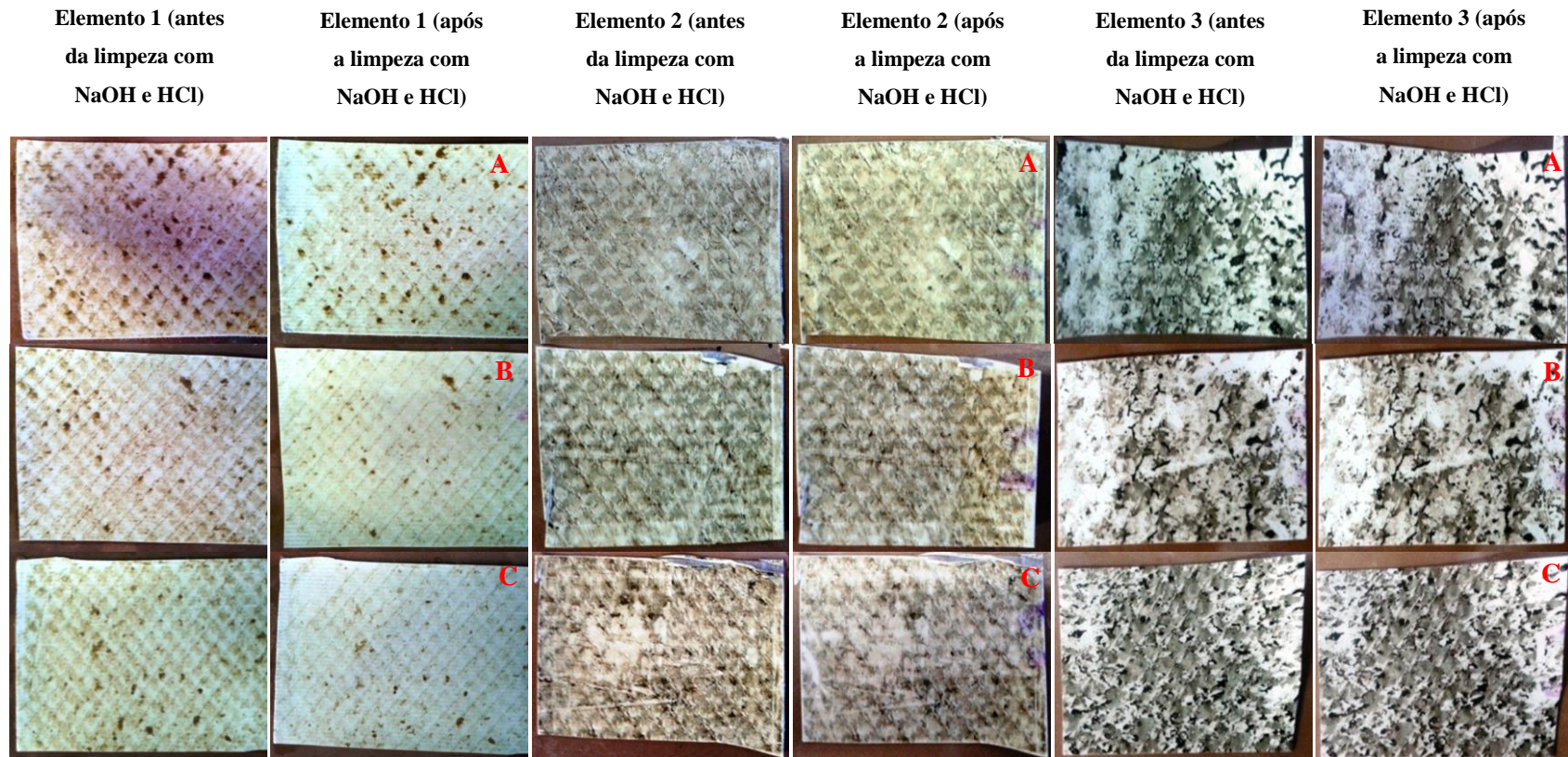


Figura 52 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de hidróxido de sódio em pH 12 e, posteriormente, uma solução de ácido clorídrico em pH 2. As figuras das amostras após a utilização das soluções de limpeza referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

7.5.4.1.2.5limpeza com EDTA

A utilização de EDTA como solução de limpeza das amostras de membranas apresentou redução dos depósitos nas amostras do elemento 2 a partir de 20 minutos de limpeza; as amostras dos demais elementos não apresentaram remoção visível (Figura 55).

7.5.4.1.2.6limpeza (EDTA + Ácido)

O método de limpeza utilizando uma solução ácida de ácido clorídrico ($\text{pH} = 2$) após a utilização de uma solução de EDTA mostrou, visualmente, uma remoção em algumas regiões após 30 minutos em cada solução nas amostras do elementos 1 (Figura 56). Esta combinação de compostos químicos não mostrou eficácia na remoção dos depósitos das amostras dos elementos 2 e 3.

7.5.4.1.2.7limpeza (EDTA + Base)

O mesmo procedimento de limpeza utilizado no item anterior, porém, com a utilização de solução de hidróxido de sódio ($\text{pH} = 12$) ao invés de HCl não mostrou resultados satisfatórios de remoção, mesmo após 30 minutos de contato com cada solução nas amostras do elemento 1. Houve uma remoção significativa dos depósitos nas amostras dos elementos 2 e 3 a partir de 20 minutos de contato em cada solução (Figura 57).

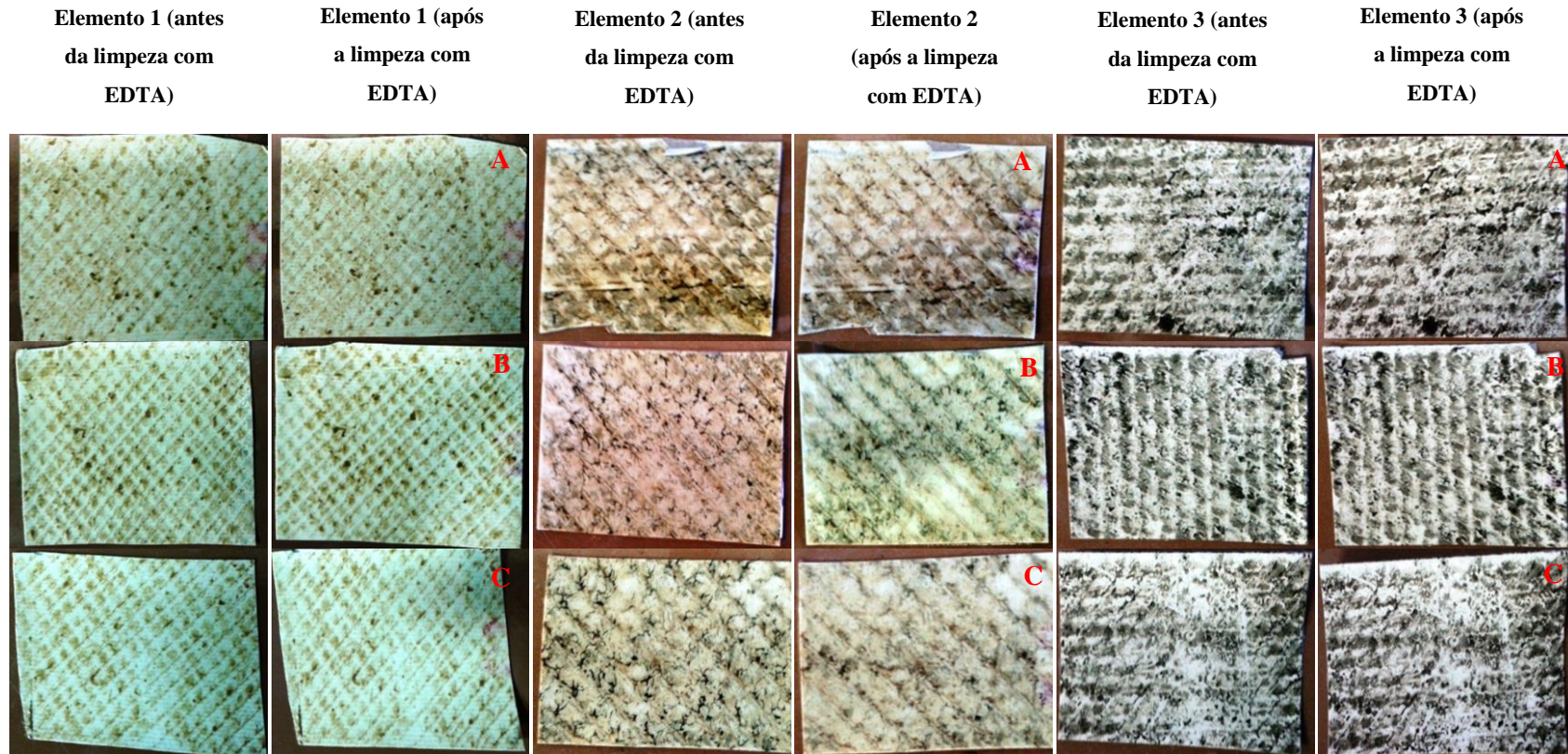


Figura 53 - Limpeza química de membrana utilizando solução de EDTA. As figuras das amostras após a utilização da solução de EDTA referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

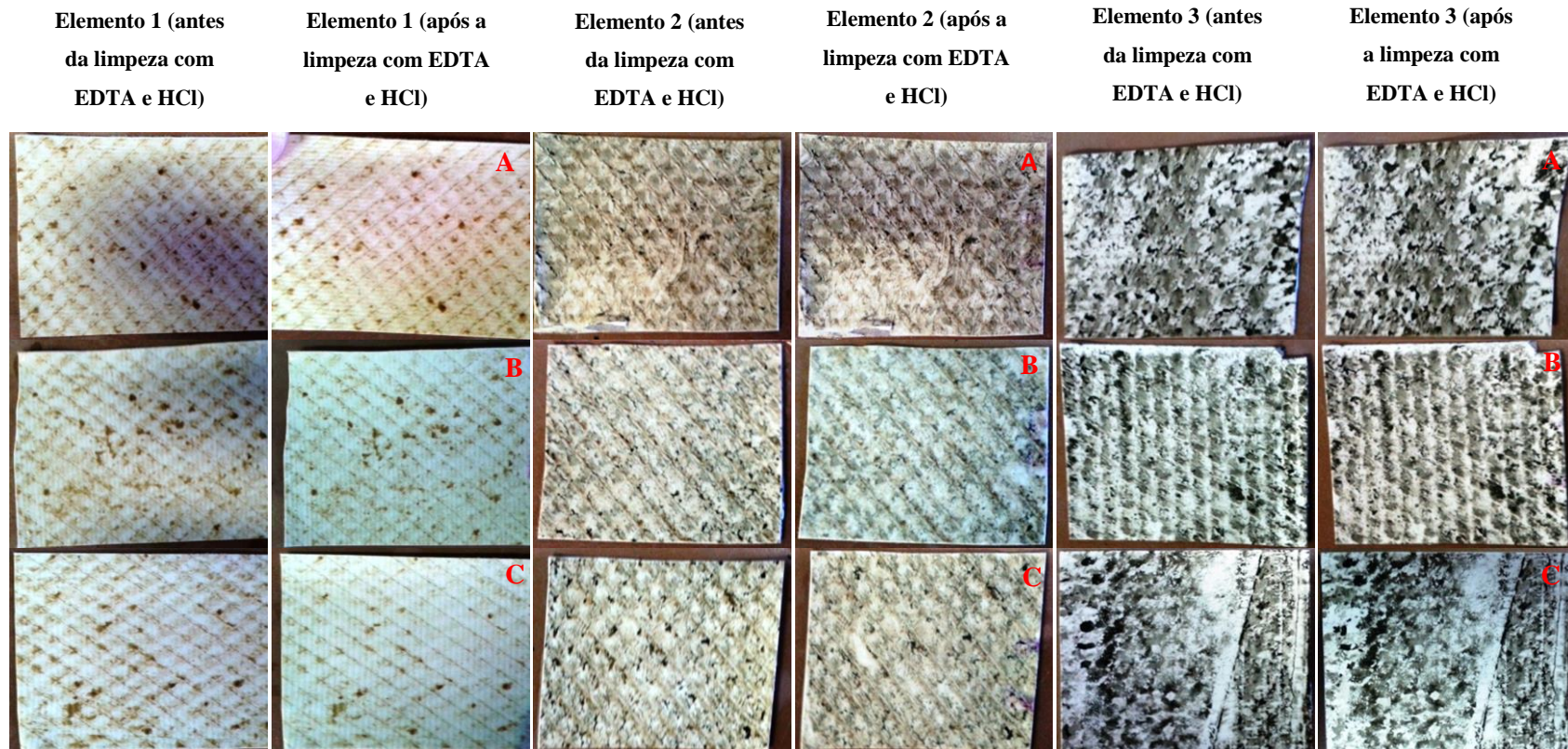


Figura 54 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de EDTA e, posteriormente, uma solução de ácido clorídrico em pH 2. As figuras das amostras após a utilização da solução de EDTA e HCl referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

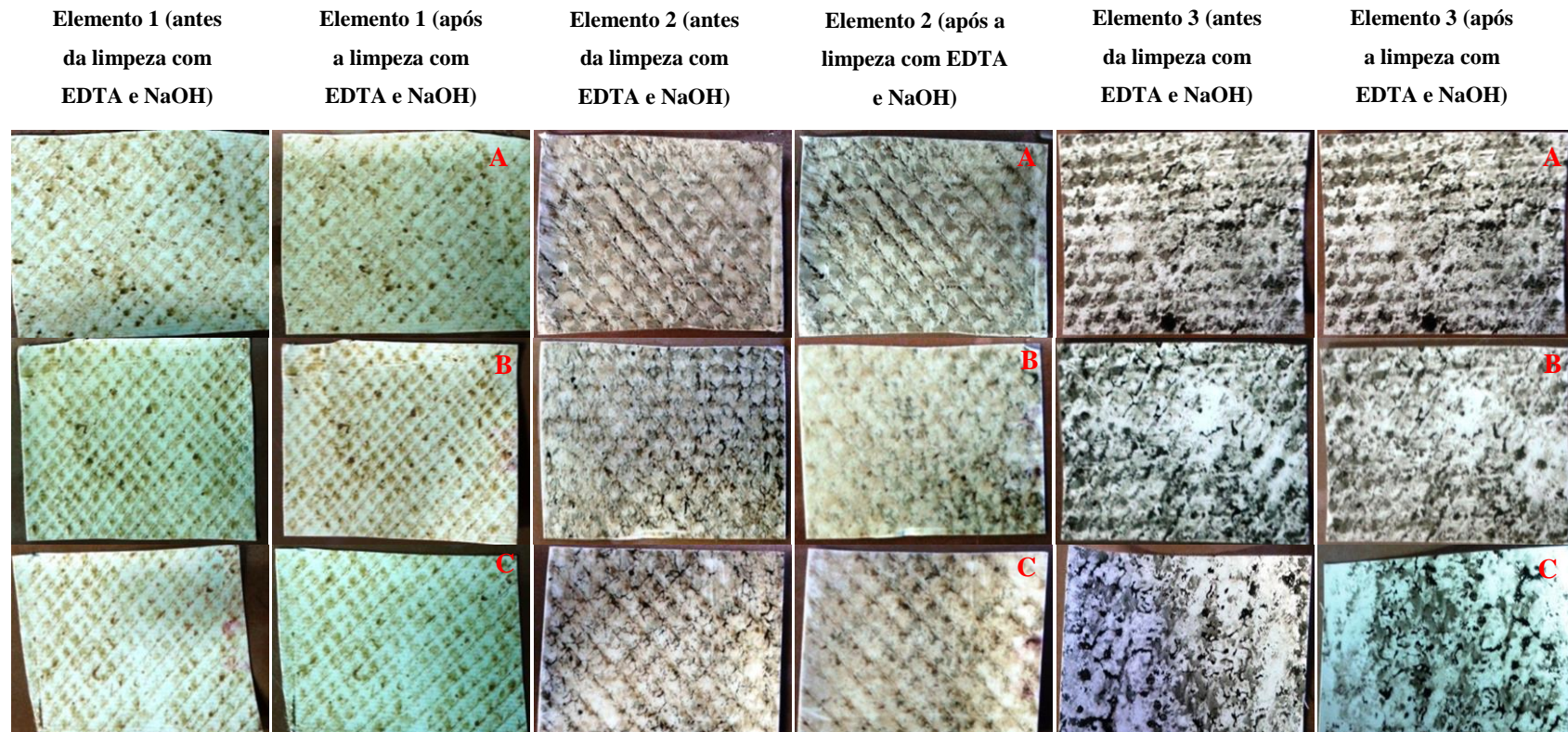


Figura 55 - Limpeza química de membrana utilizando primeiro, uma solução de EDTA e, posteriormente, uma solução de hidróxido de sódio em pH 12. As figuras das amostras após a utilização da solução de EDTA e NaOH referem-se a tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

7.5.4.1.2.8limpeza com SDS

A utilização de um surfactante aniônico na limpeza das amostras de membranas não apresentou remoção do *fouling* das amostras dos três elementos mesmo após 30 minutos de contato (Figura 58).

7.5.4.1.2.9limpeza (SDS + Ácido)

A ação das soluções de SDS e ácido clorídrico ($\text{pH} = 2$) não mostrou eficácia na remoção do *fouling* sobre as amostras de membrana dos três elementos após 30 minutos de ação (Figura 59).

7.5.4.1.2.10limpeza (SDS +Base)

A ação das soluções de SDS e hidróxido de sódio ($\text{pH} = 12$) não mostrou eficácia na remoção do *fouling* sobre as amostras de membranas após 30 minutos de ação (Figura 60).

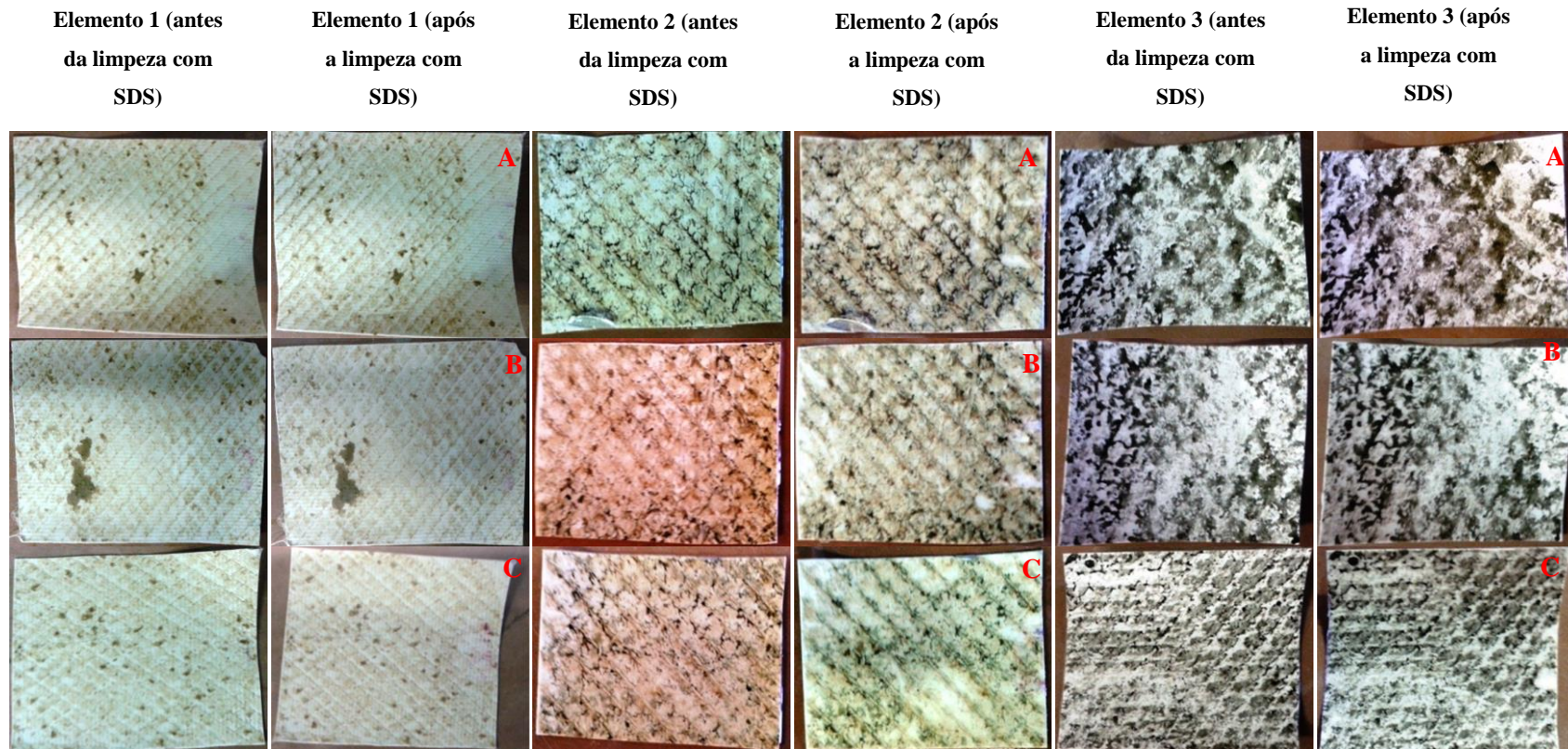


Figura 56 - Limpeza química de membrana utilizando uma solução de SDS 10 mM. As figuras das amostras após limpeza referem-se a tempos de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos de contato com a solução de SDS.

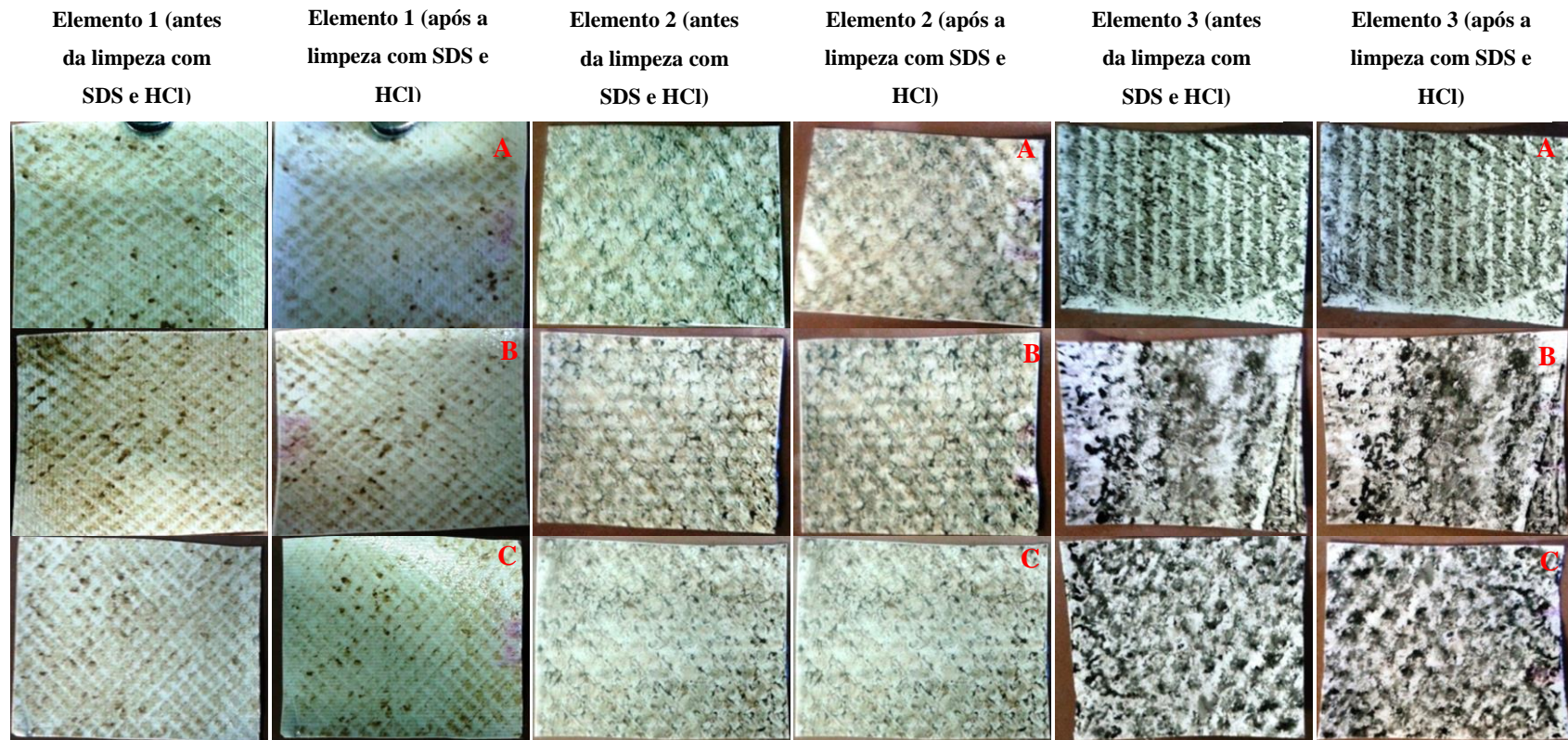


Figura 57 - Limpeza química de membrana utilizando uma solução de SDS e uma solução de ácido clorídrico com $\text{pH} = 2$. As figuras das amostras após limpeza referem-se a tempos de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos de contato com a solução de SDS e HCl.

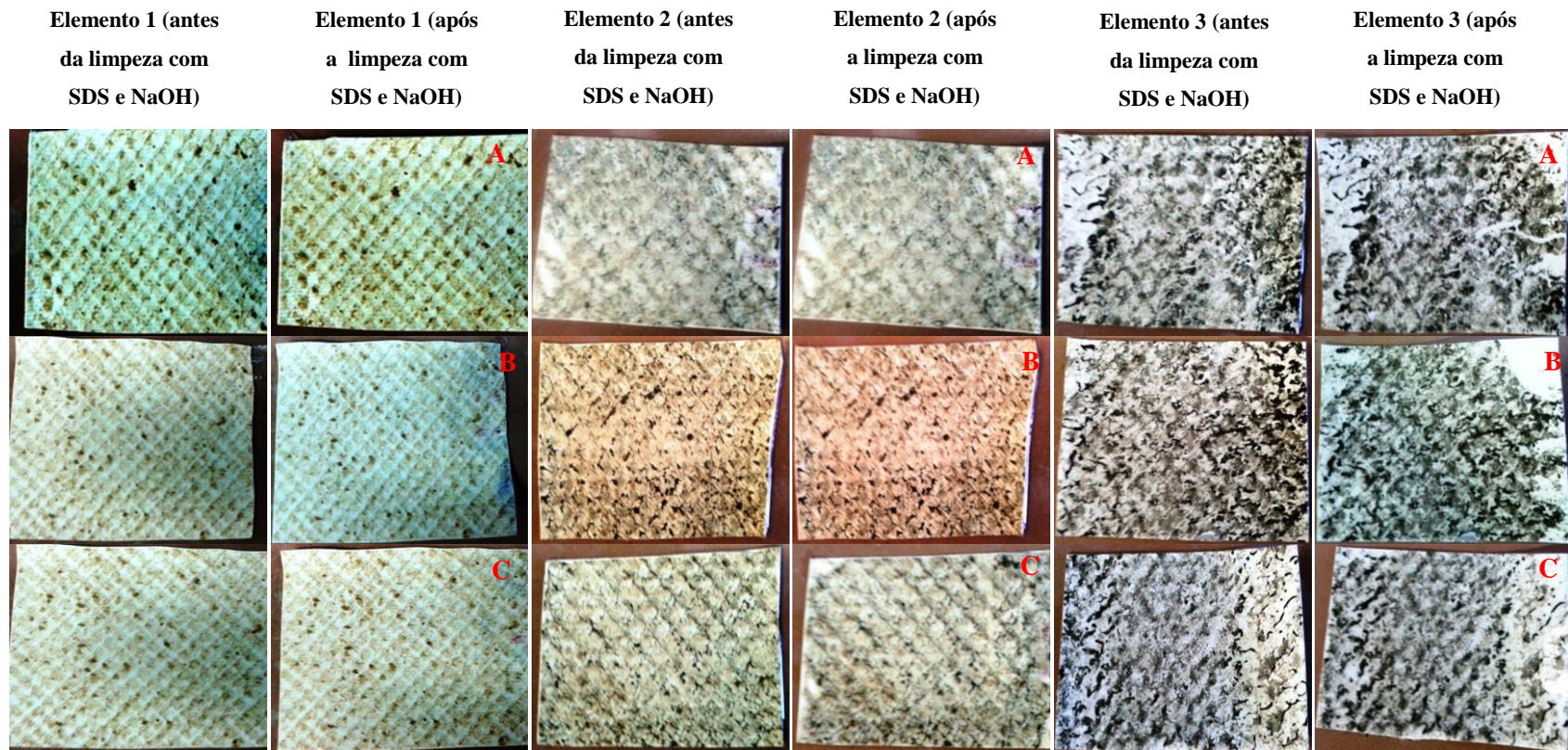


Figura 58 - Limpeza química de membrana utilizando uma solução de SDS e uma solução de hidróxido de sódio pH = 12. As figuras das amostras após a lavagem são referentes aos tempos de limpeza de 10 (A), 20 (B) e 30 (C) minutos.

7.5.4.1.3 Microscopia das Amostras após Limpeza

A microscopia eletrônica foi utilizada para verificar se houve, realmente, uma remoção efetiva da camada de *fouling* nas regiões das amostras, que visualmente, apresentaram uma boa remoção durante os diferentes processos de limpeza, além de verificar se não houve danos à membrana, devido à utilização das diversas soluções.

7.5.4.1.3.1 elemento 1

A figura 61 mostrou uma visão geral das amostras do elemento 1 após os trinta minutos das diferentes soluções de limpeza empregadas. A observação das micrografias eletrônicas de varredura mostrou que as amostras que foram limpas utilizando uma combinação de ácido e base apresentaram uma menor quantidade de depósitos em suas superfícies. O procedimento utilizando apenas HCl na limpeza, também mostrou pouca quantidade de depósitos.

Uma observação mais detalhada foi obtida com aumento de 15000 vezes das amostras. Este aumento evidenciou que as amostras que foram lavadas com uma solução de HCl e uma combinação de ácido e base e/ou base e ácido apresentaram regiões onde todo o *fouling* foi removido da superfície das amostras, permitindo a visualização da superfície da membrana limpa. A combinação de EDTA e HCl não foi eficaz na remoção do *fouling*, apesar de macroscopicamente, ter apresentado remoção (Figura 62).

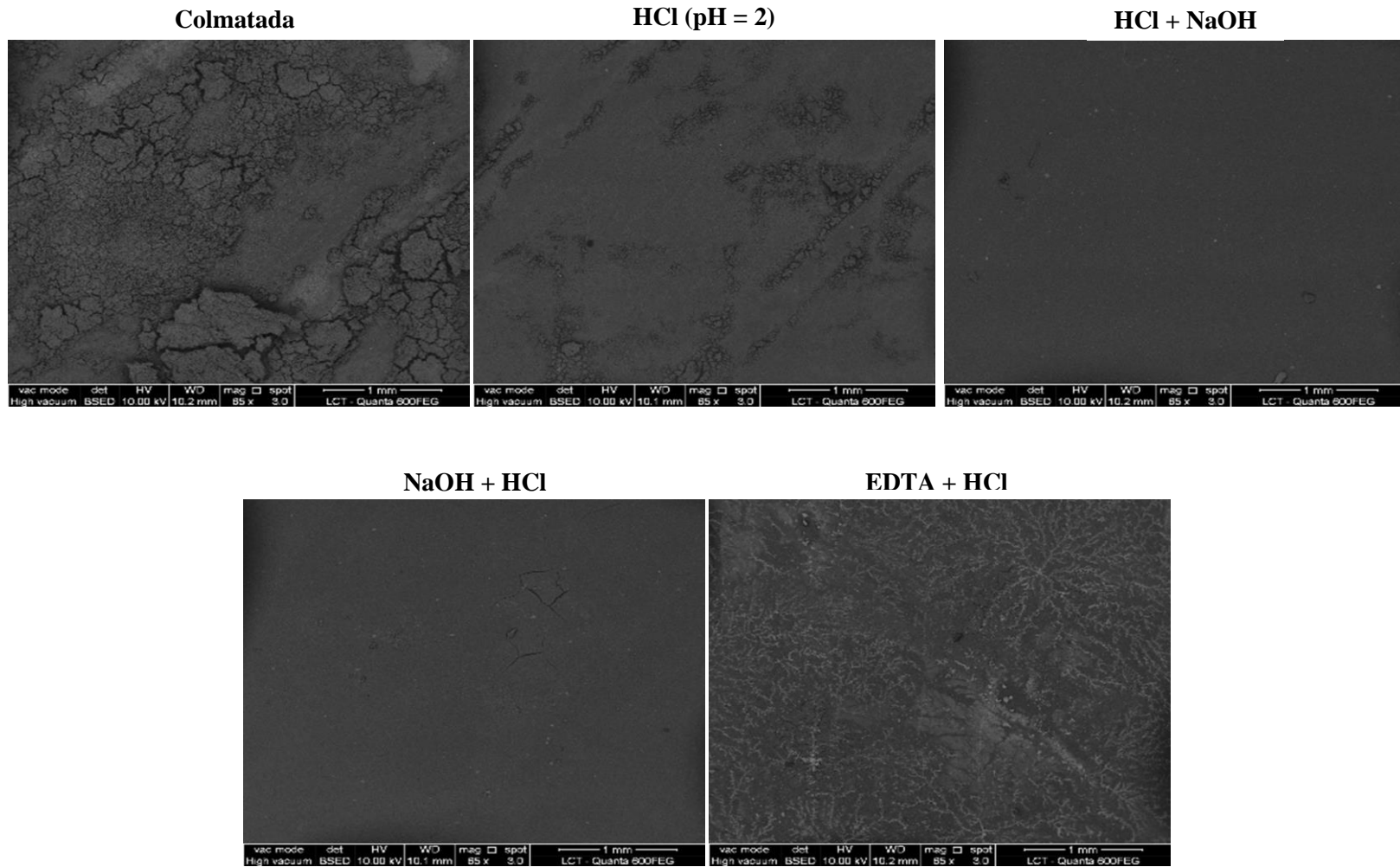


Figura 59 - Micrografias eletrônicas de varredura das amostras do elemento 1 com 65 X de aumento após diferentes soluções empregadas na remoção do *fouling* das amostras.

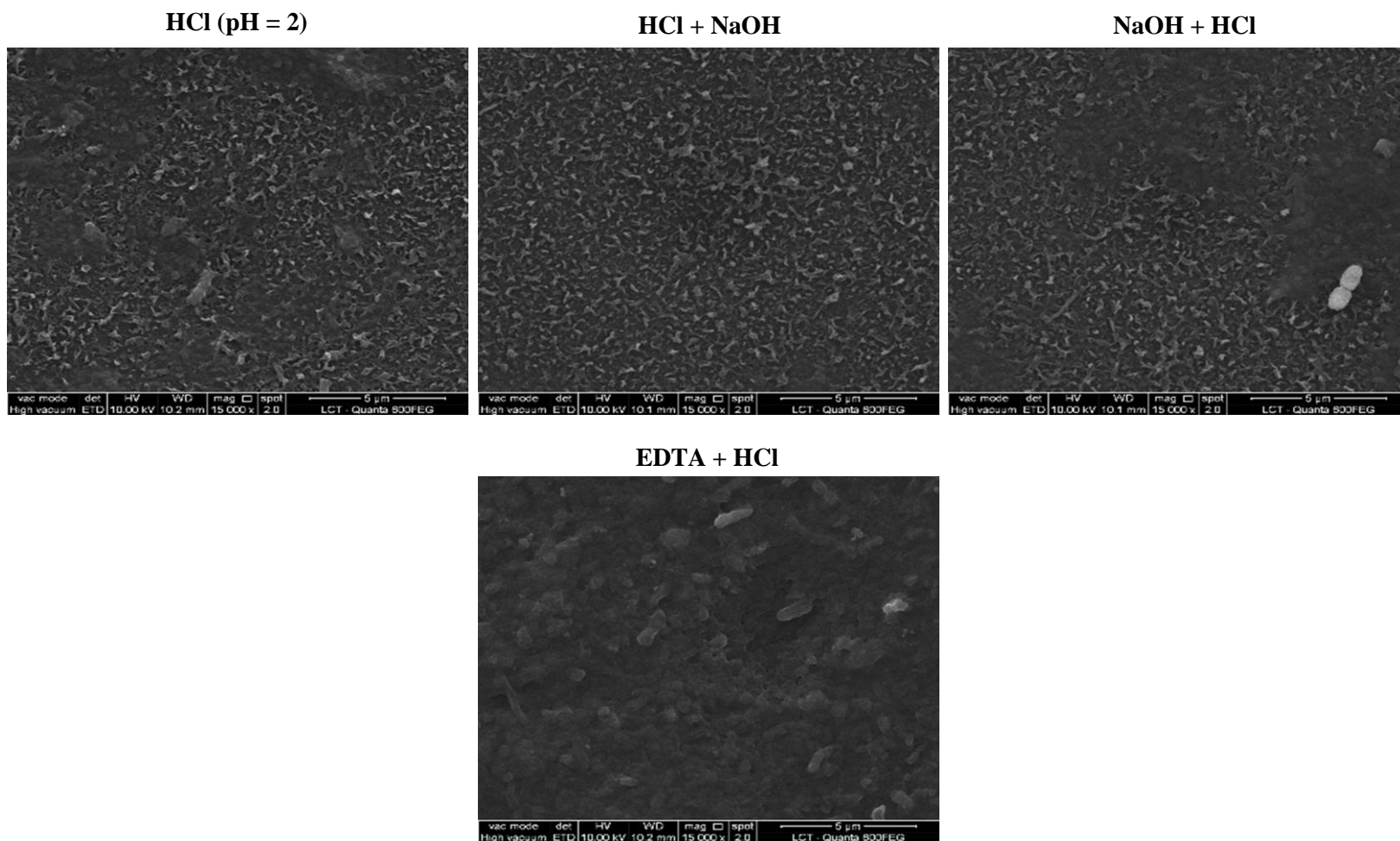


Figura 60 - Micrografias eletrônicas das amostras do elemento 1 com aumento de 15000 X.

7.5.4.1.3.2 elemento 2

As micrografias obtidas com um aumento de 65 X mostraram que a melhor remoção do *fouling* foi obtida utilizando combinações de NaOH e HCl e EDTA e NaOH. Uma análise mais detalhada (15000 X), confirmou que houve remoção de grande parte do depósito, deixando parte da membrana limpa visível. As outras soluções testadas não mostraram eficiência na remoção do *fouling* (Figuras 63 e 64).

De acordo com Ang et. al., 2011, a presença de íons hidróxido pode promover a disrupção da camada de *fouling* por mecanismos como: aumento da força iônica, aumento da solubilidade de compostos orgânicos e aumento do pH. O aumento do pH deve resultar em um aumento da carga negativa de compostos orgânicos, devido a desprotonação de grupos carboxílicos e fenólicos. Em pH 12, a maioria dos grupos funcionais presentes em águas residuais é desprotonada e, além disso, os compostos adquirem carga negativa. Sob estas condições, as interações repulsivas entre os constituintes do *fouling* facilitam a liberação e o transporte destes da superfície da membrana para a solução.

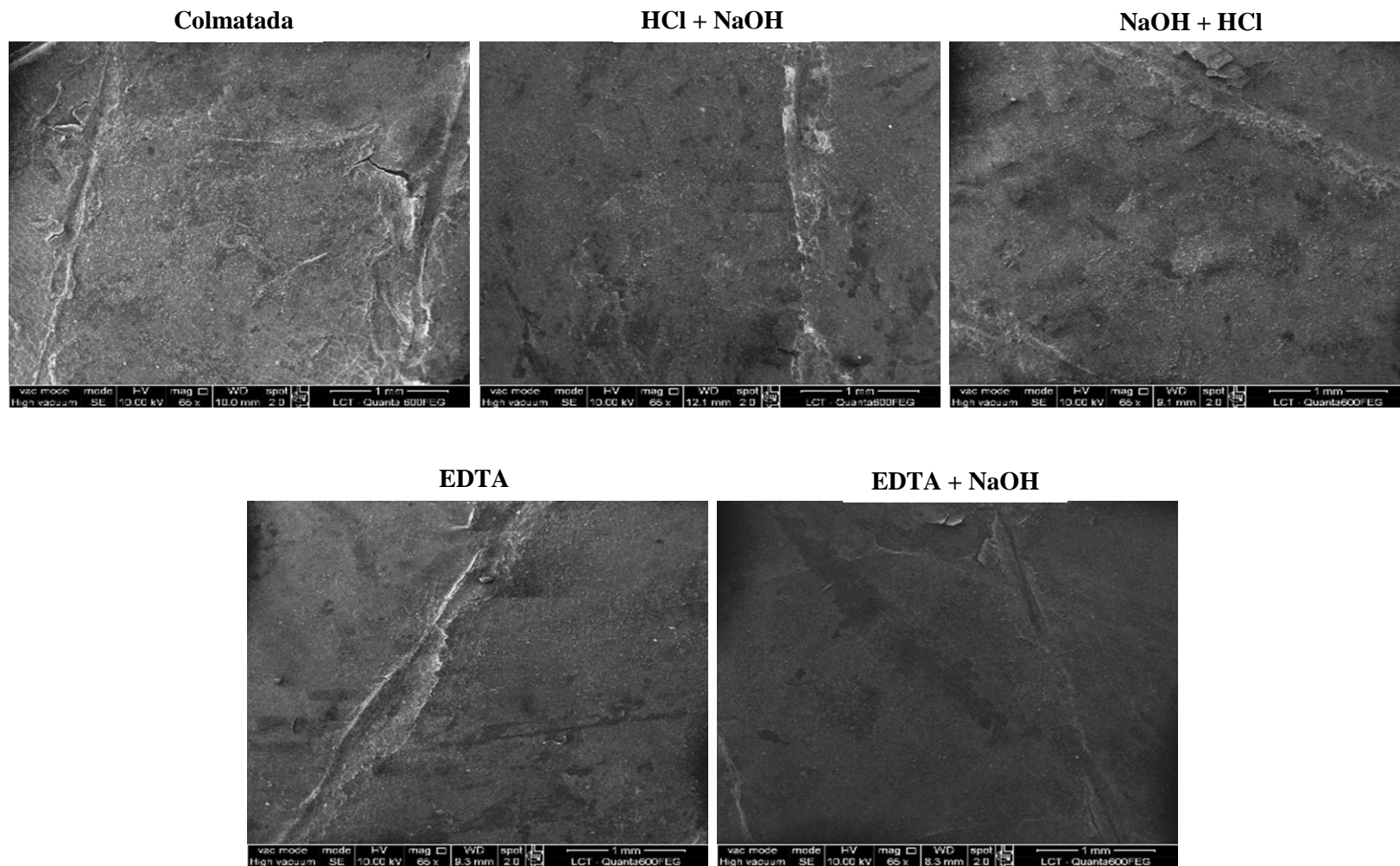


Figura 61 - Micrografias das amostras do elemento 2 com aumento de 65 X.

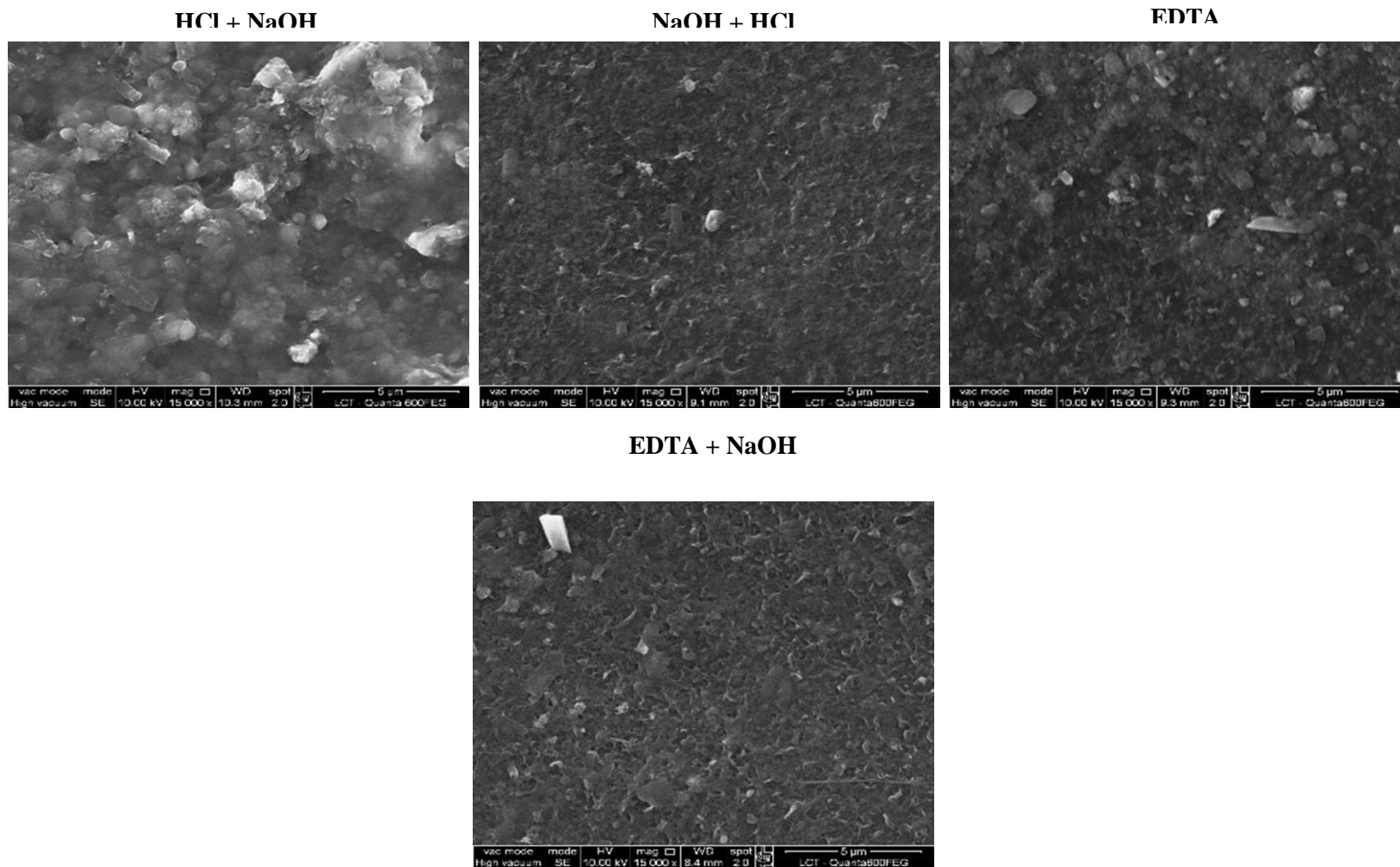


Figura 62 - Micrografia das amostras do elemento 2 após limpeza. Aumento de 15000 X.

7.5.4.1.3.3 elemento 3

As micrografias obtidas com as amostras do elemento 3, após procedimento de lavagem química, mostraram que não houve uma remoção considerável dos depósitos sobre as membranas (Figura 65).

Dentre as soluções e/ou suas combinações que apresentaram resultados macroscópicos de remoção, a combinação de HCl e NaOH foi a que apresentou melhor resultado, sendo possível observar áreas da membrana limpa.

Apesar de, macroscopicamente, outras combinações de produtos para a limpeza de membranas parecerem eficazes (HCl + NaOH e EDTA), pela análise de microscopia eletrônica, comprovou-se que grande parte do depósito não foi removida.

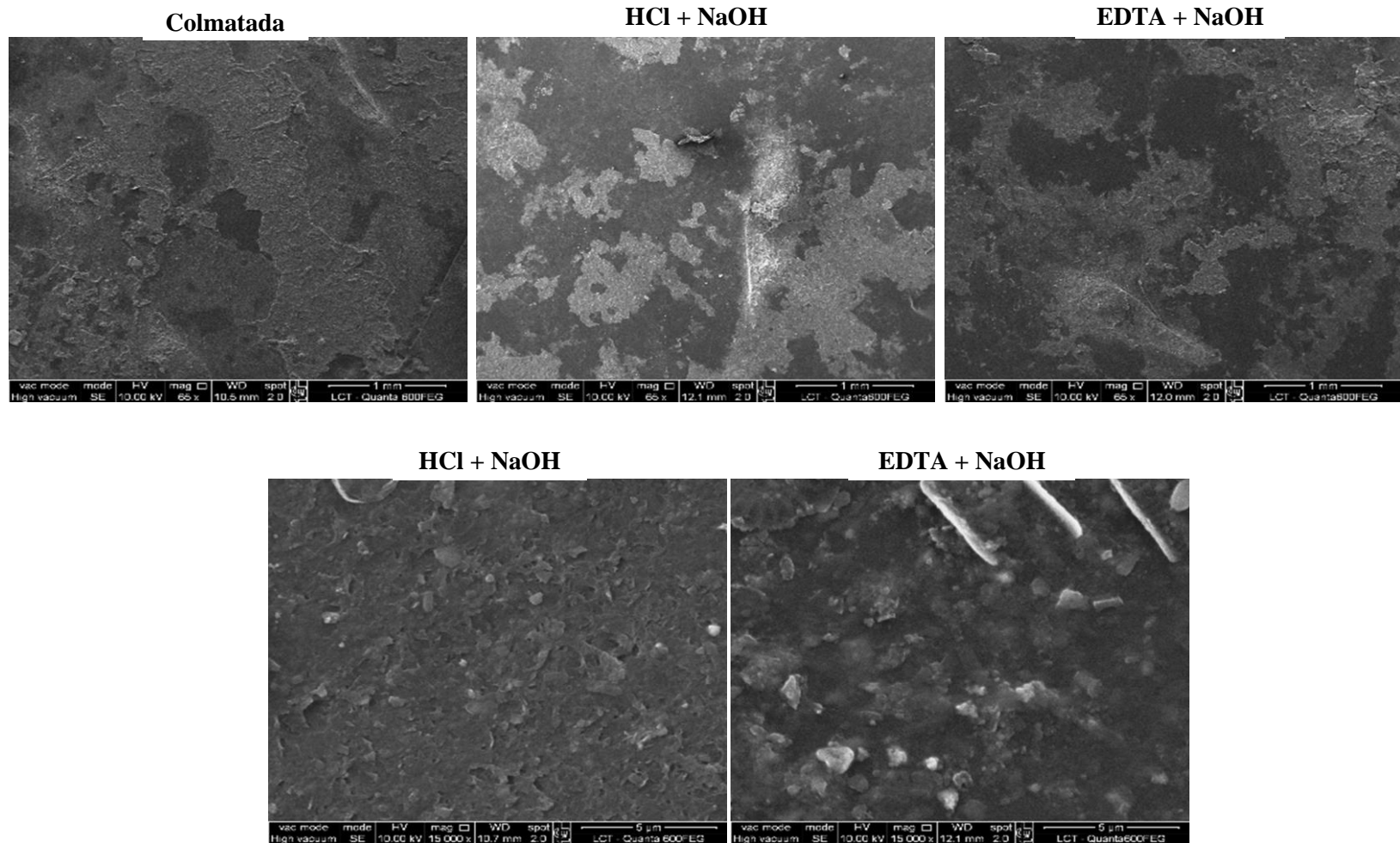


Figura 63 - Micrografias das amostras do elemento 3 após lavagem com diferentes soluções. Aumento de 15000 X.

De acordo com os resultados obtidos nas autópsias dos três elementos, houve uma colmatagem predominante de compostos inorgânicos no elemento 1, o que explica a eficácia observada durante procedimentos de limpeza utilizando ácido clorídrico e combinações também utilizando ácido. A utilização de ácidos em limpeza de membranas tem por objetivo dissolver precipitados de sais inorgânicos ou óxidos (D'SOUZA; MAWSON, 2007). Porém, esta remoção visual não foi observada com a utilização de surfactante e ácido. Os surfactantes são utilizados para solubilizar macromoléculas orgânicas. Os surfactantes agem sobre a membrana de diversas formas: facilitam a remoção de depósitos, suspendem materiais (auxiliando na solubilização e emulsificação), estabilizam espumas, adsorvem em superfícies melhorando suas propriedades e agem como biocidas (ANG et al., 2011); esta adsorção na superfície das amostras pode ter dificultado ou impedido a ação do ácido durante o procedimento utilizando SDS e ácido.

Nos elementos 2 e 3, devido a presença de orgânicos e inorgânicos em proporções semelhantes, as soluções que mais contribuíram com a limpeza foram as combinações envolvendo uma base forte. De acordo com Ang et. al., 2011, a presença de íons hidróxido pode promover a disruptura da camada de *fouling* por mecanismos como: aumento da força iônica, aumento da solubilidade de compostos orgânicos e aumento do pH. O aumento do pH deve resultar em um aumento da carga negativa de compostos orgânicos, devido a desprotonação de grupos carboxílicos e fenólicos. Em pH 12, a maioria dos grupos funcionais presentes em águas residuais é desprotonada e, além disso, os compostos adquirem carga negativa. Sob estas condições, as interações repulsivas entre os constituintes do *fouling* facilitam a liberação e o transporte destes da superfície da membrana para a solução.

Ang et. al. (2011) utilizou soluções de NaOH, EDTA e SDS em testes de limpeza em membranas que foram colmatadas por 17 horas utilizando efluente com matéria orgânica como alimentação do sistema de bancada.

7.5.4.2 Teste de Limpeza Química em Bactérias Contidas em Biofilmes

7.5.4.2.1 Formação de Biofilmes nas Amostras de Membrana

Após quinze dias ininterruptos em contato com água da raia, foi observado a formação de uma camada espessa de biofilme nas amostras de membranas (Figura 66). A grande presença de algas do tipo diatomácea deveu-se à sua abundância na água e ausência de algum tipo de pré-tratamento da mesma antes de entrar nas células de fluxo.

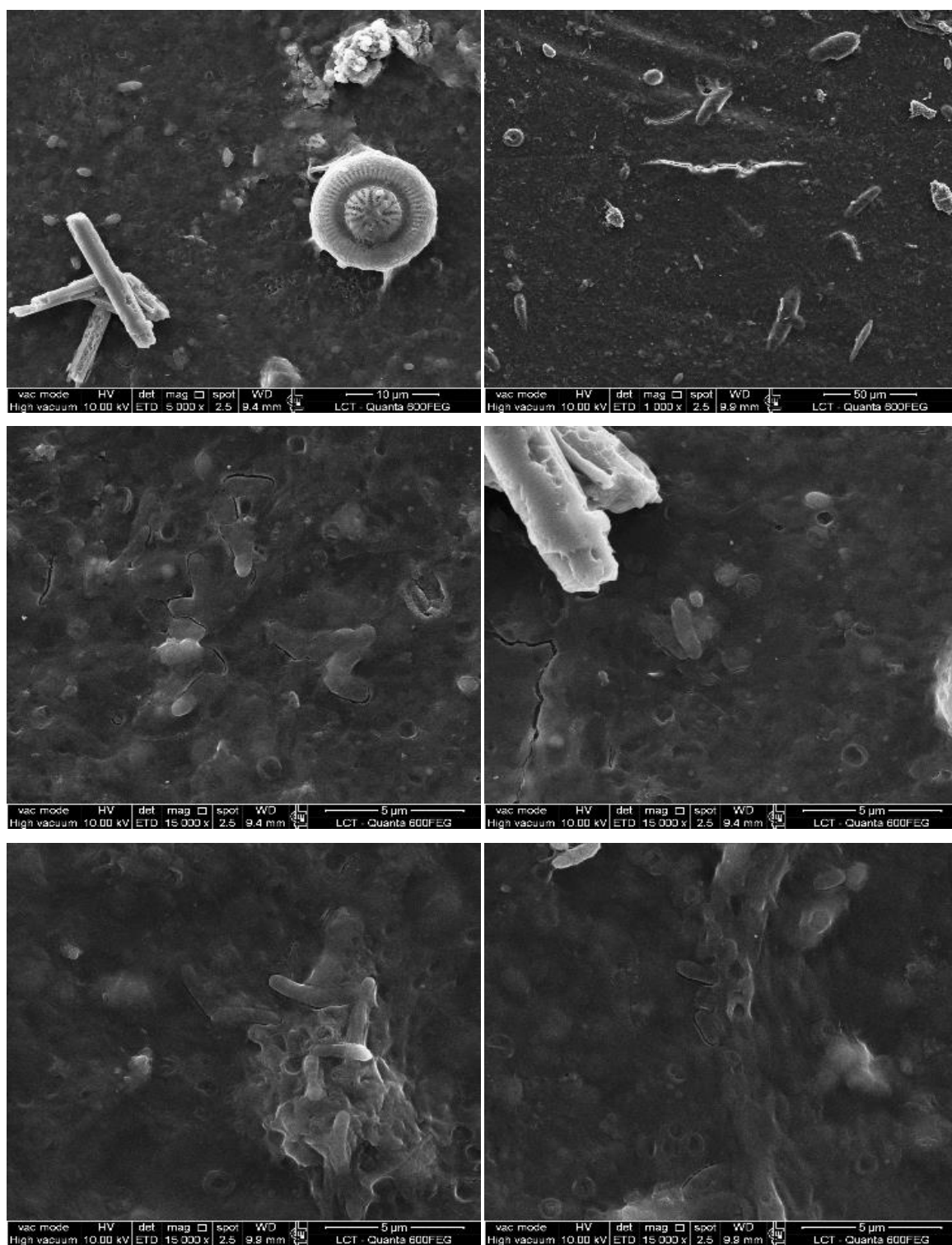


Figura 64 - Micrografias eletrônicas mostrando biofilmes formados sobre as superfícies das amostras de membrana.

7.5.4.2 Limpeza Química

Após trinta minutos de limpeza química das amostras de membranas, foi verificado que as soluções contendo HCl (pH = 2) e NaOH (pH = 12) mostraram um melhor resultado em relação à diminuição de células viáveis (redução de 98% e 98,9% respectivamente). Em relação às soluções de EDTA (2mM) e SDS (10 mM), a primeira mostrou-se pouco eficaz na diminuição de células viáveis (redução de 17%), e a segunda, praticamente manteve constante o número de bactérias viáveis (Figura 67). Tipicamente, durante uma limpeza química de membranas segue-se uma sequência de solução básica e solução ácida. Entretanto, a remoção de *biofouling* nunca foi completa utilizando esta técnica (Ettori et. al. 2011). Filloux et. al. (2015) utilizou uma solução de nitrato de sódio acidificada com ácido clorídrico como única etapa de limpeza química, observando que esta solução é um biocida forte em baixas concentrações (0,2 – 2mgN/L) causando uma morte substancial dos microrganismos e um desprendimento dos mesmos das superfícies das membranas.

Posteriormente ao procedimento de limpeza química e circulação de água autoclavada da raia olímpica por 15 dias ininterruptos, observou-se que, após utilização de solução de HCl (pH = 2) houve uma recuperação de 226% de células viáveis porém, manteve uma redução de 93,5% em relação à quantidade de viáveis iniciais (nas amostras após 15 dias em contato com água da raia). Após o uso de NaOH (pH = 12) e recirculação de água autoclavada, verificou-se uma recuperação bacteriana de, aproximadamente, 3600% e manteve uma redução de 59% em relação às amostras após 15 dias em contato com água da raia olímpica. A utilização de EDTA e posterior circulação de água da raia, mostrou uma recuperação de 49% de viáveis, indicando um número igual ou levemente superior ao das amostras após 15 dias de contato com água da raia. O teste de recuperação após utilização de solução de SDS praticamente manteve constante o número de células viáveis quando comparado com os números antes e após a limpeza (Figura 67).

Os testes de limpeza e recuperação bacteriana mostraram que soluções ácidas são mais danosas às células bacterianas quando comparada a outras soluções. Apesar das amostras não serem provenientes de elementos de osmose reversa reais em operação e conter, basicamente, *biofouling* e *fouling* orgânico em suas superfícies, os resultados mostraram a dificuldade em se determinar procedimentos generalizados de limpeza química sem ter o conhecimento do tipo de colmatação ocorrido nas membranas.

De acordo com um manual de limpeza química de elementos de osmose reversa de um grande fabricante de membranas, o primeiro procedimento de limpeza seria a utilização de uma solução alcalina. Limpezas ácidas deveriam ser feitas em um primeiro procedimento, apenas se houvesse a presença de carbonato de cálcio ou óxidos/hidróxidos de ferro no *fouling*. Soluções

ácidas reagem com sílica, compostos orgânicos e biofilmes podendo causar um futuro declínio na performance do elemento (DOW FILMTEC™ Membranes).

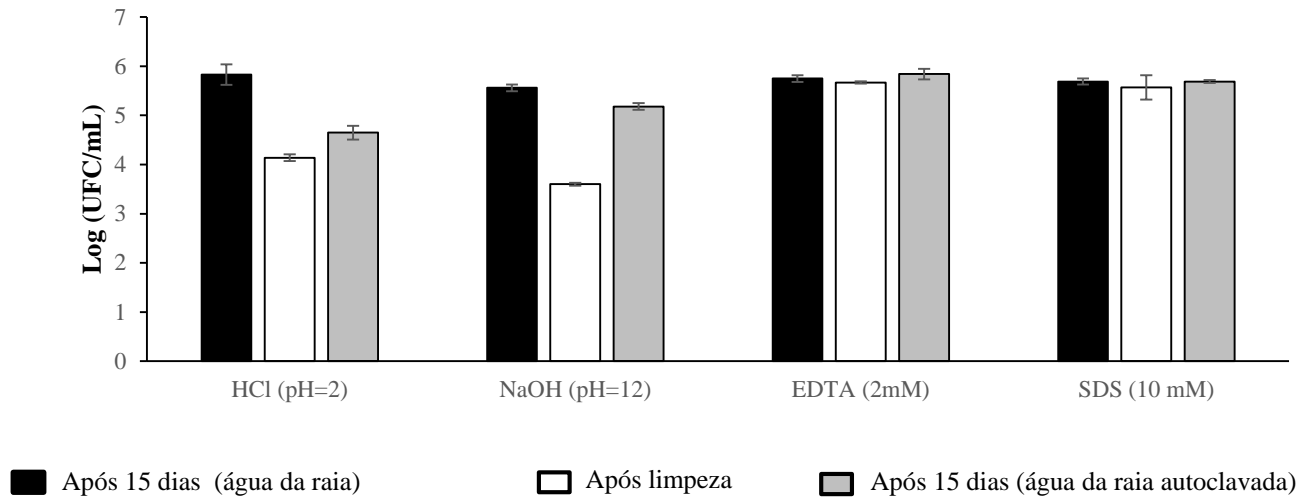


Figura 65 - Contagem de células viáveis nas amostras de membranas durante o procedimento de limpeza e recuperação bacteriana.

7.5.5 Conclusão

Os resultados obtidos pela utilização, separadamente, de diferentes soluções de limpeza química de membranas em relação ao *biofouling* foram:

- Soluções de HCl (pH = 2) e NaOH (pH = 12) foram eficazes na diminuição do número de células viáveis.
- Soluções de EDTA (2 mM) e SDS (10 mM) foram pouco ou ineficazes em relação à diminuição de células viáveis das amostras.
- Houve maior lesão de células bacterianas utilizando solução de HCl (pH = 2).

REFERÊNCIAS

- ANG, W. S.; LEE, S.; ELIMELECH, M. Chemical and physical aspects of cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 272, p. 198-201, 2006.
- ANG, W. S.; YIP, N. Y.; TIRAFERRI, A.; ELIMELECH, M. Chemical cleaning of RO membranes fouled by wastewater effluent: Achieving higher efficiency with dual-step cleaning. **Journal of Membrane Science**, v. 382, p. 100– 106, 2011.
- BOHNER, H. F.; BRADLEY, R. L. Effective cleaning and sanitizing of polysulphone ultrafiltration membrane systems. **Journal of dairy science**, v. 75, p. 718-724, 1992.
- Dow Water & Process Solutions, FILMTEC reverse osmosis membranes—Technical Manual, 2010, Form No. 609-00071- 1009, p. 122, 125. Available from: http://www.dowwaterandprocess.com/support_training/literature_manuals/filmtec_manual.htm.
- D’SOUZA, M. N.; MAWSON A. J. Membrane cleaning in the dairy industry: a Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 125-134, 2007.
- ESPINASSE, B. P.; CHAE, S. R.; MARCONNET, C.; COULOMBEL, C.; MIZUTANI, C.; DJAFER, M.; HEIM, V.; WIESNER, M. R. Comparison of chemical cleaning reagents and characterization of foulants of nanofiltration membranes used in surface water treatment. **Desalination**, v. 296, p. 1-6, 2012.
- ETTORI, A.; GAUDICHET-MAURIN, E.; SCHROTTER, J. C.; AIMAR, P.; CAUSSERAND, C.; Permeability and chemical analysis of aromatic polyamide based membranes exposed to sodium hypochlorite, **J. Membr. Sci.** v. 375, p.220. 2011.
- FAROOQ, U.; SHEIKH, S. Restoration of “dead” clay fouled membranes. **Desalination and Water Treatment**. v. 51, p. 976 – 982, 2013.
- FILLOUX, E.; WANGA, J.; PIDOUA, M.; GERNJAKA, W.; YUAN, Z. Biofouling and scaling control of reverse osmosis membrane using one-step cleaning-potential of acidified nitrite solution as an agent. **Journal of Membrane Science**. v.495, p.276-283, 2015.

HALL, G. M. Membrane filtration. **Fish Processing Technology**, p. 230-233, 1992.

KRACK, R. Chemical agents and costs in cleaning and disinfection of membrane equipment. **Fouling and Cleaning in Pressure Driven Membrane Processes**, p. 151-174, 1995.

KUMAR, C. G.; TIWARI, M. P. Use of alkaline proteases for ultrafiltration membrane cleaning. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 235-238, 1999.

LAWRENCE, N. D.; IYER, M.; HICKEY, M. W.; STEVENS, G. W.; PERERA, J. M. Fouling, cleaning, storage and lifespan of ultrafiltration membranes in the dairy industry. **Cheeseworks**, v. 2, n. 3, p. 1-4, 1998.

LIU, H.; FANG, H.H.P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. **J. Biotechnol.** V. 92, p. 249–256, 2005.

MADAENI, S. S.; SAMIEIRAD, S. Chemical cleaning of reverse osmosis membrane fouled by wastewater. **Desalination**, v. 257, p. 80-86, 2010.

MAKARDIJ, A.; CHEN, X. D.; FARID, M. M. Microfiltration and ultrafiltration of milk: Some aspects of fouling and cleaning. **Foods and Bioproducts Processing**, v. 77, p. 107-113, 1999.

MARRIOTT, N. G. Cleaning Compounds. **Essentials of food sanitation**, p. 59-75, 1997.

METHATHAM, T.; RATANATAMSKUL, C. Effect of a longer cleaning-frequency period on nanofiltration membrane fouling for long-term water supply production. **Desalination**, v. 32, p. 256-261, 2011.

MOHAMMADI, T.; MADAENI, S. S.; MOGHADAM, M. K. Investigation of membrane fouling. **Desalination**, v. 153, n. 3, p. 155-160, 2002.

MUN, S.; LEE, Y.; YOON, J. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by dense phase carbon dioxide. **Biofouling**, v. 25, p. 473-479, 2012.

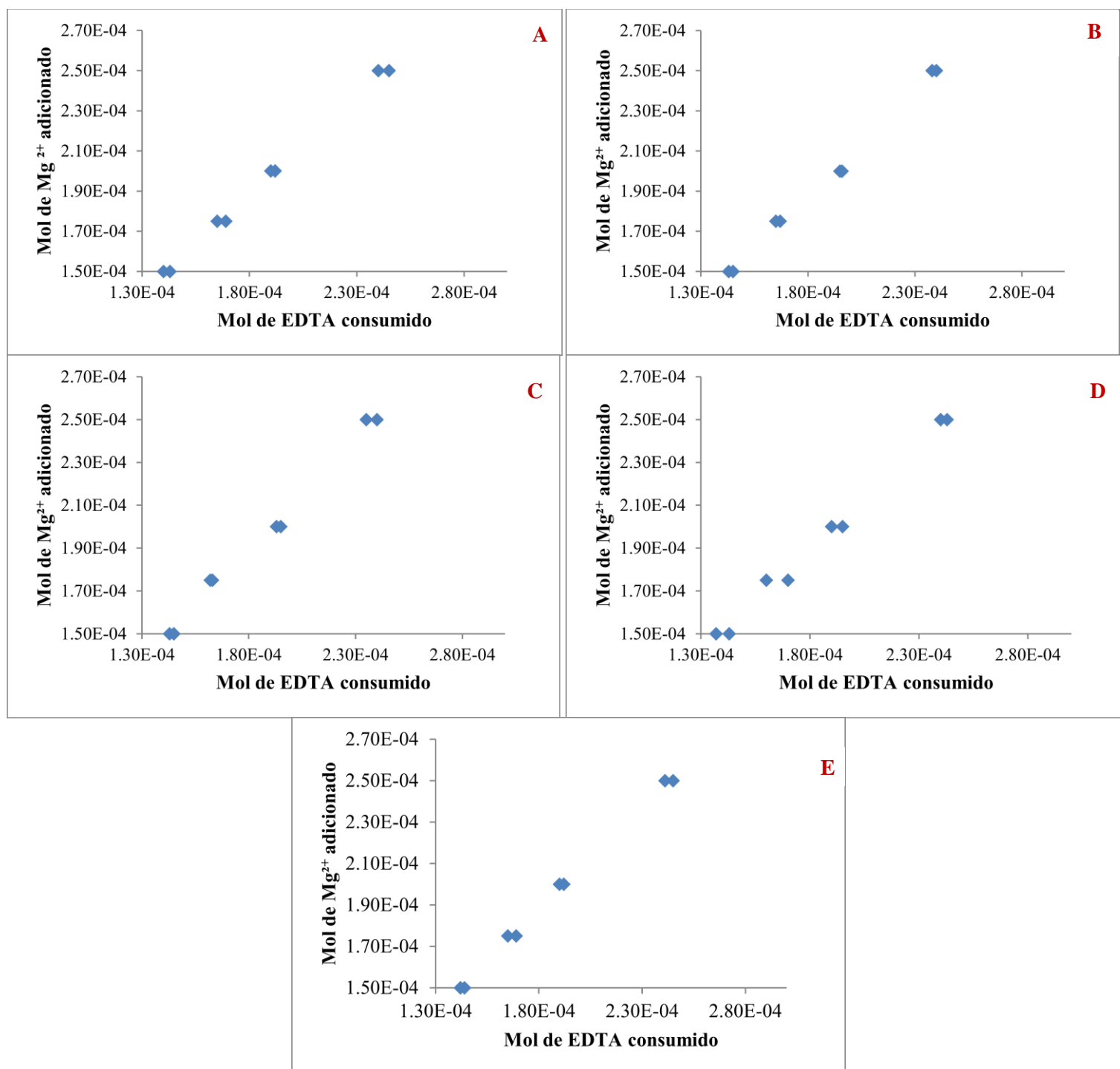
PEÑA, N; GALLEGO, S.; DEL VIGO, F.; CHESTERS, S.P. Evaluating impact of fouling on reverse osmosis membranes performance. **Desalination and Water Treatment**. V. 51, p. 958 – 968, 2013.

RABILLER, B.; MAUX, M. L.; CHAUFER, B.; BEGOIN, L. Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR-FTIR and EDX analysis coupled with SEM: Application to UF of skimmed milk with a PES membrane. **Desalination**, v. 146, p. 123-128.

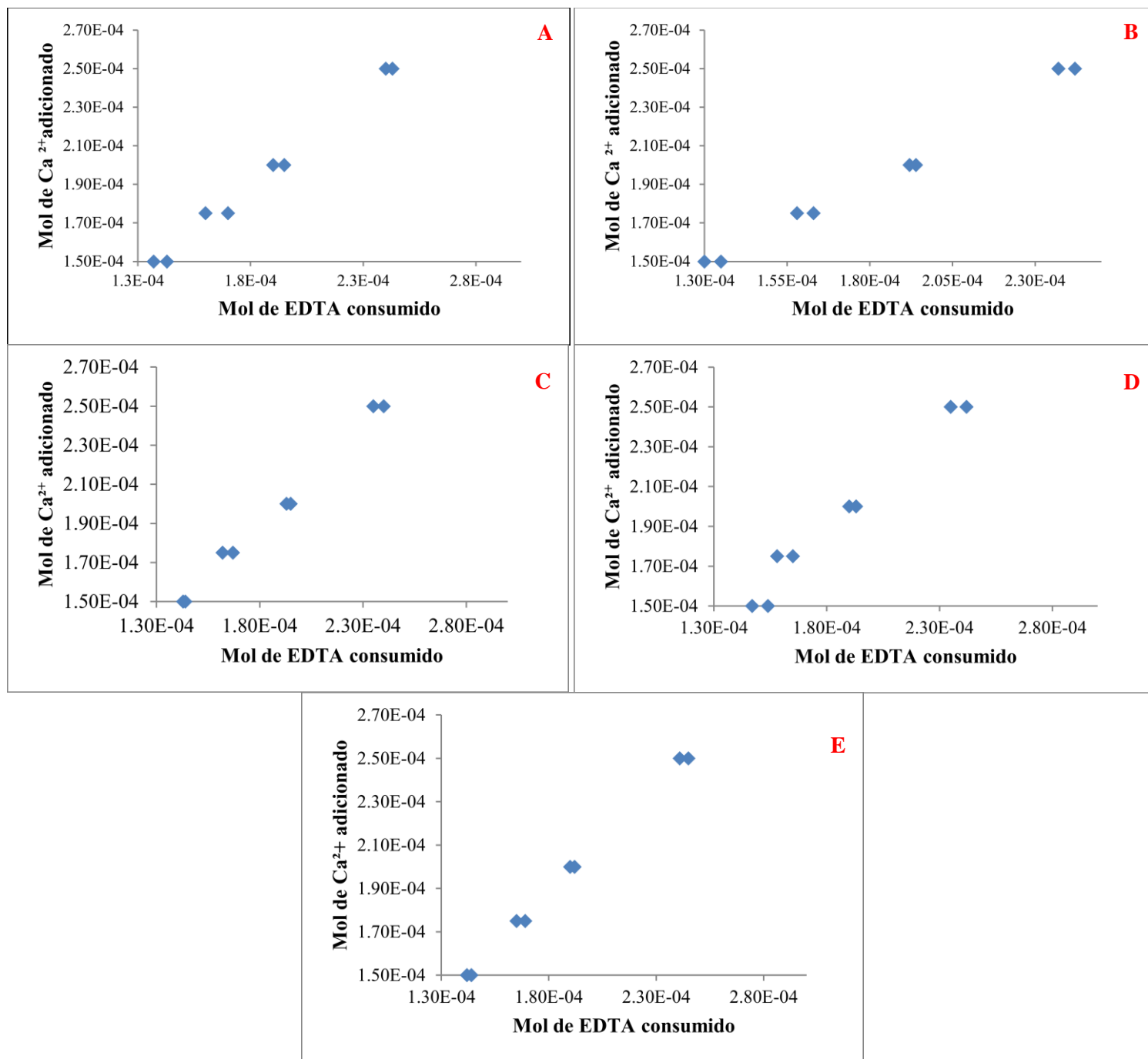
TRAGARDH, G. Membrane Cleaning. **Desalination**, v. 71, p. 325-335, 1989.

WAGNER, J. Membrane Filtration Handbook – Practical Tips and Hints. 1st ed. Wagner Publishing, Denmark. 1996.

ANEXOS



Anexo 1: Quantificação de magnésio. Amostra 1 (A), amostra 2 (B), amostra 3 (C), amostra 4 (D) e amostra 5 (E).



Anexo 2: Quantificação de cálcio. Amostra 1 (A), amostra 2 (B), amostra 3 (C), amostra 4 (D) e amostra 5 (E).

Entrada [1] - biapere040 x Facebook x rdp.cme.msu.edu/seqmat: x

rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_result.jsp?vector=204&depth=0¤tRoot=0&num=20

Query Submit Date: Mon Dec 21 11:27:23 EST 2015
Match hit format: short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:
Results for Query Sequence: TRC-10, 796 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class Bacilli (20)
order Bacillales (20)
family Bacillaceae 1 (19)
genus Bacillus (19)
5000431101 - not_calculated 0.900 1469 Bacillus anthracis; JH18; DQ232746
5000586416 - not_calculated 0.884 1420 uncultured bacterium; AKH17755; DQ129483
5000615570 - not_calculated 0.882 1370 Bacillus anthracis; JH18; DQ232746
5000788122 - not_calculated 0.884 1254 unidentified bacterium; MEB002; EF154087
5001154306 - not_calculated 0.883 1303 Bacillus cereus; EK-15; EU910235
5001156319 - not_calculated 0.886 1254 Bacillus sp. cp-h35; EU584539
5001241303 - not_calculated 0.884 1379 Bacillus sp. CMAP11; FJ405190
5001242024 - not_calculated 0.882 1349 Bacillus sp. CDB4; DQ295877
5002230748 - not_calculated 0.883 1269 Bacillus sp. SC110(2010); HM566464
5002230750 - not_calculated 0.884 1272 Bacillus sp. SC113(2010); HM566466
5002231088 - not_calculated 0.883 1245 Bacillus sp. D802(2010); HM566804
5002231115 - not_calculated 0.883 1284 Bacillus sp. D812(2010); HM566831
5002231157 - not_calculated 0.883 1248 Bacillus sp. D816(2010); HM566873
5002231280 - not_calculated 0.883 1279 Bacillus sp. DU115(2010); HM566996
5002231398 - not_calculated 0.884 1262 Bacillus sp. Du58(2010); HM567114
5002410307 - not_calculated 0.884 1384 Bacillus sp. I4X; HQ727953
5002910512 - not_calculated 0.884 1377 Bacillus anthracis; J541; HQ857773
5004084807 - not_calculated 0.884 1365 Bacillus thuringiensis; S-26; KJ011876
5004225639 - not_calculated 0.884 1379 Bacillus sp. gx13; KJ504160
unclassified_Bacillales (1)
5001169340 - not_calculated 0.882 1706 Bacillus cereus; HY-2; EU915687

Questions/comments: rdpata@msu.edu

Enc: Resultados Sequenci... x Facebook x Adagio - Sarah Bright... x rdp.cme.msu.edu/seqmat: x

rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_result.jsp?vector=204&depth=0¤tRoot=0&num=20

Data desc: both type and non-type strains; both environmental (uncultured) sequences and isolates; near full-length sequences (2100 bases); good quality sequences

Comments: 1504475 sequences were included in the search
The screening was based on 7-base oligomers

Query Submit Date: Mon Dec 21 11:15:31 EST 2015
Match hit format: short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:
Results for Query Sequence: TRC-9, 620 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class Bacilli (20)
order Bacillales (20)
family Bacillaceae 1 (20)
genus Bacillus (20)
5000444934 not_calculated 0.898 1349 Bacillus sp. CDB4; DQ295877
5000615570 not_calculated 0.900 1370 Bacillus anthracis; JH18; DQ232746
5000691225 not_calculated 0.898 1417 Bacillaceae bacterium KVD-1790-08; DQ490397
5000691226 not_calculated 0.898 1424 Bacillaceae bacterium KVD-1790-09; DQ490398
5000691227 not_calculated 0.898 1424 Bacillaceae bacterium KVD-1790-07; DQ490399
5000691228 not_calculated 0.898 1424 Bacillaceae bacterium KVD-1790-05; DQ490400
5000691229 not_calculated 0.898 1424 Bacillaceae bacterium KVD-1790-03; DQ490401
5000691230 not_calculated 0.898 1431 Bacillaceae bacterium KVD-unk-53; DQ490402
5000691231 not_calculated 0.898 1431 Bacillaceae bacterium KVD-unk-72; DQ490403
5000691232 not_calculated 0.898 1431 Bacillaceae bacterium KVD-1790-04; DQ490404
5000893607 not_calculated 0.898 1430 Bacillus sp. B110Y-12; DQ314537
5001045723 not_calculated 0.898 1419 Bacillus sp. cp-h17; EU719663
5001447887 not_calculated 0.898 1398 uncultured Bacillus sp.; JPL-53_123; FJ957633
5001447895 not_calculated 0.898 1404 uncultured Bacillus sp.; JPL-53_K17; FJ957641
5002304950 not_calculated 0.898 1429 bacterium TOPO-colonae13C; HM243126
5002442406 not_calculated 0.898 1378 Bacillus sp. SY115; PSM NO. 10; FR846533
5002952847 not_calculated 0.898 1378 Bacillus sp. PSM 10; JF738149
5004083060 not_calculated 0.898 1367 Bacillus sp. NIOT-3; AM981260
5004083127 not_calculated 0.898 1392 Bacillus sp. S12908; KF956625
5004091657 not_calculated 0.898 1340 Bacillus sp. P37; KJ604979

Anexo 3: Resultado do sequenciamento para uma das amostras de bactérias isoladas (*Bacillus anthracis*).

Entrada (1) - biaperes04@ x Facebook x rdp.cme.msu.edu/seqmat: x

rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_result.jsp?qvector=204&depth=0¤tRoot=0&num=20

Lineage:
Results for Query Sequence: TRC-5, 694 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class Bacilli (20)
order Bacillales (20)
family Bacillaceae 1 (20)
genus Bacillus (20)

5000638932	not_calculated	0.879	1354	Bacillus thuringiensis; DQ328631
5000691230	not_calculated	0.879	1431	Bacillaceae bacterium KVD-unk-53; DQ490402
5000691231	not_calculated	0.879	1431	Bacillaceae bacterium KVD-unk-72; DQ490403
5000691232	not_calculated	0.879	1431	Bacillaceae bacterium KVD-1790-04; DQ490404
5000826740	not_calculated	0.879	1425	uncultured bacterium; BF0001C042; AM697201
5000893597	not_calculated	0.879	1407	Bacillus cereus; NH11-2; EF690421
5000925671	not_calculated	0.879	1450	Bacillus thuringiensis; IEB: T61001; AM747225
5000966638	not_calculated	0.879	1455	Bacillus sp. PSB7; EU184084
5000967203	not_calculated	0.879	1348	Bacillus thuringiensis; B144; EU240371
5001045723	not_calculated	0.880	1419	Bacillus sp. cp-h17; EU719663
5001095550	not_calculated	0.879	1317	Bacillus cereus; IBL01065; EU168409
5001095556	not_calculated	0.879	1312	Bacillus cereus; IBL01078; EU168415
5001095557	not_calculated	0.879	1311	Bacillus cereus; IBL01080; EU168416
5001243157	not_calculated	0.879	1389	Bacillus thuringiensis; zx1; FJ463163
5001243158	not_calculated	0.879	1390	Bacillus sp. zx2; FJ463164
5001243159	not_calculated	0.879	1389	Bacillus sp. zx3; FJ463165
5001243160	not_calculated	0.879	1389	Bacillus sp. zx4; FJ463166
5001243163	not_calculated	0.879	1389	Bacillus sp. zx7; FJ463169
5001294415	not_calculated	0.880	1387	Bacillus cereus; MX3; FJ644692
5004225649	not_calculated	0.880	1381	Bacillus sp. Fxzk24-H; KJ504170

Questions/comments: rdpstaff@msu.edu

Entrada (1) - biaperes04@ x Facebook x rdp.cme.msu.edu/seqmat: x

rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_result.jsp?qvector=204&depth=0¤tRoot=0&num=20

Lineage:
Results for Query Sequence: TRC-6, 778 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class Bacilli (20)
order Bacillales (20)
family Bacillaceae 1 (20)
genus Bacillus (20)

5000431101	not_calculated	0.896	1469	Bacillus cereus; SH 01; AF522353
5000440751	not_calculated	0.897	1463	Bacillus cereus; SLF6; AJ853737
5000467899	not_calculated	0.897	1399	Bacillus cereus; CICC10185; AY842872
5000571087	not_calculated	0.898	1447	Bacillus sp. SMF5; AJ868359
5000584454	not_calculated	0.897	1435	Bacillus cereus; DQ115540
5000768122	not_calculated	0.900	1354	unidentified bacterium; MEB002; EF154087
5000826954	not_calculated	0.896	1426	uncultured bacterium; BF0001D030; AM697415
5001156319	not_calculated	0.898	1254	Bacillus cereus; EK-28; EU910248
5001241303	not_calculated	0.897	1379	Bacillus sp. CMAP11; FJ405190
5001242024	not_calculated	0.896	1405	Bacillus sp. 6; FJ435214
5001577774	not_calculated	0.896	1352	Bacillus cereus; DC2; GQ344804
5002230748	not_calculated	0.896	1269	Bacillus sp. SC110(2010); HM566464
5002230750	not_calculated	0.896	1272	Bacillus sp. SC113(2010); HM566466
5002231088	not_calculated	0.896	1245	Bacillus sp. DB02(2010); HM566804
5002231398	not_calculated	0.897	1262	Bacillus sp. Du58(2010); HM567114
5002410307	not_calculated	0.897	1384	Bacillus sp. 14X; HQ27953
5002910512	not_calculated	0.900	1377	Bacillus anthracis; JS41; HQ857773
5003807633	not_calculated	0.897	1453	Bacillus cereus; JN96; KF150387
5003807659	not_calculated	0.897	1450	Bacillus cereus; JN166; KF150413
5004225639	not_calculated	0.900	1379	Bacillus sp. gx13; KJ504160

Questions/comments: rdpstaff@msu.edu

Anexo 4: Resultado do sequenciamento para uma das amostras de bactérias isoladas (*Bacillus cereus*).

Comments: 1504475 sequences were included in the search
The screening was based on 7-base oligomers

Query Submit Date: Mon Dec 21 11:21:34 EST 2015

Match hit format: short ID, orientation, **similarity score**, **S_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:
Results for Query Sequence: TRC-3, 655 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class Bacilli (20)
order Bacillales (20)
family Bacillaceae 1 (20)
genus Bacillus (20)

5000397242	not_calculated	0.909	1461	Bacillus cereus; GBA39; AY138271
5000515933	not_calculated	0.947	1348	Bacillus sp. P03; AY964603
5000902712	not_calculated	0.910	1387	Bacillus cereus; LAM_30; EU019990
5000925670	not_calculated	0.947	1451	Bacillus thuringiensis; IECB T24001; AM747224
5000925671	not_calculated	0.947	1450	Bacillus thuringiensis; IECB T61001; AM747225
5001045723	not_calculated	0.947	1419	Bacillus sp. cp-h17; EU719663
5001045724	not_calculated	0.947	1417	Bacillus sp. cp-h58; EU719664
5001097528	not_calculated	0.947	1378	Bacillus sp. cp-h12; EU584533
5001097533	not_calculated	0.947	1378	Bacillus sp. cp-h34; EU584538
5001097536	not_calculated	0.947	1384	Bacillus sp. cp-h38; EU584541
5001097551	not_calculated	0.947	1383	Bacillus sp. cp-h37; EU584556
5001199782	not_calculated	0.947	1384	Bacillus thuringiensis; TCCC 11336; FJ393313
5001292466	not_calculated	0.947	1439	Bacillus thuringiensis serovar berliner; 1715; EU429665
5001292467	not_calculated	0.947	1433	Bacillus thuringiensis serovar cameroon; B6775; EU429666
5001292473	not_calculated	0.947	1438	Bacillus thuringiensis serovar israelensis; B6064; EU429672
5001575397	not_calculated	0.947	1459	Bacillus thuringiensis; CCM158; FN433029
5001873502	not_calculated	0.947	1420	Bacillus subtilis; SRS-6; GU056809
5001875613	not_calculated	0.947	1383	Bacillus sp. N42; GU391509
5001875614	not_calculated	0.947	1378	Bacillus sp. P22; GU391510
5003615857	not_calculated	0.948	1345	Bacillus sp. 3F11; JX445127

Comments: 1504475 sequences were included in the search
The screening was based on 7-base oligomers

Query Submit Date: Mon Dec 21 11:22:27 EST 2015

Match hit format: short ID, orientation, **similarity score**, **S_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:
Results for Query Sequence: TRC-4, 855 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
phylum Firmicutes (20)
class Bacilli (20)
order Bacillales (20)
family Bacillaceae 1 (20)
genus Bacillus (20)

5000605479	not_calculated	0.909	1305	Bacillus sp. L18; DQ192208
5000615570	not_calculated	0.911	1370	Bacillus anthracis; JH18; DQ232746
5000625439	not_calculated	0.909	1349	Bacillus thuringiensis; DQ286359
5000625898	not_calculated	0.909	1349	Bacillus sp. CDB4; DQ295877
5000750470	not_calculated	0.910	1412	bacterium 8-gw1-6; DQ990035
5000768161	not_calculated	0.909	1355	unidentified bacterium; MEB083; EF154127
5000806400	not_calculated	0.909	1334	Bacillus sp. CCBAU 51490; EF377314
5001199750	not_calculated	0.910	1380	Bacillus subtilis; M2-7; FJ392728
5002231464	not_calculated	0.910	1226	Bacillus thuringiensis; HMS73312
5002442859	not_calculated	0.910	1385	Bacillus cereus; 19-1; HM104640
5003265051	not_calculated	0.910	1376	Bacillus cereus; B0642; AB697152
5003277762	not_calculated	0.910	1498	Bacillus sp. S82; HE662675
5003612600	not_calculated	0.913	1317	Bacillus sp. C6[2012]; JN975114
5003719842	not_calculated	0.911	1397	Bacillus sp. 70[2012]; JQ958862
5003807633	not_calculated	0.910	1498	Bacillus sp. S82; HE662675
5003927528	not_calculated	0.910	1394	uncultured bacterium; b5_25; JN236385
5004221918	not_calculated	0.910	1466	Bacillus sp. BAB-4159; KJ794117
5004221923	not_calculated	0.910	1432	Bacillus sp. BAB-4165; KJ794122
5004225649	not_calculated	0.910	1381	Bacillus sp. Fx2k24-H; KJ504170
5004229247	not_calculated	0.910	1381	Bacillus sp. Lad2A; KJ944283

Anexo 5: Resultado do sequenciamento para uma das amostras de bactérias isoladas (*Bacillus thuringiensis*).