

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E  
DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DE LAMINOCULTIVOS PARA O MONITORAMENTO DA  
CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM ÓLEO DIESEL B**

Cristiane Santos Barbosa

Bióloga - IPA

Março, 2013.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E  
DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DE LAMINOCULTIVOS PARA O MONITORAMENTO DA  
CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM ÓLEO DIESEL B**

Cristiane Santos Barbosa

Bióloga - IPA

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos para a obtenção de Grau de Mestre  
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, RS, Brasil

Março de 2013.

### CIP - Catalogação na Publicação

Barbosa, Cristiane Santos

Avaliação de laminocultivos para o monitoramento da contaminação microbiana em óleo diesel B / Cristiane Santos Barbosa. -- 2013.  
152 f.

Orientadora: Fátima Menezes Bento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. lamminocultivos. 2. contaminação microbiana. 3. óleo diesel e biodiesel. 4. surfactantes. 5. validação de método alternativo. I. Bento, Fátima Menezes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“...Sê jovial, não leviano.  
Cultiva o amor, não a vulgaridade.  
Faze-te afável, não perturbado pela emoção.  
Guarda a previdência, não a mesquinhez.  
Detém-te na vigilância, não na obstinação negativa...”*

*Equilíbrio seja o fiel das tuas aspirações”.*

**Joanna de Ângelis (Divaldo Franco)**

*“A sorte favorece a mente bem preparada.”*

**Louis Pasteur**

*“...Quero, um dia, poder dizer à pessoas  
que nada foi em vão...que o amor existe, que vale a  
pena se doar as amizades e às pessoas, que a vida é  
bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim...e  
que valeu a pena!”*

**Luis Fernando Veríssimo**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fátima Menezes Bento pela oportunidade, confiança e sabedoria transmitida durante todo o percurso do mestrado.

Aos Professores Alexandre Meneghello Fuentesfría e Rosane Rech pela imensa contribuição ao meu trabalho e exemplo de sabedoria e admiração.

Aos meus pais, Ana e Joel, por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje. Amo vocês mais que tudo e sem vocês nada disso seria possível e essa conquista pertence a nós. Vocês são meu exemplo para que cada dia eu possa ser melhor.

À minha irmã Aline pelo carinho e pelas ajudas com as traduções.

Meus agradecimentos mais profundos à Dr<sup>a</sup> Mariane Lobato por todo o incentivo e apoio desde que nos conhecemos, minhas considerações por você são eternas.

Ao meu namorado Marcos principalmente pela paciência e compreensão durante todo o tempo, sem contar o amor e carinho imenso que tu tens em teu coração.

Minha amiga querida Samantha Enriquez e seu pai Jorge Enriquez, pela linda amizade, confiança e pela oportunidade de passarmos juntos momentos tão ricos.

Minha outra amiga querida, Pâmela Xavier da Silva pela compreensão, as risadas e conversas, mesmo as que não falamos uma palavra.

As gurias do ICBS e da Agronomia Angélica, Marcela e Paula, em especial Aline, Letícia e Sabrina, mesmo que pelo pouco tempo agradeço pela amizade, carinho, ajuda e atenção.

As gurias do laboratório 209, Fran, Mica, Elis, Tiane, Cris S., Thaisa e Pri pelas rodas de chimarrão, convivência e aprendizado.

Aos Professores do PPGMAA pela grande contribuição para minha formação acadêmica e profissional.

À Capes pelo investimento.

À empresa Ipiranga pela disponibilização das amostras de combustíveis, ao investimento e ao auxílio que engrandeceram este trabalho.

# AVALIAÇÃO DE LAMINOCULTIVOS PARA O MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM ÓLEO DIESEL B<sup>1</sup>

Autor: Cristiane Santos Barbosa

Orientador: Fátima Menezes Bento

## Resumo

O monitoramento da contaminação microbiana, durante o armazenamento de combustíveis de óleo diesel A e B, pode informar sobre as condições de estocagem e a qualidade final do combustível, sendo um importante mecanismo de controle e prevenção da biodeterioração. Baseada na normativa IP 385/99 e ASTM 6469/00, a contagem de células viáveis de fungos e bactérias é o método tradicionalmente utilizado. Os laminocultivos são lâminas com duas faces contendo diferentes meios de cultivo capazes de estimar a contaminação microbiana, em meio aquoso e oleoso. O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar a utilização de dois tipos de kits microbiológicos de laminocultivos designados para o crescimento de bactérias e de fungos e leveduras, na detecção de microrganismos deteriorogênicos em amostras de fase aquosa (meio mineral) e oleosa (biodiesel (B100) e mistura B10). Foram realizados ensaios para verificar a sensibilidade quantitativa dos laminocultivos frente à metodologia tradicional de contagem em placa, com amostras aquosas e oleosas em microcosmos. Na etapa de estimativa em amostras aquosas, os resultados obtidos com os laminocultivos foram comparáveis ao método padrão de contagem para os microrganismos: *Bacillus pumilus*, *Candida silvicola* e *Paecilomyces variotti*. Foi utilizada a mistura B10 para adequação da melhor solução diluente e o volume de amostra com a finalidade de padronizar a metodologia de laminocultivos para estimativa da contaminação microbiana em combustível. Foi possível determinar que a solução diluente de Tween 80 na concentração de 0,01 % apresentou resultados satisfatórios na estimativa de microrganismos da mistura B10 com laminocultivos. O volume de 5 mL de amostra de mistura B10 foi selecionado como representativo para a diluição que deve ser realizada para a estimativa de microrganismos. No ensaio de validação de teste microbiológico alternativo de laminocultivos, foram obtidos resultados comparáveis com a metodologia de referência (IP 385/99), em termos de linearidade e precisão dentro da faixa de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> do método alternativo, na estimativa de *Candida silvicola*.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente –Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (138 p.) Março, 2013.

# SLIDE CULTURE AVALIATION FOR THE MICROBIAL CONTAMINATION MONITORING ON DIESEL B<sup>1</sup>

Author: Cristiane Santos Barbosa

Advisor: Fátima Menezes Bento

## Abstract

The microbial contamination management procedure, during the storage of fuels and, also A and B diesel oils, can inform about the storage conditions and guarantee the fuel final quality. Slide cultures are two faced laths containing different culture media capable of estimate the microbial contamination, in an aqueous and an oily base. The aim of this study was to evaluate and validate the utilization of two microbial kits of slide cultures design for the growth of bacteria and, also, of molds and yeasts, on the detection deteriorogenic microorganisms on samples of water phase (mineral environmental) and oily (biodiesel (B100) and blend B10). Some tests were held to verify the quantitative sensibility of the slide culture facing the plate count traditional methodology, with aqueous and oil solutions on microcosms. On the estimate stage in aqueous samples, the results obtained with the slide cultures were compared to the standard counting method on microorganisms: *Bacillus pumilus*, *Candida silvicola* and *Paecilomyces variotii*. The B10 blend was used for the adequacy of the best sample diluent solution and volume with the purpose of standardize the slide cultures methodologically for the microbial contamination estimative on fuel. It was possible to determinate that the diluent solution of Tween 80, in the concentration of 0,01% presented satisfactory results on the microorganisms estimative of the blend B10 with slide cultures. The 5 mL volume sample of blend B10 was choosing as a representative to the dilution that was must be made for the microorganisms estimative. On the alternative microbiological validation test of slide cultures were gathered results comparable with the reference methodology (IP 385/99), in terms of linearity and precision within the range of  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> of the alternative method, in *Candida silvicola* estimates.

---

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (138 p.) Março, 2013.

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| Resumo.....   | vi  |
| Abstract.....   | vii |
| LISTA DE TABELAS.....   | xi  |
| LISTA DE FIGURAS.....   | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....  | xv  |
| 1.INTRODUÇÃO.....   | 1   |
| 2. OBJETIVOS.....   | 5   |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....   | 5   |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 5   |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 7   |
| 3.1 Diesel, biodiesel e suas misturas: Condições durante o armazenamento....                      | 7   |
| 3.2 Fatores envolvidos no processo de degradação abiótica e biótica de combustíveis .....         | 11  |
| 3.2.1 Natureza do combustível e instabilidade durante o armazenamento .....                       | 11  |
| 3.2.2 Água.....   | 12  |
| 3.2.3 Nutrientes .....  | 14  |
| 3.2.4 Degradação microbiana .....   | 15  |
| 3.3 Consequências do crescimento microbiano durante o armazenamento de combustíveis .....         | 17  |
| 3.4 Monitoramentos microbiológicos em combustíveis .....  | 20  |
| 3.4.1 Métodos para o monitoramento microbiológico de combustíveis .....                           | 24  |
| 3.4.2 Método alternativo de laminocultivos .....  | 26  |
| 3.4.2.1 Validação de método microbiológico alternativo .....                                      | 31  |
| 3.4.3 Utilização de laminocultivos para estimativa da contaminação microbiana em fase oleosa..... | 33  |
| 3.5 Controle da biodeterioração em tanques de armazenagem.....                                    | 36  |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 41  |
| 4.1 Laminocultivos.....   | 41  |

|  |    |
|--|----|
| 4.2 Meios de cultura para Contagem em Placa.....   | 42 |
| 4.3 Combustíveis.....  | 42 |
| 4.4 Ensaio comparativo para estimativa em fase aquosa .....  | 43 |
| 4.4.1 Microrganismos utilizados .....  | 43 |
| 4.4.2 Padronização dos inóculos.....   | 43 |
| 4.4.3 Estimativa dos microrganismos por contagem de UFC.mL <sup>-1</sup> em placas<br>.....                    | 44 |
| 4.4.4 Estimativa de microrganismos pelos laminocultivos.....   | 45 |
| 4.4.5 Condições de crescimento e avaliação .....   | 45 |
| 4.5 Estimativa de microrganismos na fase oleosa .....  | 46 |
| 4.5.1 Ensaio preliminar para estimativa em fase oleosa .....   | 46 |
| 4.5.2 Soluções de diluentes e surfactantes para diluição e estimativa em fase<br>oleosa.....                   | 47 |
| 4.6 Determinação do volume de amostra.....   | 48 |
| 4.7 Validação da fase oleosa .....   | 49 |
| 4.7.1 Microrganismos .....   | 49 |
| 4.7.2 Ensaio fase aquosa e fase oleosa.....  | 49 |
| 4.7.3 Ensaio de precisão .....   | 50 |
| 4.7.4 Ensaio de limite de detecção e de quantificação.....   | 50 |
| 4.7.5 Ensaio de linearidade .....  | 51 |
| 4.7.6 Ensaio para especificidade.....  | 51 |
| 4.8 Estimativa da contaminação microbiana em fase aquosa e oleosa da<br>mistura B10 com adição de biocida..... | 51 |
| 4.8.1 Biocidas.....  | 51 |
| 4.8.2 Montagem dos microcosmos.....  | 52 |
| 4.8.3 Análises para estimativa da contaminação por laminocultivos e por<br>contagem em placa .....             | 53 |
| 4.9 Laminocultivos: Monitoramento em tanques piloto de 20L.....  | 53 |
| 4.10 Análise estatística .....   | 55 |

|   |     |
|---|-----|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 56  |
| 5.1 Ensaio para estimativa em fase aquosa .....   | 56  |
| 5.2 Estimativa em fase oleosa.....  | 62  |
| 5.2.1 Ensaio preliminar para estimativa em fase oleosa .....  | 62  |
| 5.2.2 Surfactantes para diluição e estimativa da contaminação na fase<br>combustível .....  | 70  |
| 5.3 Determinação do volume da amostra.....  | 80  |
| 5.4 Validação de laminocultivos na mistura B10.....   | 85  |
| 5.5 Avaliação de laminocultivos para a estimativa da contaminação microbiana<br>em fase aquosa e fase oleosa B10 com adição de biocida..... | 89  |
| 5.6 Monitoramentos em tanques piloto de 20 L.....   | 103 |
| 6. CONCLUSÕES .....   | 109 |
| 7. PERSPECTIVAS.....  | 111 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 112 |
| 9. ANEXOS.....  | 123 |
| 10. VITTA.....  | 138 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Consequências da contaminação microbiana durante a estocagem e microrganismos envolvidos no processo.....                             | 18 |
| Tabela 2 - Exemplos de classes de surfactantes químicos usualmente utilizados em laboratórios de biologia.....                                  | 35 |
| Tabela 3 - Concentrações das soluções pelo gabarito da bula versus contagem da concentração em placa. <i>Bacillus pumilus</i> .....             | 57 |
| Tabela 4 - Concentrações das soluções pelo gabarito da bula versus contagem da concentração em placa. <i>Candida silvícola</i> .....            | 59 |
| Tabela 5 - Concentrações das soluções pelo gabarito da bula versus contagem da concentração em placa por mL. <i>Paecilomyces variotii</i> ..... | 60 |
| Tabela 6 - Coeficiente de variação do método alternativo de laminocultivos.....   | 86 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Recomendações para uma rotina de monitoramento da contaminação microbiana em amostras de água e combustíveis (nível aceitável).....  | 23 |
| Figura 2 - Gabarito de correspondência do número de UFC.mL <sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de Colônia/Mililitro).....  | 42 |
| Figura 3 - Crescimento da bactéria <i>Bacillus pumilus</i> no meio de cultivo PCA que contém o indicador redox TTC, do laminocultivo Nutrilab E.....                                      | 58 |
| Figura 4 - Crescimento da levedura <i>Candida silvicola</i> no meio de cultivo Agar Ogye, do laminocultivo Nutrilab F.....  | 59 |
| Figura 5 - Crescimento do fungo filamentosso <i>Paecilomyces variotii</i> no meio de cultivo Agar Ogye, do laminocultivo Nutrilab F.....  | 61 |
| Figura 6 - Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> dos laminocultivos da amostra de combustível B10 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo PCA.....                     | 64 |
| Figura 7 - Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> dos laminocultivos da amostra de combustível B10 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo Ágar Ogye.....               | 65 |
| Figura 8 - Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> dos laminocultivos da amostra de combustível B100 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo PCA.....                    | 67 |
| Figura 9 - Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> dos laminocultivos da amostra de combustível B100 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo Ágar Ogye.....              | 68 |
| Figura 10a - Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> de bactérias e leveduras em óleo B10 em meio PCA.....   | 73 |
| Figura 10b - Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> de fungos em óleo B10 em meio Sabouraud e Agar Ogye.....  | 73 |
| Figura 11a - Ensaio para determinação do volume de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos e IP 385/99 em meio de cultivo PCA.....                               | 82 |
| Figura 11b - Ensaio para determinação do volume de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos, em meio de cultivo Agar Ogye e IP 385/99 em meio de cultivo BDA..... | 82 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 12. Linearidade do método alternativo de laminocultivos frente ao método de referência IP 385/99.....  | 87  |
| Figura 13. Linearidade do método alternativo de laminocultivo.....  | 88  |
| Figura 14. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo PCA da fase aquosa.....   | 90  |
| Figura 15. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase aquosa.....   | 92  |
| Figura 16. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida MBO-100 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo PCA da fase aquosa.....                             | 93  |
| Figura 17. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto por MBO-50 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo PCA da fase aquosa.....                 | 95  |
| Figura 18. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto por MBO-50 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase aquosa.....     | 96  |
| Figura 19. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto MBO-50 na concentração de 1000ppm, no meio de cultivo PCA da fase aquosa.....                    | 97  |
| Figura 20. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto de MBO-50 na concentração de 1000ppm, no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase aquosa.....     | 98  |
| Figura 21. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo PCA da fase oleosa B10.....   | 99  |
| Figura 22. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase oleosa B10.....   | 100 |
| Figura 23. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto de MBO-50 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo PCA da fase oleosa B10.....              | 101 |
| Figura 233. Estimativa em UFC.mL <sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto de MBO-50 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase oleosa B10..... | 102 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 25a. Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase aquosa. (Tanques 1, 2, 3, e 4).....                       | 105 |
| Figura 25b. Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase aquosa. Tanques 5, 6, 7 e 8).....                         | 105 |
| Figura 26a Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase oleosa (superfície do tanque). (Tanques 1, 2, 3, e 4)..... | 107 |
| Figura 26b. Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase oleosa (superfície do tanque). Tanques 5, 6, 7, e 8)..... | 107 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>ANP</b>      | Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |
| <b>ASTM</b>     | American Society for Testing and Materials                  |
| <b>BDA</b>      | Ágar batata dextrose agar                                   |
| <b>HPA</b>      | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos                     |
| <b>MBO</b>      | 3,3'-methylene bis (5- methyloxazolidine)                   |
| <b>TPF</b>      | Trifenil Formazan   |
| <b>TTC</b>      | Cloreto de Trifeniltetrazólio                               |
| <b>PCA</b>      | Ágar padrão para contagem                                   |
| <b>ppm</b>      | Partes Por Milhão   |
| <b>O.G.Y.E.</b> | Ágar de extrato de levedura oxitetraciclina glicose         |
| <b>SDS</b>      | Sulfato Dodecil de Sódio                                    |
| <b>UFC</b>      | Unidade Formadora de Colônia                                |
| <b>USP</b>      | United States Pharmacopeia                                  |
| <b>VRBA</b>     | Ágar Bile Vermelho-Violeta                                  |

## LISTA DE UNIDADES

|    |              |
|----|--------------|
| °C | Grau Celsius |
| g  | Grama        |
| mL | Mililitro    |
| µL | Microlitro   |
| µm | Micrometro   |
| %  | Porcentagem  |

## 1. INTRODUÇÃO

O monitoramento da contaminação microbiana é um importante mecanismo de controle e prevenção da deterioração que pode ocorrer durante o armazenamento de combustíveis. Durante a estocagem, especialmente de óleo diesel B (com presença de biodiesel), podemos encontrar condições que podem promover o desenvolvimento indesejado de microrganismos e comprometer a qualidade final do produto.

A presença de água, que entra no sistema de armazenamento pela condensação da umidade do ar, pela entrada eventual pela abertura do tanque ou carregada pelo próprio combustível, é a condição que acelera o desenvolvimento microbiano. Esta água irá se concentrar no fundo do tanque (água livre) e também poderá catalisar processos de degradação natural dos compostos presentes, tanto no diesel como no biodiesel da mistura B5, comercializada no território brasileiro. Algumas espécies de microrganismos, que estão no ambiente, e que encontram esta condição, crescem e produzem biomassa. Além desta suscetibilidade da mistura diesel e biodiesel à biodeterioração durante a estocagem, produtos de origem química, podem

aparecer devido a reações inerentes e naturais de degradação da mistura. Como consequência direta, é observada a formação de sólidos visíveis no combustível podendo levar a uma saturação prematura de elementos filtrantes, de filtros dos motores, bloqueio em injetores e o comprometimento da qualidade final do produto.

Para assegurar a integridade do combustível recomenda-se seguir as Boas Práticas de Armazenamento de Combustíveis que incluem a prevenção de contaminação cruzada, a drenagem obrigatória da água do tanque e inspeções visuais regulares do combustível. Em alguns tipos de formato de tanque, é impossível a drenagem em certos pontos, além da contaminação microbiana se difundir de um tanque para outro com a passagem de um combustível sem contaminação, através de mangueiras, ou filtros, que tenham sido utilizados para um combustível contaminado.

A partir da inspeção de um tanque de armazenamento e constatada a presença das duas fases (água de lastro e combustível diesel B), deve-se inspecionar a interface óleo - água, a fim de se detectar a presença de sedimentos, indicativa do crescimento microbiano nesta região. Além da drenagem do tanque de armazenagem, a utilização de biocidas pode ser utilizada para manutenção da qualidade de óleos combustíveis armazenados.

Uma rotina de monitoramento durante a estocagem do combustível pode indicar se é o momento para uma ação preventiva, a necessidade de remediação ou validar a efetividade das ações preventivas.

Além do conhecimento das condições de estocagem do combustível, a densidade microbiana pode indicar se o sistema está em números aceitáveis ou em condição de alerta para a tomada de medidas. Devido a superfície do Agar presente nos laminocultivos e pelo fato de os

microrganismos permanecerem e se desenvolverem na fase aquosa a metodologia para estimativa de microrganismos nesta fase é mais simples do que, quando comparada, a fase oleosa. Na fase oleosa podem estar presentes células de microrganismos e esporos de fungos, dispersos em microgotículas que, necessitam de uma maior atenção para serem recuperadas e a contaminação microbiana estimada.

O método padrão proposto pelo Instituto do Petróleo- IP 385/99 e a Norma ASTM D 6974/04, é utilizado para se estimar o crescimento microbiano tanto na fase aquosa como na fase oleosa. Resumidamente, o método consiste na filtração da amostra de combustível e/ou água do lastro dos tanques e inoculação, da membrana utilizada na filtração em meio de cultura apropriado para realização do procedimento de Contagem em Placa de células viáveis de microrganismos. Trata-se de uma metodologia demorada e dispendiosa, por necessitar de equipe técnica e equipamentos específicos.

Trata-se de uma metodologia mais prática e rápida ela pode ser uma boa alternativa para investigação direta de amostras potencialmente contaminadas, podendo ser utilizada, inclusive por qualquer usuário, mesmo sem treinamento laboratorial específico para esta análise, como filtragem da amostra em sistema específico, placas de Petri, preparo de meios de cultura, entre outros, embora não se descarte a utilização de estufa para o crescimento dos microrganismos.

Na avaliação da contaminação microbiana em combustíveis com a utilização de método microbiológico alternativo, como os laminocultivos, sua validação necessita ser assegurada de interpretações errôneas, que podem subestimar ou superestimar a população microbiana. Neste sentido, é necessária a padronização do uso de kits microbiológicos de laminocultivos

como uma metodologia para avaliação da contaminação microbiana e de fungos filamentosos em armazenamento e controle da qualidade de combustíveis. Neste trabalho, compara-se um kit microbiológico de laminocultivos (produzido no Brasil) com um procedimento que realiza uma estimativa de contagem direta ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) clássico e conhecido, o Método de Contagem em Placa, em amostras de combustíveis contaminados na mistura de diesel/biodiesel (B10) e biodiesel (B100).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar e validar em testes de laboratório a utilização de laminocultivos visando estimar o grau de contaminação microbiológica em óleo diesel B, sob condições de estocagem simulada, avaliando-se a fase aquosa e a fase oleosa.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Avaliar comparativamente o crescimento em fase aquosa dos microrganismos deteriorogênicos de óleo diesel *Paecilomyces variotti*, *Candida silvicola* e *Bacillus pumilus* ( $10^2$  a  $10^9$  células/mL), em meio de cultura pelo método de espalhamento em placa (UFC's) e com os laminocultivos;

**2.2.2** Avaliar comparativamente o crescimento em fase oleosa, de um inóculo preparado conforme norma ASTM E1259-10, em frascos com diesel puro (B0) e biodiesel (B100) durante 60 dias com os laminocultivos em amostras com e sem diluição;

**2.2.3** Comparar o efeito dispersante de 5 compostos surfactantes (Goma xantana, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 e SDS) e a Solução salina pura na estimativa de microrganismos presentes na fase oleosa de mistura (B10) e biodiesel puro (B100);

**2.2.4** Estimar o volume de amostra representativa de combustível diesel (B0), biodiesel (B100), mistura diesel e biodiesel (B10), e água presente durante a estocagem para análise microbiológica por laminocultivos;

**2.2.5** Validar a estimativa dos microrganismos *Paecilomyces variotti*, *Candida silvicola*, *Pseudomonas sp.* e *Bacillus pumilus* pelo uso de laminocultivos com o método padrão de filtração sugerido pela norma IP 385/99 em amostras simuladas de estocagem de fase oleosa (combustíveis diesel B0, B100 e a mistura B10) e fase aquosa;

**2.2.6** Analisar a efetividade do monitoramento por laminocultivos, em estocagem simulada de mistura B10, tratada com dois antimicrobianos (MBO50 e MBO-100) em duas concentrações (500 ppm e 1000 ppm);

**2.2.7** Monitorar com laminocultivos a densidade microbiana (bactérias e fungos) da fase oleosa e aquosa durante 60 dias do armazenamento simulado da mistura B10 em tanques de 20 L tratadas ou não com o biocida MBO-50 na concentração de 1000 ppm.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Diesel, biodiesel e suas misturas: Condições durante o armazenamento**

Dentre os combustíveis derivados de petróleo, o óleo diesel é considerado um importante combustível na matriz energética brasileira. É composto predominantemente por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, mas sua composição varia muito, devido às diferentes origens do petróleo utilizado como matéria-prima e diferentes processos de refino (Braun et al., 2004; Liang et al., 2005; Aleme et al., 2010). Sob condições normais de armazenamento o combustível diesel pode permanecer viável por 12 meses ou mais, em um ambiente de 20 °C, e de 6 a 12 meses, em temperatura ambiente superior a 30 °C. Quanto maior for o tempo de estocagem do combustível diesel e ocorre a formação de sedimentos e goma, provocada pela reação dos componentes do combustível com o oxigênio do ar (BP, 2005).

O processo de envelhecimento do óleo diesel, durante o armazenamento, pode ser acelerado por alguns fatores como: exposição a

altas temperaturas, exposição à poeira e sujeira que podem conter elementos que possam desestabilizar o combustível, a composição do combustível e a presença de água, que podem catalisar reações, principalmente de oxidação e que permite o crescimento de fungos e bactérias que também podem produzir ácidos orgânicos, comprometendo a qualidade final do combustível (BP, 2005; Berrios et al., 2012).

A partir da criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e a aprovação da Lei 11.097, em 2005, foi regulamentada a introdução do biodiesel na matriz energética do Brasil, sendo mandatória sua mistura de 2 % ao diesel comercializado a partir de 2008. O óleo diesel comercializado sem a adição de biodiesel é designado de óleo diesel A e a mistura do biodiesel com o óleo diesel veicular é denominada de óleo diesel B. Assim como o combustível de origem fóssil, o óleo diesel B requer determinados cuidados, para que a qualidade do produto se mantenha da produção ao consumidor final (ANP, 2010).

O biodiesel pode ser misturado em qualquer proporção com o diesel mineral, ou ser utilizado em sua forma pura (Chauan et al., 2009). Previamente à mistura com o óleo diesel, quando recebido, o biodiesel deve obedecer às especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2010). Porém, devido a algumas de suas características e ao contrário dos combustíveis fósseis que são relativamente inertes e mantêm as suas características essenciais pouco alteradas, o biodiesel degrada-se com o tempo devido ao contato com contaminantes e é mais facilmente deteriorado no ambiente, tornando-o mais suscetível à instabilidade durante seu armazenamento (Borsato et al., 2012; Yang et al,

2013). A estrutura química, composta de ésteres alquílicos de ácidos graxos com ligações simples ou duplas, podem ser oxidadas quimicamente, fotodegradadas ou ser alvo da preferência de alguns microrganismos na biodegradação (Fazal et al., 2012; Aquino et al., 2012; Yang et al., 2012).

O biodiesel puro ou em mistura com o diesel pode ser armazenado assim como o óleo diesel mineral sem a necessidade de uma infraestrutura própria (Chauan et al., 2009). Conforme o National Renewable Energy Laboratory/US Department of Energy (2009), a maioria dos tanques destinados a armazenar o combustível diesel irá armazenar o biodiesel (B100). Alguns materiais, para tanques de armazenamento aceitáveis incluem o aço, alumínio, polietileno fluorado, Teflon® e na maioria dos casos fibra de vidro. Tal como acontece com o diesel de petróleo, o biodiesel tem de ser transportado de uma maneira que não conduz o produto à contaminação e alguns procedimentos são recomendados para caminhões e vagões, utilizados pelos distribuidores e transportadoras, para os derivados de petróleo diesel no Manual de Orientações e Procedimentos para o Manuseio e Armazenagem de Óleo Diesel B da Agência Nacional do Petróleo (2010).

Segundo a ANP (2010) a aquisição e uso da norma ABNT NBR 15.512, faz-se imprescindível para estabelecer os requisitos e procedimentos para o armazenamento, transporte, abastecimento e controle de qualidade de biodiesel e/ou mistura óleo diesel/biodiesel. Sendo a adoção e efetiva aplicação desta norma indispensável para garantir a qualidade do combustível, minimizando a contaminação por impurezas, degradação microbológica e oxidativa.

Os tanques de armazenamento subterrâneo são comumente utilizados para a estocagem de combustíveis de petróleo e as infiltrações de combustível dos tanques corroídos ou com defeito e do seu sistema de tubulação são fenômenos que não podem ser detectados sem o equipamento apropriado (Coutinho & Gomes, 2006; Brito et al., 2010). Um tanque pode estar perdendo seu conteúdo para o solo por anos sem nenhum indicativo de vazamento a não ser que poços de água e córregos nas proximidades sejam contaminados (Nadim, 2000; Cunha et al., 2008 ).

Sendo assim, a fim de se evitar a contaminação do solo ou de fonte de água próximas, bem como garantir a qualidade do produto comercializado, as recomendações de Boas Práticas de Armazenamento de Combustíveis podem ser seguidas como a principal medida de precaução da contaminação durante o armazenamento do combustível. Para ANP (2010) o óleo diesel B deve ser preferivelmente armazenado pelo prazo de até um mês, os tanques utilizados na armazenagem devem apresentar-se limpos, secos e protegidos da luz e temperaturas extremas para evitar a oxidação do combustível ou a incorporação de contaminantes. A presença de ar nos tanques de armazenagem, que pode favorecer a oxidação do combustível pode ser evitada mantendo-se os tanques no limite máximo permitido, reduzindo-se a quantidade de ar em contato com o combustível.

Para garantir a manutenção da qualidade do combustível comercializado, na contínua renovação do conteúdo dos tanques de estocagem é necessário limitar a presença de combustível envelhecido bem como a realizar drenagem do produto remanescente no fundo do tanque, para

retirada de água, material microbiológico e outras impurezas regularmente (ANP, 2010; Ministério de Minas e Energia da Colômbia, 2011).

### **3.2 Fatores envolvidos no processo de degradação abiótica e biótica de combustíveis**

#### **3.2.1 Natureza do combustível e instabilidade durante o armazenamento**

Durante o armazenamento de um combustível a sua estabilidade é relatada como a habilidade para resistir às mudanças físicas e químicas que podem ocorrer provocadas pela sua própria reação com o ambiente em que se encontra. Com relação ao biodiesel, espera-se um aumento dos problemas que podem ocorrer já observados durante o armazenamento do diesel derivado do petróleo (Bouaid et al., 2007; Jain & Sharma, 2010).

A estabilidade do biodiesel pode ser afetada por diversos fatores, como luz, temperatura, hidrólise e oxidação, que podem provocar alterações na composição deste combustível e comprometer a qualidade final do mesmo. Pelo fato deste biocombustível ser produzidos a partir de óleos vegetais e outras fontes naturais ele acaba por ser mais suscetível ao processo de oxidação e degradação (Jain & Sharma, 2010; Schultz, 2010).

A oxidação pode ocasionar a formação de ácidos graxos de cadeias curtas corrosivos, depósitos que podem causar aumento no desgaste das bombas de combustível do motor (Yang et al., 2013) e mudanças no pH (Geller et al., 2010).

A estabilidade oxidativa é um parâmetro que descreve a tendência à deterioração do biodiesel e é importante ser destacada no contexto de

possíveis problemas nas peças do motor (Karavalakis et al., 2010). Em grandes tanques de armazenamento de petróleo, os processos de degradação do óleo ocorrem mais intensamente devido ao fluxo de oxigênio superior para os tanques e a presença de água no fundo dos tanques (Yemashova, 2007).

A presença de numerosas ligações duplas nas moléculas de ácidos graxos livres levam a uma desestabilização na molécula permitindo a entrada de oxigênio para o processo de oxidação, além do mais o biodiesel é composto de 50 % de metil-ésteres insaturados o que o torna mais suscetível a contaminação (Cavalcanti, 2009; Schultz, 2010).

### **3.2.2 Água**

À medida que o combustível se resfria, um pouco de água livre pode se estabelecer no fundo do tanque, outra parte permanece livre em suspensão e o restante dissolvido no combustível. As três fases aquosas permanecem em equilíbrio dinâmico e dependem da alteração da temperatura do combustível, umidade relativa do ar em contato com o combustível e o grau de turbulência devido a movimentos mecânicos. Sempre que a água livre está presente há potencial para o crescimento inaceitável de microrganismos (McFarlane, 2011).

O acúmulo de água no fundo do tanque de armazenamento e em tubulações é o primeiro pré-requisito para o desenvolvimento de microrganismos em combustíveis e subsequente sua contaminação biológica. Esta atividade biológica também aumenta o conteúdo de sólidos suspensos, leva a formação de biofilmes e geram uma variedade de problemas operacionais (Yemashova et al., 2007). De maneira geral, para que seja

possível manter uma rotina de boa prática durante a estocagem de combustíveis, o principal fator a ser controlado é a água. Mesmo sendo impossível remover 100% da água que pode se acumular no tanque, é observado que a redução do conteúdo de água impede a biodeterioração do combustível armazenado (Siegert, 2009).

Não há crescimento microbiano sem a presença de água e as flutuações de temperatura também podem promover a condensação de água no tanque de estocagem de combustível (Hill & Hill, 2009). O biodiesel possui uma maior afinidade do que o diesel de petróleo em relação ao conteúdo de umidade, e a capacidade de retenção de água do biodiesel são maiores do que a do diesel. O conteúdo de água presente em combustíveis pode ser classificado como: livre, emulsionada e água solúvel. Um alto conteúdo de água, presente durante o armazenamento e em equipamentos de transporte, em combustíveis diesel e biodiesel pode ocasionar problemas de crescimento de microrganismos devido ao acúmulo de água (Fregolente et al., 2012).

O conteúdo de água é um fator ambiental importante, que quando limitado, pode inibir a atividade microbiana. Os microrganismos são capazes de sobreviver em locais com mínima quantidade de água. Observou-se que níveis de água baixos como 1 % podem suportar crescimento microbiano substancial, onde endósporos bacterianos podem manter crescimento na presença de 50-80 ppm de água no sistema de combustíveis (Raikos et al., 2012).

A contaminação por água pela condensação é considerada como uma das principais razões para o desenvolvimento da corrosão em tanques de armazenamento e em oleodutos. A água solubiliza íons corrosivos e permite o crescimento microbiano na solução e na interface óleo/água, onde os

microrganismos podem hidrolisar os ésteres metílicos, presentes no biodiesel e produzir mais ácidos graxos corrosivos (Aktas et al, 2010; Haseeb et al, 2010; Wang et al., 2011).

### **3.2.3 Nutrientes**

Muitos microrganismos são capazes de metabolizar hidrocarbonetos presentes em combustíveis convencionais. Os nutrientes necessários são fornecidos principalmente pelos hidrocarbonetos do combustível e em segundo lugar pelos aditivos que o combustível contém, como compostos fosforados e nitrogenados. Têm sido observado que o diesel e o combustível de aviação (médio destilados) são mais propensos ao crescimento microbiano (Gaylarde et al., 1999; Dzięgielewski et al., 2009; Godos et al., 2012) uma vez que as cadeias de hidrocarbonetos entre C10-C18 são prontamente utilizadas como fonte de carbono pelos microrganismos (Dodos et al., 2012).

Os ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel e outros compostos de carbono, como os hidrocarbonetos presentes no diesel mineral, não suportam sozinhos o crescimento microbiano. Uma pequena quantidade de compostos contendo nitrogênio e fósforo são limitantes do crescimento (Hill & Hill, 2009).

As misturas de diesel/biodiesel contém todos os nutrientes habituais do óleo mineral e possivelmente alguns outros, tais como anti-oxidantes adicionais e pode ser esperado à fornecer suporte ao crescimento microbiano pelo menos similar ao crescimento em óleo diesel mineral (Hill & Hill, 2009).

### 3.2.4 Degradação microbiana

Durante seu processamento, a esterilidade do combustível é assegurada pela alta temperatura envolvida no processo. Porém quando transferido para um tanque de armazenamento na refinaria ocorre a primeira oportunidade para o desenvolvimento de problemas microbianos (McFarlane, 2011). A ação microbiana para a biodeterioração de combustíveis é diretamente influenciada por parâmetros bióticos e abióticos e entre eles, uma atenção especial deve ser dada a temperatura, pH, fonte de nitrogênio e fósforo, assim como a presença de micronutrientes (Gomes et al., 2009), disponibilidade de oxigênio, água, pressão osmótica e salinidade (Passman, 2003).

De maneira geral, microrganismos aeróbicos (fungos e bactérias) se desenvolvem na interface óleo-água e bactérias anaeróbicas (bactérias redutoras de sulfato/BRS) crescem em áreas livres de oxigênio (fundo do tanque). Os nutrientes são dissolvidos do combustível para a fase aquosa. Pode haver a formação de emulsões óleo-água, a maioria das emulsões é instável e normalmente a água se acumula no fundo do tanque, porém sob algumas circunstâncias, os microrganismos podem excretar biossurfactantes levando a formação de emulsões óleo-água estáveis (Lee et al., 2010).

A susceptibilidade dos hidrocarbonetos à degradação microbiana depende da natureza e quantidade de hidrocarbonetos presentes e pode ser classificada na seguinte ordem: alcanos com ligações simples > alcanos ramificados > aromáticos pequenos > alcanos cíclicos (Das & Chandran, 2011).

O óleo diesel é considerado um importante combustível na matriz energética brasileira. É composto predominantemente de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, mas sua composição varia muito, devido às diferentes origens do petróleo utilizado como matéria-prima e diferentes processos de refino (Braun, et al., 2004).

A mineralização de misturas de hidrocarbonetos complexas, assim como as que constituem o combustível diesel, usualmente requerem a coexistência e eficaz cooperação de diversos microrganismos especializados com especificidade para substratos complementares (Zanarolli et al., 2010).

A biodegradação de diesel, conforme relatado por Zhang et al., 1998, que consiste em uma grande quantidade de alcanos (cadeias de hidrocarbonetos de C10-C20) sem oxigênio aderido, demanda a adaptação de microrganismos para produzir enzimas que reconheçam estas moléculas. Além do mais, a presença de hidrocarbonetos alifáticos cíclicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alquilbenzenos, assim como seus derivados tolueno, xileno e PCBs dão ao combustível diesel uma estrutura química mais complexa (Mariano et al., 2008).

O biodiesel como um agente oleofílico tem o potencial de solubilizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), presentes na fração diesel, além de ter a capacidade de agir como um agente de estímulo para a biodegradação (Wu et al., 2010), dependendo da concentração utilizada (Schleicher, 2009).

O biodiesel é mais facilmente metabolizado que o diesel por ser um produto natural consistindo puramente de ácidos graxos que são cadeias de

hidrocarbonetos com dois átomos de oxigênio aderidos ao final de uma ponta da cadeia, que são muito ativos biologicamente, sendo reconhecidos e atacados prontamente por enzimas como a acetil-CoA desidrogenase (Mariano et al., 2008).

### **3.3 Consequências do crescimento microbiano durante o armazenamento de combustíveis**

A atividade e proliferação microbiana ocorre, principalmente, na interface combustível água, onde a disponibilidade de água e nutrientes é adequada para o seu desenvolvimento. Como resultado, pode ser formada uma fase intermediária membranosa chamada de biofilme. Os microrganismos também podem colonizar o fundo do tanque, as paredes do tanque e o espaço superior do tanque e tubulações (Dodos et al., 2012).

Como pode ser observado na Tabela 1, típicos problemas operacionais são semelhantes aos problemas ocasionados pelo crescimento microbiano em combustível diesel para combustíveis diesel, a saber, a formação de biofilmes (biomassa microbiana) na tubulação e entupimento de filtros, erros de aferição do combustível e emulsificação da água com o combustível levando à corrosão do tanque (Energy Institute, 2008, Hill & Hill, 2009).

**Tabela 1.** Consequências da contaminação microbiana durante a estocagem e microrganismos envolvidos no processo (Fonte: Adaptado de Gaylarde et al., 1999).

| <b>Problemas detectados</b>                | <b>Principais tipos de microrganismos</b>  |
|--|--|
| Bloqueio de mangueiras, válvulas e filtros | Fungos e bactérias produtoras de polímeros |
| Aumento do conteúdo da água                | Todos                                      |
| Formação de sedimento                      | Todos                                      |
| Produção de biossurfactante                | Fungos e bactérias aeróbias                |
| Corrosão de tanques e tubulações           | Fungos e bactérias anaeróbias              |
| Produção de sólidos suspensos              | Todos                                      |
| Degradação dos hidrocarbonetos             | Fungos e bactérias aeróbias                |
| Bloqueio de injetores                      | Fungos e bactérias aeróbias                |
| Aumento do conteúdo de enxofre             | Bactérias redutoras de sulfato (BRS)       |
| Comprometimento do sistema de injeção      | Todos                                      |

A corrosão microbiana é a principal causadora de falhas nas tubulações (pipelines), sendo o maior componente afetado que interfere nos custos de operação e manutenção dos oleodutos da indústria de petróleo. Ao menos 40 % da corrosão de oleodutos internos na indústria de gás é atribuída a corrosão microbiana (Rajasekar, 2007).

A atividade microbiana pode aumentar a corrosividade do combustível e da água associada a este. Os principais mecanismos para este efeito são identificados pela redução no pH. Os biossurfactantes, que são moléculas com características detergentes produzidas por microrganismos, auxiliam na dispersão das gotículas de água no combustível. As propriedades corrosivas das gotículas de água irão contribuir para a corrosividade do combustível. Além disso, a bioconversão de moléculas de combustível não-polares em espécies carregadas irá afetar a corrosividade do combustível (Passman, 2005). O acúmulo de água no fundo do tanque de armazenamento permite o crescimento de microrganismos e pode levar a corrosão

microbiologicamente induzida (MIC, em inglês) nas estruturas do tanque (Rajasekar & Ting, 2010).

A presença de biofilmes, mucopolissacarídeos e micélios podem levar a problemas operacionais como o bloqueio de filtros, além disso, biossurfactantes produzidos como subprodutos metabólicos podem deixar o combustível turvo e desarmar filtros coalescentes (McFarlane, 2011).

O biodiesel puro tem sido associado com alguns problemas mecânicos e bloqueio de tubos, válvulas e filtros devido à sua alta viscosidade e baixa volatilidade (Gaylarde et al., 1999; Meher et al., 2006; Chao et al., 2010). A viscosidade dos óleos vegetais é maior do que a do diesel de petróleo comum devido à estrutura química e alto peso molecular de suas moléculas (Demirbas, 2007; Chao et al., 2010).

Os microrganismos podem produzir efeitos negativos na propriedade dos combustíveis durante o processo de degradação, situação que quando estabelecida pode ser mais preocupante no caso do querosene de aviação, cuja biodeterioração, especialmente por fungos filamentosos, já foi referida como a principal causa de colisões durante voos (Rauch et al., 2006; Rodríguez-Rodríguez, 2010).

Na interface óleo-água, os fungos podem formar uma película membranosa densa que pode ser muito forte estruturalmente (Passman, 2003). Células vegetativas de fungos filamentosos são limitadas por uma parede bem definida, constituída por várias camadas compostas de quitina. Elas tem um crescimento ramificado ou micélio, formado de filamentos individuais chamados de hifas as quais formam um “tapete” microbiano na

interface óleo-água presente no armazenamento de combustíveis (McFarlane, 2011).

A atividade microbiana descontrolada pode, gradualmente, prejudicar a qualidade do combustível comercializado (Bento & Gaylarde, 2001), causando turbidez no combustível, formação de lodo no fundo do tanque e de sedimentos, algumas vezes acompanhados de um odor desagradável. A contaminação será propagada a diferentes locais, durante toda a cadeia de transporte, distribuição e fornecimento de combustível, sendo o sintoma de contaminação microbiana, mais comumente identificado, a obstrução de filtros (Dodos et al., 2012).

### **3.4 Monitoramentos microbiológicos em combustíveis**

Os problemas relacionados à contaminação microbiana durante o armazenamento, muitas vezes são difíceis de diagnosticar e requerem um microbiologista experiente, ou um especialista em biodeterioração. Se todos os envolvidos em manipulação/armazenamento de combustíveis e sistemas de combustíveis tiverem um conhecimento geral sobre a microbiologia de combustíveis, eles poderão auxiliar na redução dos custos de qualidade causados pela biodeterioração (Passman, 2003).

Os tanques de armazenamento que apresentam contaminação microbiana são identificados pela presença de uma fase aquosa e uma fase oleosa (combustível) cujo monitoramento deve ser feito de forma específica e separadamente. O interesse em se utilizar a contagem de microrganismos como bioindicador da contaminação, é que as mudanças nos números da

contagem destes microrganismos são indicativas de um processo de biodegradação ativo, mas não representa necessariamente uma medida precisa da biodegradação real (Maila & Cloete, 2005).

As medidas da distribuição de microrganismos em um tanque de combustível diesel demonstram que, na água presente no fundo do tanque são encontrados  $8,2 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. No nível de entrada e saída de combustível (acima da água) a concentração microbiana foi maior atingindo  $1,9 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>. No meio do tanque, somente 117 células.mL<sup>-1</sup> foram estimadas e no topo do tanque não foram detectadas células microbianas viáveis. Petróleo bruto ou produtos do petróleo podem ser classificados por pequena e grande presença de microrganismos presentes na água do fundo (Yemashova, 2007).

Segundo Hill & Hill (2009), para o monitoramento da contaminação microbiana em combustíveis, é possível estabelecer padrões para os níveis de contaminação, aceitáveis ou não, durante uma rotina em um posto revendedor de combustível. Estes níveis podem ser observados na Figura 1, que segue logo abaixo, além das recomendações sobre o procedimento de amostragem da fase oleosa e da fase aquosa, quando presente.

Na Figura 1a observa-se o limite aceitável de contaminação presente em amostra de combustível igual ou abaixo de  $10^1$  UFC.mL<sup>-1</sup> ou  $10^4$  UFC.L<sup>-1</sup>. Neste nível é recomendado continuar a rotina de monitoramento e se for encontrada fase aquosa, uma drenagem desta água deve ser realizada.

Na Figura 1b, nota-se o limite de alerta, durante uma rotina de monitoramento da contaminação presente em amostra de combustível entre de  $10^1$  UFC.mL<sup>-1</sup> (ou  $10^4$  UFC.L<sup>-1</sup>) e  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> (ou  $10^5$  UFC.L<sup>-1</sup>). Quando o nível de contaminação de combustível está em alerta, recomenda-se que a

frequência da drenagem seja aumentada e, se houver a formação de lodo, que esse seja removido da interface óleo-água e refazer o teste dentro de um mês.

## ROTINA DE MONITORAMENTO (Fonte: Adaptado Hill e Hill, 2009)



Figura 1. Recomendações para uma rotina de monitoramento da contaminação microbiana em amostras de água e combustíveis (Fonte: Adaptado Hill & Hill, 2009).

Para uma tomada de ação, a fim de se evitar a perda de qualidade do combustível, na Figura 1c, observa-se que, se for encontrada uma contaminação microbiana maior que  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> (ou  $10^5$  UFC.L<sup>-1</sup>), deve ser realizado outro teste microbiológico e um procedimento para investigar a qualidade do combustível. Se houver a presença de lodo pode ser considerada a desativação do tanque de armazenamento para drenagem da água presente e sua limpeza.

Têm havido inerentes problemas na padronização de procedimentos de amostragem, coleta de amostras e testes de combustíveis e interpretação de resultados. Um teste de laboratório quantitativo baseado no procedimento de filtração em membrana IP385/95 é mundialmente aceito como um método de referência (Hill, Hill & Collins, 1997).

#### **3.4.1 Métodos para o monitoramento microbiológico de combustíveis**

Para avaliar a contaminação microbiana em combustíveis são comumente utilizados, as contagens de células viáveis de fungos e bactérias totais, recuperados diretamente de amostras de combustíveis. Porém, usualmente são observadas contagens menores do que as encontradas em água contaminada, comumente presente no fundo dos tanques (Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). A localização da água no fundo dos tanques constitui o principal local para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos e a

interface óleo/água, o local onde a maior atividade microbiana e biodegradação do combustível se desenvolvem (Rodríguez-Rodríguez et al., 2009).

A normativa IP 385 de 1999, intitulada “*Determinação do conteúdo microbiano aeróbico de combustíveis e componentes de combustível destilados abaixo de 390 °C – Método de filtração e cultura*” descreve o procedimento de filtração de amostra de combustível e inoculação de membrana em meio de cultura apropriada para a determinação da estimativa de contaminação microbiana. Este procedimento requer o conhecimento de técnicas microbiológicas específicas que são necessárias para a execução desta metodologia. Esta técnica padrão descreve dois procedimentos para a estimativa da contaminação em combustíveis. O Procedimento A é adequado para a enumeração de unidades microbianas viáveis de até 25 000 por litro e o Procedimento B é adequado para a enumeração de unidades microbianas viáveis acima de 25 000 por litro (Passman, 2003; Hill, 2003; Klofutar e Golob, 2007).

Ambos procedimentos utilizam dois meios de cultivo seletivos que permitem a contagem de bactérias e de fungos separadamente. O princípio do método consiste que após a separação de qualquer fase aquosa, volumes de combustível conhecidos são filtrados assepticamente através de filtros de membrana. Os microrganismos viáveis coletados nos filtros são inoculados pela colocação diretamente em meios de cultivo ou pela eluição dos microrganismos da membrana, diluindo-se o seu conteúdo em solução adequada e então a inoculação em meio de cultivo. Após incubação o número de colônias são contadas e destes dados o número de bactérias e fungos

viáveis presentes são calculados de acordo com o volume da amostra de combustível original (Passman, 2003).

A normativa ASTM D6469 de 1999 “*Guia padrão para a contaminação microbiana em combustíveis e sistemas de combustíveis*” é fundamentada em diferentes documentos designados ao controle e especificação de combustíveis e fornece informações sobre as condições que levam ao desenvolvimento da contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis além de características gerais de um sistema contaminado e as estratégias para o controle da contaminação microbiana (Passman, 2003; Gammon, 2009; Ministério de Minas e Energia da Colômbia, 2011).

O método padrão do Instituto do Petróleo-IP 385/99 e a similar norma ASTM D 6974/04, para análise do crescimento microbiano em fase aquosa e na fase oleosa consistem na filtração da amostra de combustível e posterior inoculação da membrana utilizada na filtração em placas de meios de cultura o que caracteriza uma metodologia demorada e dispendiosa, por necessitar de equipe técnica e equipamentos específicos.

A metodologia padrão IP 385/95 é inadequada para utilização *in situ*, mas é frequentemente considerada como um método de referência preciso (Hill, 1998).

### **3.4.2 Método alternativo de laminocultivos**

O método de laminocultivos foi desenvolvido por Guttman e Naylor. (1967) a partir de uma extensão lógica de um procedimento proposto por

Mackey e Sandys em 1965, para análise da contaminação de microrganismos em amostras de urina. Segundo os autores Mackey e Sandys (1965), considerando-se que o modo mais adequado para avaliar a concentração de bactérias em uma amostra de urina é a contagem de células viáveis, a metodologia proposta seria facilitadora de uma inoculação rápida e prática logo que a amostra era colhida. Assim seria possível evitar o tempo perdido entre a coleta e o encaminhamento da amostra de urina até um laboratório, além de uma possível etapa de refrigeração da amostra, caso esta sofresse um atraso no despacho.

A concepção do produto como um meio de transporte do inóculo colhido de amostras de urina, foi do enchimento de uma colher com meio de cultura sólido dentro de frascos de vidro, fechados com uma tampa de rosca. Após a amostra ser coletada a “colher” com o meio de cultura era retirada de dentro do frasco de vidro e imersa no frasco onde estava a amostra retornando prontamente ao frasco original. Esta metodologia era adequada para uma rotina laboratorial e foi correlacionada com a metodologia padrão de Pour-plate de contagem de células viáveis (Mackey & Sandys, 1965).

Baseados na ideia de Mackey e Sandys em 1965, de um meio de cultura sólido para o transporte de culturas de microrganismos, os autores Naylor e Guttmann (1967) desenvolveram os diplides (laminocultivos, em português) como uma alternativa mais econômica, preparados a partir de materiais facilmente disponíveis e dois diferentes meios de cultura poderiam ser utilizados simultaneamente. Os laminocultivos consistiam em lâminas de vidro de microscópio, revestidas em cada lado com um meio de cultura diferente. Essas lâminas poderiam ser imersas em amostras de urina e

colocadas dentro de cilindros de alumínio para incubação e contagem de colônias. O número de colônias no meio de cultivo é a medida da concentração das bactérias na urina fresca.

A partir desse método proposto foi possível realizar a estimativa de contaminação na urina de um grande número de amostras que eram coletadas e em menor tempo correlacionando a contagem dos laminocultivos com o método tradicional de contagem em placa, com o que estava presente no fluido de análise (Guttman & Naylor, 1967).

A comparação de diferentes laminocultivos para a avaliação do grau de contaminação em amostras de combustíveis, provenientes de tanques de estocagem foi demonstrada por Bailey e May, em 1979. Ao demonstrar resultados positivos em laboratório, os kits primeiramente foram adequados para indicar alterações nas populações microbianas nos tanques de combustíveis de navios. Nesse artigo os autores avaliaram 13 tipos diferentes de kits microbiológicos de laminocultivos em comparação com o método padrão de contagem em placa, pois esses conseguiam demonstrar os perigos da contaminação no processamento de alimentos, na área médica e industrial por ter a capacidade de expor os primeiros sinais de contaminação (Bailey & May, 1979).

Segundo Hill e Hill (2000), a contaminação microbiana precisa ser avaliada em todas as fases de distribuição e uso de combustíveis e os laboratórios de análises não estão disponíveis no mundo inteiro, conseqüentemente, a indústria precisa de testes *in situ* para o monitoramento microbiológico. Alguns testes podem ser apropriados para o uso na análise de amostras da fase aquosa e não adequados para o uso em combustíveis, ou

vice-versa. O método de uso dos laminocultivos pode ser limitado, pois pode subestimar a contaminação microbiana especialmente em amostra oleosa, onde a absorção do combustível à superfície do Agar pode ser errônea e a sensibilidade numérica inadequada.

Porém, em testes realizados por Bailey e May (1979) com laminocultivos de diferentes tipos e fabricantes, que apresentaram resultados comparáveis ao Método de Contagem em Placa/Pour Plate, nota-se que estes kits não foram projetados para imersão em combustíveis. Foi destacado que a contagem de organismos pode não ser precisa, mas estudos posteriores precisam ser feitos para correlacionar os números reais por mililitro de combustível com o que é evidente no kit de teste microbiológico.

Um kit microbiológico designado especificamente para a detecção de contaminação microbiana em combustíveis é o MicrobMonitor desenvolvido a partir da necessidade de um teste sensível, simples e quantitativo para o monitoramento da contaminação de combustíveis, porém este método não é reconhecido como um padrão pelas diretrizes do Instituto do Petróleo (Hill, Hill & Collins, 1997). O teste consiste na inoculação de uma alíquota de combustível em um frasco contendo um agente gelificante tixotrópico<sup>1</sup> e um meio de cultura típico como o TSA (Agar de triptona de soja). Era esperado que a amostra pudesse ser dispersa no gel por vigorosa agitação e que após solidifica-se para incubação e contagem de células viáveis convencional. O

---

<sup>1</sup> Tixotropia: a capacidade de um gel e liquefazer à medida que lhe aplicamos uma determinada quantidade de calor ou uma força mecânica, como cisalhamento ou vibrações. Após a cessação do calor ou da força aplicada, esse mesmo gel, então liquefeito, possui a capacidade de voltar ao seu corpo original.

indicador redox Cloreto de tetrazólio foi incluído para facilitar a leitura e contagem das colônias (Hill, Hill & Collins, 1997).

Os laminocultivos consistem em uma superfície de plástico, cobertas com meios de cultura específicos dos dois lados e as vantagens de se utilizar o laminocultivo para avaliação de contaminação, é de que este não necessita de treinamento ou equipamento específico, reduz a possibilidade de contaminação por ser facilmente manuseável, é uma alternativa mais simples e fácil de utilizar que a contagem em placa, etc. (Chalut & Rose, 2004).

Os laminocultivos comercializados atualmente no Brasil são utilizados para contagem microbiana aeróbica, de bactérias, leveduras ou fungos em amostras líquidas, viscosas ou sólidas (estas duas últimas põem ser utilizadas desde que diluídas em diluente apropriado na diluição de 1:10) mas para a avaliação da contaminação microbiana em combustíveis, sua validação necessita ser assegurada de possíveis más interpretações desta contaminação (Nutrilab, 2008).

As instruções contidas no protocolo para utilização de laminocultivos são fáceis de serem seguidas e se o teste for realizado adequadamente, deve-se enfatizar somente três precauções especiais nas instruções: (1) evitar tocar no dispositivo de amostragem (laminocultivo) nada além do que o líquido de teste; (2) reinserir o laminocultivo no seu tubo imediatamente após a imersão; e (3) evitar a abertura dos tubos já incubados (Nutrilab, 2008).

### 3.4.2.1 Validação de método microbiológico alternativo

O método padrão para se estimar microrganismos e garantir a rastreabilidade em uma dada amostra, consiste na utilização de um método de referência (ou oficial), levando-se em consideração a natureza dos microrganismos e ao conceito bem reconhecido de UFC (Unidade Formadora de Colônia) (Boubetra et al, 2011; Lombard & Leclercq, 2011).

Segundo Boubetra et al. (2011), o pré-requisito para o uso comercial e de rotina de qualquer método alternativo é fornecer evidência de que este método é equivalente ao método de referência correspondente. A medida em si, pode ser simplesmente definida como a quantidade destinada a ser medida. Sendo assim, a medida definida por um método de referência, pode ser diferente quando definida por um método alternativo. Para propósitos práticos, porém, e para se realizar a validação, é necessária a aproximação destas medidas recuperadas pela metodologia de referência e pela metodologia alternativa.

A análise microbiológica evolui lentamente envolvendo os métodos tradicionais, com a detecção de microrganismos requerendo dias e até mesmo semanas. Diferentemente, os métodos microbiológicos rápidos (RMM, em inglês) podem detectar a presença de um único microrganismo em horas de incubação. O capítulo <1223> "Validation of Alternative Microbiological Methods" da Farmacopéia dos Estados Unidos (USP, sigla em inglês) (2010), fornece informações sobre a validação de métodos microbiológico alternativos, pois exige que o método alternativo alcance resultados equivalentes ou melhores do que o método de referência (Duguid et al., 2011)

Especificidade e sensibilidade são os parâmetros mais críticos para a validação de testes qualitativos, mas robustez e precisão também necessitam consideração. Adicionalmente, para testes quantitativos, ensaios de exatidão, limite de quantificação, linearidade e de faixa operacional precisam ser executados (Taverniers et al., 2004; Duguid et al., 2011).

A exatidão de um teste quantitativo é observada pela proximidade do valor encontrado pelo método alternativo e o real demonstrado pela comparação com o padrão de referência, e usualmente expresso pela porcentagem de recuperação (Duguid et al., 2011). O método alternativo deve fornecer uma estimativa de células viáveis não menor do que 70 % do estimado pelo método tradicional (USP, 2010).

A precisão do método alternativo é o grau de concordância entre os resultados individuais do teste quando este é submetido a múltiplas amostragens das suspensões de microrganismos preparadas em laboratório, através do alcance do método. É expressa pelo desvio padrão (coeficiente de variação) (USP, 2010; Taverniers et al., 2004; Feinberg, 2007; Duguid et al., 2011).

O limite de detecção é a menor quantidade de microrganismos que pode ser detectado em uma amostra pelo método alternativo quando comparado à metodologia de referência (USP, 2010; Taverniers et al., 2004; Duguid et al., 2011).

Segundo a USP (2010) e Taverniers et al. (2004), o limite de quantificação é o menor número de microrganismos que podem ser contados com precisão. O limite de quantificação de um método alternativo não deve ser

maior do que a quantificação pela metodologia tradicional, o método alternativo só deve demonstrar que é no mínimo tão sensível quanto o método tradicional.

A linearidade de um teste microbiológico quantitativo é a capacidade de demonstrar resultados que são proporcionais a concentração de microrganismos presentes na amostra dentro de um determinado intervalo. É expressa através do quadrado do coeficiente de relação  $R^2$  a partir da análise de uma regressão linear (USP, 2010; Duguid et al., 2011). Segundo Taverniers et al. (2004) a especificidade é a porcentagem de diferentes tipos de microrganismos que podem ser detectados nos meios específicos para bactérias e/ou fungos.

Para a substituição e adequação do método de referência para um método alternativo requer que o último demonstre equivalência nas respostas obtidas (Duguid et al., 2011). Em análises microbiológicas de rotina, as metodologias utilizadas devem ser validadas a fim de se garantir resultados confiáveis que podem ser interpretados satisfatoriamente, dada a ampla variedade de microrganismos envolvidos em uma análise microbiológica (Assis et al., 2011).

### **3.4.3 Utilização de laminocultivos para estimativa da contaminação microbiana em fase oleosa**

Os laminocultivos podem apresentar erros substanciais no volume de amostra absorvida na superfície do Agar então para o teste de fluidos não aquosos, a amostra pode ser primeiramente processada em filtração por membrana ou emulsificação antes do procedimento de contagem de células viáveis (Hill, 1997).

Um das aplicações de surfactantes químicos é na emulsificação de amostras viscosas para análise microbiológica. O processo de emulsificação de amostra de combustível baseada na normativa da Associação Francesa de Normalização (AFNOR) M 07070/92 – *Combustíveis para motores diesel e instalações de aquecimento doméstico – Pesquisa de contaminação por microrganismos por meio de ensaios em meio de cultivo em ágar*, consiste na adição de 2 mL de combustível a 18 mL de uma solução aquosa de Tween 80 0,1 %, onde posteriormente o laminocultivo é imerso nesta amostra ou uma contagem de células viáveis totais é realizada por espalhamento em placa. Esta técnica é fundamentada na habilidade do surfactante Tween 80 em separar e dispersar agregados microbianos , principalmente esporos de fungos (Hill, 1997).

A utilização de surfactantes na microbiologia é conhecida, principalmente, na área da biorremediação. Millioli (2009) avaliou a aplicação de surfactantes em solo impactado com óleo cru para o auxílio no tratamento de biorremediação. Em geral a degradação de hidrocarbonetos é acompanhada por um processo de emulsificação do composto, resultando em uma maior interface óleo-água (Reisfeld et al., 1972; Bento & Gaylarde, 1996; Muthukumar et al., 2007). Durante o procedimento de biorremediação de compostos derivados de petróleo, os surfactantes podem ser utilizados para aumentar a solubilização de compostos hidrofóbicos presentes como HPAs, pela redução da tensão interfacial das superfícies entre os HPAs e a água, favorecendo a biodisponibilidades das moléculas para a sua degradação pelos microrganismos (Bautista et al. 2009).

A presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na mesma molécula é uma característica fundamental na propriedade física dos surfactantes, o que permite que estes compostos formem micelas quando em solução. A formação destas micelas dos surfactantes em solução garantem as suas propriedades detergentes e de solubilização (Cirelli et al., 2008).

Os surfactantes químicos estão disponíveis sob variadas formulações e são geralmente classificadas baseadas em sua carga como: aniônicos, não-iônicos, catiônicos e anfóteros. Exemplos familiares utilizados em laboratório de biologia inclui o Dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um alquil sulfato aniônico, e Triton X-100, um álcool etoxilado não-iônico (Tabela 1). Em termos gerais, os surfactantes catiônicos são os mais tóxicos e tem sido utilizados como antimicrobianos, enquanto agentes tensoativos aniônicos são menos tóxicos e mais ativos contra bactérias gram-positivas do que as gram-negativas. Os não-iônicos geralmente são considerados não tóxicos (Van Hamme, 2006).

**Tabela 2.** Exemplos de classes de surfactantes químicos usualmente utilizados em laboratórios de biologia.

| <b>Carga</b>           | <b>Classe</b>  |
|------------------------|--|
| Aniônicos              | Alquilsulfatos<br>(inclui Dodecil sulfato de sódio, o SDS)               |
| Não-iônicos            | Álcoois etoxilados (inclui Triton X-100)<br>Polisorbatos (inclui Tweens) |
| Catiônicos             | Sais de amônio alquil quaternários                                       |
| Surfactantes anfóteros | Lectina  |

(Fonte: Adaptado de Van Hamme, 2006).

Muthukumar et al. (2007), observou em ensaio realizado com dois surfactantes não-iônicos, um deles o Triton X-100, que surfactantes não-

iônicos também possuem propriedade biocida em combustível diesel, controlando a contaminação microbiana com 0,1 % v/v de surfactante.

Os efeitos tóxicos dos agentes tensoativos sobre as bactérias são em grande parte da ruptura direta da membrana celular ou reações do surfactante com enzimas essenciais para o funcionamento da célula. Surfactantes com estrutura química similar podem exercer efeitos amplamente variáveis sobre as espécies bacterianas (Rouse et al., 1994; Song & Bielefeldt, 2012).

Segundo Van Hamme (2006), os agentes tensoativos podem exercer efeitos tóxicos por causar a ruptura da membrana levando a lise celular, pelo aumento da permeabilidade da membrana provocando o vazamento de metabólitos e pela alteração da estrutura física da membrana ou pelo rompimento das conformações das proteínas, interferindo com importantes funções da membrana, como geração de energia e transporte. Os mecanismos de resposta dos microrganismos a estas ações dos surfactantes pode depender de uma variedade de fatores como a estrutura celular, capacidade de biodegradação ou efluxo, concentração do surfactante, biodisponibilidade e outras condições ambientais.

### **3.5 Controle da biodeterioração em tanques de armazenagem**

A adoção de medidas eficazes para suprimir o crescimento microbiano nos tanques de estocagem de combustível incluem métodos físicos, assim como as boas práticas de armazenamento, e métodos químicos como a

adição de biocidas que impedem o desenvolvimento de microrganismos (Yemashova, 2007; Raikos et al., 2012).

Onde os problemas em locais de distribuição de combustíveis foram recorrentes, em uma questão de semanas depois do tratamento com biocida, é possível que o tratamento não tenha sido totalmente eficaz em virtude da falha do biocida em penetrar em biofilmes acumulados nas linhas de tubulação de combustíveis (Hill & Hill, 2009). Sendo assim, os procedimentos de limpeza e drenagens regulares são medidas físicas que impedem o acúmulo da água formada nos lastros e constituem-se em uma forma estratégica no controle da infecção microbiana (Passman, 2005; Siegert, 2009; Klinkson, 2009).

Segundo Passman (2003), as estratégias que podem ser realizadas a fim de se evitar a contaminação podem ser:

- Tanques projetados para facilitar a remoção da água e de sólidos presentes no fundo dos tanques;

- Amostragem e análises frequentes do combustível para avaliação da contaminação, elemento crítico para uma efetiva estratégia de controle da biodeterioração;

- A remediação começa com prevenção porque os microrganismos necessitam de água para o seu desenvolvimento e uma intensiva prática de remoção de água é importante. Após a água ser retirada do tanque uma amostragem pode ser realizada para testar a possível presença de microrganismos;

- Limpezas regulares do tanque (Boas práticas de armazenamento);

- Utilização de biocidas.

Os biocidas compreendem um grupo com amplo espectro de produtos, com componentes e estrutura químicas diversas. A utilização de biocidas sintetizados para uso em combustíveis e biocombustíveis tem sido recomendada nos Estados Unidos e Europa (Bücker et al., 2010). Dois tipos de biocidas utilizados em combustíveis amplamente conhecidos, são baseados quimicamente em isotiazolonas e oxazolidinas (Hill & Hill, 2009).

Uma das características desejadas de um antimicrobiano para o uso em tanques, é o amplo espectro de atividade pois é preciso avaliar a efetividade do biocida sobre outros microrganismos deteriorogênicos do sistema (Bücker et al., 2010). Os compostos de isotiazolonas são microbiocidas, disponíveis em uma mistura de dois ou mais produtos químicos de isotiazolonas, usualmente 5-cloro-2-metil-4-isotiazol-3-ona e 2-metil-4-isotiazol-3-ona (sigla MIT-CMIT) em uma proporção de 2,7:1 (Chervenak, 2000; Huber et al., 2010).

Bento & Gaylarde (2001), em avaliação de diferentes concentração de isotiazolonas observaram que a levedura *Candida silvicola* foi um dos fungos mais sensíveis as concentrações de 60 ppm e 600 ppm do produto, porém os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Hormoconis resinae* foram mais resistentes, sendo necessária uma concentração maior de biocida por mais tempo de contato para que o esporo se torne inviável.

As oxazolidinas são compostas de 3,3'-methylene bis (5-methyloxazolidine) (sigla, MBO), que pertence à classe de produtos com potencial de serem liberadores de formaldeído (Groot et al., 2010) e solúveis em água (Gaylarde et al., 1999). O formaldeído é um agente alquilante que age sobre todos os tipos de microrganismos. Seu mecanismo de ação envolve

a alquilação entre a aldoxila do formaldeído e os átomos de hidrogênio lábeis dos radicais amino (-NH<sub>2</sub>), hidroxila (-OH) e carboxila (-COOH) de proteínas e ácidos nucléicos, impedindo que esses elementos celulares executem suas funções (Rutala & Weber, 2008; Barbosa & Sartori, 2012).

Biocidas liberadores de formaldeído como o MBO, são misturados a óleos solúveis em água, para inibir o crescimento excessivo de populações de bactérias e fungos, incluindo espécies de *Pseudomonas*, redutores de sulfato anaeróbicos (*Desulfovibrio desulfuricans*) e fungos, como espécies de *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Candida* (Groot et al., 2010).

A concentração do biocida é um fator importante para a efetividade da ação do composto e o controle dos microrganismos, porém a utilização de grandes concentrações de biocidas devem ser evitadas para se evitar reações inesperadas e incompatibilidades, além de preocupações com a segurança e riscos ambientais (Hill & Hill, 2009).

A presença de muitos aditivos no combustível diesel tem sido responsável pelo aumento dos problemas ocasionados pela contaminação microbiana. Os testes realizados com biocidas são importantes para melhorar as propriedades físicas e químicas do combustível, devido a seu potencial como estimuladores do crescimento microbiano. A utilização de um aditivo por microrganismos não resulta somente no aumento de problemas causados pela contaminação, mas também leva a neutralização (decomposição) do aditivo (Gaylarde et al, 1999).

Testes preliminares em microcosmos podem fornecer informações que razoavelmente podem prever o desempenho dos biocidas a campo. Na medida do possível os microcosmos devem ser montados levando-se em consideração as condições a campo (Passman, 2013). Os ensaios podem ser realizados utilizando-se um inóculo não caracterizado, conforme sugerido pela Norma ASTM E1259-10 (ASTM 2010d; Passman; 2013), para garantir que a diversidade taxonômica de microrganismos encontrados nas condições reais (Passman, 2013).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Laminocultivos

Os laminocultivos utilizados foram o Nutrilab E e Nutrilab F da fabricante Laborclin® (Paraná/Brasil). O Nutrilab E destina-se à contagem de microrganismos da família das *Enterobacteriaceae* e contagem total de microrganismos, contendo em uma face da lâmina o meio de cultivo PCA (Agar para contagem) e na outra face o meio de cultivo VRBA (Agar Bile Vermelho-Violeta). O Nutrilab F destina-se à contagem de bolores e leveduras e contagem total de microrganismos, contendo o meio de cultivo Agar O.G.Y.E. (Agar de extrato de levedura oxitetraciclina glicose) em uma face e o meio de cultivo PCA (Agar para contagem) na outra face da lâmina.

O Agar para contagem (PCA) contém Cloreto de tetrazólio (TTC), que é utilizado como aceptor final de elétrons pelos microrganismos durante seu crescimento. O TTC é oxidado dentro da célula a Trifenil Formazan (TPF), o que torna as colônias vermelhas, e por esta razão foi adicionado ao meio, facilitando a visualização do crescimento de microrganismos (Souza et al, 2005).

Para observação da estimativa da concentração de microrganismos em laminocultivos é necessária a comparação do crescimento no meio de cultivo da lâmina com o gabarito disponibilizado na bula do produto, como visto na Figura 2.

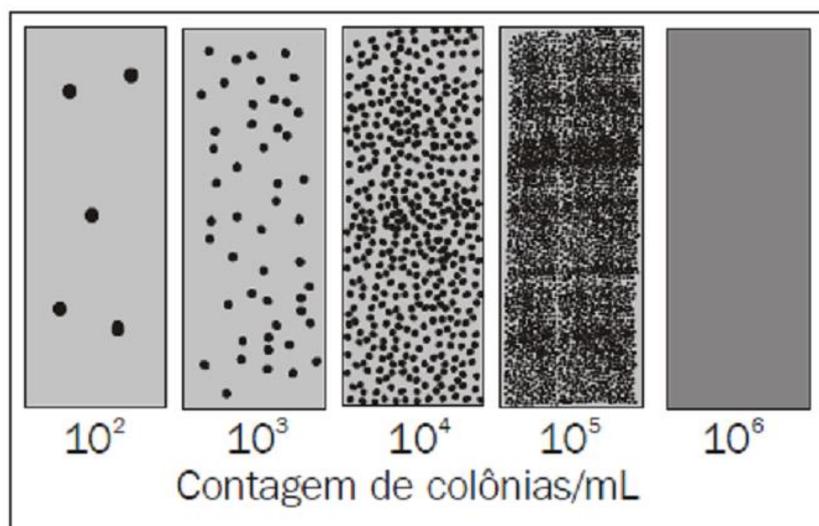


Figura 2. Gabarito de correspondência do número de UFC.mL<sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de Colônia/Mililitro).

#### 4.2 Meios de cultura para Contagem em Placa

Para contagem total de bactérias utilizou-se o meio Ágar para contagem (PCA) (Anexo 9.1.1) e para bolores e leveduras o Ágar Batata dextrose (BDA) (Anexo 9.1.2).

#### 4.3 Combustíveis

Foram utilizadas amostras de combustíveis fornecidas pela Base de Distribuição da Ipiranga Produtos de Petróleo S/A, Canoas, Rio Grande do Sul. Foram utilizados o diesel composto com até 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de enxofre (Anexo 9.2.1) e o biodiesel produzido a partir de soja e sebo bovino (75:25) (Anexo 9.2.2). A mistura de B10 foi preparada em laboratório com provetas

desinfetadas e posteriormente foi esterilizada pela passagem em filtro contendo membrana filtrante (0,22  $\mu\text{m}$ ) (Milipore) em sistema de vidro estéril e um Kitassato. O combustível estéril foi então armazenado em frasco de vidro previamente esterilizados em autoclave a 121 °C a 1 atm, e coberto com alumínio para evitar a fotoxidação (Bücker, 2009).

#### **4.4 Ensaio comparativo para estimativa em fase aquosa**

##### **4.4.1 Microrganismos utilizados**

Os microrganismos utilizados neste ensaio foram: a bactéria *Bacillus pumilus*, isolada de borra oleosa de centrífuga de óleo diesel. A levedura *Candida silvicola* e o fungo *Paecilomyces variotii*, isolados de mistura de diesel e biodiesel e identificados por Bücker *et al.* (2011).

##### **4.4.2 Padronização dos inóculos**

Os microrganismos foram padronizados a partir do crescimento de culturas de 24 horas para a bactéria *Bacillus pumilus*, 48 horas para a levedura *Candida silvicola* e de 7 dias do fungo *Paecilomyces variotii*. No cultivo de *Bacillus pumilus* em meio inclinado de Ágar nutriente (Anexo 9.1.3) e da *Candida silvicola* em meio inclinado Ágar malte (Anexo 9.1.4), adicionou-se uma alíquota de 2 mL de solução salina 0,085 g.L<sup>-1</sup> (Anexo 9.1.5), para concentração e suspensão das células bacterianas e leveduriformes. No cultivo do fungo *Paecilomyces variotii*, em meio inclinado ágar malte (Anexo 9.1.4) foi adicionado uma alíquota de Tween 80 na concentração de 0,01 % v/v para evitar a agregação dos esporos.

Foi realizada em câmara de Neubauer a contagem de células/esporos.mL<sup>-1</sup> e preparadas em frascos estéreis de poliestireno com capacidade de 50 mL, no volume final de 40 mL, as soluções nas concentrações de 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4.3 Estimativa dos microrganismos por contagem em placas**

O Método de Contagem em Placa também é um dos testes mais utilizados para indicar o crescimento de células viáveis. É um método demorado, visto que é necessário aguardar a multiplicação de uma célula isolada no meio sólido de modo que esta forme uma colônia macroscopicamente visível, para ser contada. (Vermelho *et al.*,2006). Após as diluições seriadas, para isolamento e contagem de microrganismos, as amostras diluídas seriadamente podem ser inoculadas de duas formas, pelo espalhamento em superfície, onde uma alíquota da amostra é adicionada a placas de Agar sólido ou então o espalhamento em profundidade (*pour plate*), onde uma alíquota da amostra é inserida numa placa de Petri vazia e o meio de cultura com ágar, ainda líquido é adicionado posteriormente. O procedimento é inadequado para uso *in situ*, mas é considerado um método de referência preciso (Hill, 1997; Rauch et al., 2006).

O preparo das placas para contagem foi realizado de acordo com o método de espalhamento, onde 100 uL da amostra de cada concentração de microrganismos presentes em tubos estéreis com capacidade de 50 mL, eram espalhados com o auxílio da alça de Drigalski em placas de meios de cultura Agar malte, para a levedura e o fungo filamentoso e Ágar nutriente, para a bactéria. As maiores concentrações foram diluídas entre 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-6</sup> em

tubos de 1 mL, com 900 µl de solução salina 0,085 g.L<sup>-1</sup> mais 100 µl da solução com microrganismos e diluídas em série, para poder se realizar a contagem de colônias por mL em placa e avaliadas juntamente com os resultados apresentados pelos laminocultivos.

#### **4.4.4 Estimativa de microrganismos pelos laminocultivos**

Os laminocultivos foram mergulhados dentro das soluções de cada microrganismo por aproximadamente 10 segundos e então foram acondicionados em sua embalagem.

A imersão dos laminocultivos foi realizada de acordo com as instruções do fabricante Laborclin® onde, as amostras devem ser inoculadas prontamente após o seu preparo, removendo-se o lacre e mergulhando as lâminas com os meios no fluido em análise, e voltar a adaptar a tampa com as lâminas no frasco logo após a imersão, rosqueando e fechando a tampa. Incubar na temperatura e tempo adequado para o microrganismo a ser isolado e após observar o crescimento de colônias em cada meio comparando o resultado, ou seja, a forma de dispersão das colônias sobre a superfície da lâmina com o padrão do gabarito na bula do laminocultivo, para se obter o resultado em UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4.5 Condições de crescimento e avaliação**

A bactéria *B. pumilus*, inoculada em placas e nos laminocultivos, nas concentrações determinadas, foi incubada por 48 h a 35 °C e a levedura *C. silvicola* e o fungo *P. variotii* por 48 h - 96 h a 28 °C. Os resultados da contagem dos laminocultivos são representados por UFC.mL<sup>-1</sup> avaliando-se visualmente seu grau de contaminação de acordo com o gabarito

disponibilizado nas instruções do fabricante para o uso do produto. As placas foram incubadas em conjunto com os laminocultivos.

#### **4.5 Estimativa de microrganismos na fase oleosa**

##### **4.5.1 Ensaio preliminar para estimativa em fase oleosa**

Para a estimativa de microrganismos em fase oleosa foi avaliado o cenário de uma contaminação alta na faixa de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Foram avaliadas as amostras de combustível B10 e B100 com e sem diluição em solução Salina 0,085 g.L<sup>-1</sup>.

O experimento foi montado em frascos de vidro de 100 mL, com uma fase aquosa/ oleosa na proporção de 1:10. Para a fase aquosa foi utilizado água de lastro (Anexo 9.2.4) proveniente de tanques de armazenagem de mistura B5. Na fase oleosa foi utilizada a mistura B10 e o biodiesel puro (B100), conforme recebidos. Com relação ao nível de contaminação microbiana, foi estimada uma concentração de  $10^6$  de esporos e células.mL<sup>-1</sup> de uma borra biológica coletada de um tanque de armazenagem com B5, conforme sugerido pela Normal ASTM E1259-10.

As amostras foram colhidas dos frascos de ensaio nos tempos de 0 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias e o monitoramento microbiológico foi realizado com os laminocultivos Nutrilab E e Nutrilab F.

#### **4.5.2 Soluções de diluentes e surfactantes para diluição e estimativa em fase oleosa**

Para se evitar a subestimação da contaminação microbiana, previamente inoculada na amostra de óleo diesel B10 foi conduzida a etapa de avaliação de soluções e surfactantes para a diluição da amostra de combustível e sua avaliação por laminocultivos e contagem em placa.

A normativa M 07-070/92 da organização de acreditação e certificação francesa AFNOR (Hill, 1998), prevê as amostras de combustível devem ser diluídas em Tween 80 0,1 % v/v antes de serem testadas pelo método de laminocultivos. O laboratório fabricante dos laminocultivos Laborclin®, recomenda a diluição de amostras viscosas/oleosas em diluente estéril apropriado. Desta forma, foi realizada a avaliação de diferentes surfactantes químicos: Tween 20, Tween 80 (Delaware®), SDS e Triton X-100 e, duas soluções utilizadas em laboratórios de microbiologia (Solução salina 0,085 g.L<sup>-1</sup> e goma xantana 1 g.L<sup>-1</sup> da marca Sporiti®) na formação de soluções (ou emulsões) óleo/água para análise microbiológica com a utilização de laminocultivos Nutrilab E (PCA/bactérias) e Nutrilab F (PCA/leveduras e fungos filamentosos).

Em triplicata, foi preparada a diluição de uma amostra da mistura B10 com adição de uma concentração de microrganismos-teste com inóculo de 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, nas soluções descritas anteriormente na proporção de 1:10 (solução aquosa/óleo)

Em tubos estéreis de poliestireno com capacidade de 50 mL foram preparadas diluições de 5 mL de cada fraco com B10 em 40 mL de Solução

Salina  $0,085 \text{ g.L}^{-1}$ , Tween 20 0,01 % v/v, Tween 80 0,01 % v/v, , Triton X-100 0,01 % v/v, SDS  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  e Goma Xantana  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Após a agitação das soluções, os laminocultivos foram imersos nas mesmas, e foram retiradas alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  para placas com meios de cultura Agar nutriente e Agar malte para contagem de  $\text{UFC.mL}^{-1}$  em placa.

#### **4.6 Determinação do volume de amostra**

A fim de se avaliar a representatividade do volume de amostra para análise microbiológica de óleo combustível diesel e água de lastro, foram realizados ensaios levando-se em consideração o volume de amostra requerido na normativa IP 385/99 (50 mL de combustível e 1 mL de água), o volume requerido e sugerido no kit microbiológico, desenvolvido pelo laboratório Echa Microbiologia Ltd. (Reino Unido), MicrobMonitor (0,1 mL - 0,25 mL) e o volume de amostra requerido para a análise pelo método alternativo de laminocultivos (5 mL de combustível e 1 mL de água).

Foi avaliada a amostra de mistura (B10), esterilizada por filtração em membrana  $0,22 \mu\text{m}$ , onde se inoculou todo o consórcio, os microrganismos citados anteriormente, em uma concentração de  $10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . A partir das triplicatas de cada amostra foram avaliados os volumes de 1 mL, 5 mL, 25 mL, 50 mL e 100 mL por contagem em placa e por laminocultivos.

Dos resultados observados foram obtidas as médias para os gráficos correlacionando a sensibilidade quantitativa, do método de contagem em placa e do método dos laminocultivos, com o gradiente de volume.

## **4.7 Validação da fase oleosa**

### **4.7.1 Microrganismos**

Nessa etapa de validação de um método microbiológico quantitativo, alternativo, na estimativa da contaminação microbiana em combustíveis, foram utilizados isolados microbianos representantes de diferentes categorias de microrganismos (Mattos et. al., 2009): uma bactéria gram-positiva, *Bacillus pumilus*, uma bactéria gram-negativa *Pseudomonas*, uma levedura a *Candida silvicola* e um fungo filamentosos o *Paecilomyces variotii*. Esses microrganismos foram selecionados por serem encontrados como potenciais degradadores de hidrocarbonetos em amostras de combustíveis, isolados de ensaios anteriores (Bento & Gaylarde, 2001; Bucker et al., 2011).

Em um, primeiro momento realizou-se o ensaio com a levedura *Candida silvicola*. O preparo do inóculo foi realizado pela contagem de células.mL<sup>-1</sup> em Câmara de Neubauer e pela contagem de células viáveis.

### **4.7.2 Ensaio em fase oleosa**

Observando-se os critérios para validação de método microbiológico quantitativo alternativo do capítulo 1223 da USP, Farmacopéia dos Estados Unidos (2010), sendo esses a precisão/reprodutibilidade, exatidão, especificidade, limite de detecção e quantificação e linearidade, foram realizados ensaios para a determinação desses parâmetros em amostras de mistura B10. Para análise de todos os parâmetros citados anteriormente e determinação da exatidão, a avaliação foi realizada simultaneamente com o método de análise microbiológica padrão de combustíveis, a IP 385/99.

### **4.7.3 Ensaio de precisão**

Foi preparada uma suspensão de microrganismos na concentração máxima de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> delimitada pelo método de laminocultivos diluída serialmente até a concentração mínima  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> de sensibilidade do método, correspondendo a concentração mínima capaz de ser detectada. Entre esses limites foram preparadas 6 concentrações de microrganismos ( $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) contendo 10 réplicas de cada concentração. A partir dos resultados foi possível calcular o desvio padrão das estimativas estatisticamente significantes.

### **4.7.4 Ensaio de limite de detecção e de quantificação.**

Para determinação do limite de detecção, realizou-se a inoculação dos microrganismos selecionados e seriadas diluições, até  $10^{-3}$ , de uma concentração de aproximadamente 50 UFC.mL<sup>-1</sup>. O limite de detecção será observado pelo menor número de microrganismos que pode ser detectado pelo método alternativo. A partir da menor quantidade de microrganismos, na amostra que, podem ser detectados, mas não quantificados necessariamente em um valor exato de células viáveis quando comparado ao método padrão (Taverniers, De Loose & Bockstaele, 2004).

O limite de quantificação irá corresponder a concentração de células viáveis de microrganismos quantificáveis, com um coeficiente de variação (%RSD) não maior que 15 % (USP, 2010), obtida tanto pelo método padrão como pelo método alternativo de laminocultivos, determinando o seu limite de quantificação com precisão (Thompson et al, 2002).

O limite de detecção e o limite de quantificação são determinados a partir da realização do ensaio com 6 réplicas da amostra a ser testada .

#### **4.7.5 Ensaio de linearidade**

O objetivo deste ensaio é avaliar a habilidade do método alternativo em produzir resultados proporcionais à concentração de microrganismos presentes nas amostras, através do intervalo do teste, pela seleção de 5 concentrações de cada microrganismo padrão em 6 réplicas de cada concentração.

#### **4.7.6 Ensaio para especificidade**

A especificidade foi avaliada e demonstrada pela utilização de microrganismo de categorias diferentes (bactérias e fungos) em meios de cultura opostos ao que estes são designados. O laminocultivo Nutrilab E, utilizado para o crescimento de bactérias e para contagem total, foi imerso em tubos de poliestireno estéreis de 50 mL, com suspensões de esporos e células, respectivamente, de *Paecilomyces variotii* e da *Candida sp.* O laminocultivo Nutrilab E, utilizado para contagem de fungos e leveduras e para contagem total, foi imerso em tubos de poliestireno estéreis de 50 mL contendo soluções de bactérias *Bacillus pumilus* e *Pseudomonas*.

### **4.8 Estimativa da contaminação microbiana em fase aquosa e oleosa da mistura B10 com adição de biocida.**

#### **4.8.1 Biocidas**

Neste experimento avaliou-se a efetividade de dois produtos designados pelo seu ingrediente ativo como **MBO-50** e **MBO-100** na

concentração de 0 mg.Kg<sup>-1</sup> (ppm), 500 mg.Kg<sup>-1</sup> (ppm) e 1.000 mg.Kg<sup>-1</sup> (ppm), em amostras de óleo combustível B10 em microcosmos, com fase aquosa composta pelo meio mineral Bushnell-Hass (Anexo 9.1.6). As concentrações foram indicadas pelo fabricante dos produtos. O produto designado **MBO-50** utilizado é um aditivo multifuncional com mistura de Oxazolidina, que contém 50 % v/v de MBO-3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine). Biocidas com 50 % de fração antimicrobiana MBO, são insolúveis ou pouco solúveis em água e considerados aditivos multifuncionais.

O produto designado **MBO-100** é o componente antimicrobiano em sua formulação pura de MBO -3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine). Solúvel em fase aquosa e de acordo com a concentração deste na fase aquosa é facilmente degradado.

#### **4.8.2 Montagem dos microcosmos**

Foram montados em frascos de vidro (microcosmos), contendo 20 mL de fase aquosa (Bushnell- Hass) (Anexo 9.1.6) e 60 mL de fase oleosa. Foi utilizada a mistura B10 com 90% v/v de óleo diesel S50 (9.2.1) contendo 10 % v/v de biodiesel de soja (9.2.2).

O inóculo microbiano não caracterizado constituiu-se da mistura de lodos biológicos retirados de tanques de armazenamento de biodiesel (B5), conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10. As análises foram conduzidas em tanques com dois diferentes níveis de contaminação: baixa, sendo a condição do combustível conforme recebido (10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>); e média, em que houve a adição de inóculo microbiano na concentração de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Os biocidas foram previamente adicionados ao combustível, e após a homogeneização, a fase oleosa foi adicionada aos frascos. O experimento foi

realizado com amostras destrutivas e três réplicas para cada tratamento. Todos os frascos foram previamente agitados para homogeneização do conteúdo e acondicionados em caixas fechadas mantidas em temperatura ambiente. Os tempos amostrais foram 0 dias, 14 dias, 28 dias, 42 dias e 60 dias.

#### **4.8.3 Análises para estimativa da contaminação por laminocultivos e por contagem em placa.**

O monitoramento da contaminação da fase aquosa foi analisada pelo método padrão de contagem em placa em superfície nos meios de cultura PCA e BDA e com os laminocultivos Nutrilab E e Nutrilab F, sendo realizada a aplicação de 1 mL em cada face das lâminas contendo os meios de cultivo.

A estimativa da contaminação em fase oleosa foi realizada pela diluição de 5 mL do óleo B10 (volume estabelecido na sessão 4.6) em 40 mL de solução de surfactante Tween 80 0,01 % e também pelo método de contagem direta em placa em meio PCA e BDA para obtenção da UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.9 Laminocultivos: Monitoramento em tanques piloto de 20 L**

O experimento foi conduzido em 8 tanques de aço carbono, com capacidade para 20 L. A estes tanques foram adicionados 1 % v/v de água de lastro (pH 4,5) (Anexo 9.2.4), de tanques de armazenamento de diesel. A mistura B10, foi confeccionada com óleo diesel com 50 ppm de enxofre (B0) (Anexo 9.2.1), e biodiesel (B100- produzido a partir de soja e sebo bovino-75:25) (Anexo 9.2.3). Os resultados do monitoramento em tanques de 20 L foram obtidos em duplicatas.

Avaliou-se a efetividade do biocida presente no aditivo multifuncional, designado como **MBO-50** que contém cerca de 50 % do biocida MBO (3,3'-methylene bis (5- methyloxazolidine) na concentração final de 1000 ppm.

O inóculo microbiano não caracterizado constituiu-se da mistura de lodos biológicos retirados de tanques de armazenamento de biodiesel (B5), conforme sugerido na Norma ASTM E1259-10. As análises foram conduzidas em tanques com dois diferentes níveis de contaminação: baixa, sendo a condição do combustível conforme recebido ( $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>); e média, em que houve a adição de inóculo microbiano na concentração de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

As coletas de amostras para verificação de contaminação através dos kits de laminocultivos Nutrilab E e F (Laborclin®) foram conduzidas nos tempos 0 dias, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 60 dias e 90 dias, porém sem ser realizada, simultaneamente, a estimativa referente ao método padrão de contagem em placas de meio de cultura. A coleta das amostras correspondeu a: 8 amostras de óleo de superfície, 8 amostras de óleo de fundo e 8 amostras de água de lastro por cada tempo analisado. De acordo com orientação do laboratório fabricante, as análises dos óleos foram feitas pela diluição na proporção 1:10 em solução salina 0,085 g.L<sup>-1</sup> (solução testada anteriormente) e as amostras de água de lastro foram diretamente inoculadas nos laminocultivos. Em cada amostra diluída mergulhou-se os laminocultivos Nutrilab E e o Nutrilab F por 10 segundos, sendo que após a identificação, foram levados para estufa de 35 °C e 28 °C respectivamente. Os resultados foram avaliados após o período de 48 horas, 72 horas e até 96 horas e obtidos em UFC.mL<sup>-1</sup>, conforme bula do fabricante.

#### 4.10 Análise estatística

Os dados da análise de crescimento microbiano ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) foram interpretados a partir da análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey, de comparação múltiplas entre as médias, com nível de significância de 95 % ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o programa Statistica (StatSoft®), versão 7.0.

Para a análise estatística no ensaio de validação de amostra utilizaram-se as referências de análises estatísticas estipuladas pela Farmacopeia dos Estados Unidos, (USP sigla, em inglês) Capítulo 1223 de 2010, para o ensaio de exatidão do método se realizou a análise de variância das amostras (ANOVA). No ensaio de precisão o coeficiente de variação do método foi calculado e comparado com os valores da USP Capítulo 1223 (Anexo 9.2.5), para a metodologia de referência de contagem em placa. Para o limite de detecção foi observado o menor número de microrganismos encontrado nas réplicas das amostras e, o limite de quantificação, o menor número de microrganismos estimados com precisão pelo método alternativo. A linearidade foi determinada pelo quadrado do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), em uma análise de regressão linear utilizando-se o programa Microsoft Excel® (2007).

Os gráficos obtidos nos ensaios de estimativa em fase oleosa, monitoramento em tanques de 20 L e na estimativa da contaminação em fase aquosa e oleosa com adição de biocidas e o desvio padrão das amostras foram calculados utilizando a função disponível no Microsoft Excel® (2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio para estimativa em fase aquosa

A análise da metodologia alternativa de laminocultivos foi realizada utilizando-se um método de preparação e estimativa prévia das concentrações de cada microrganismo, para comparação de um método padrão de Contagem em Placa por Espalhamento em superfície. As contagens de células viáveis, obtidas pelos laminocultivos, são realizadas a partir da comparação com o gabarito, disponível na embalagem do produto, para estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup>. Observou-se contagens comparáveis com a contagem de UFC.mL<sup>-1</sup> pela metodologia padrão de espalhamento em superfície de placa de Petri.

Os resultados para cada microrganismo avaliado nas duas metodologias (padrão e laminocultivo) estão apresentados em tabelas e figuras. Foram escolhidos 3 representantes de microrganismos (bactéria e fungo filamentoso e leveduriforme) considerados como deteriorogênicos de óleo diesel B e serão apresentados os resultados da estimativa da população microbiana em fase aquosa.

Observou-se que os resultados obtidos pelo método padrão de contagem em placa estão correlacionados com os de laminocultivos, levando-se em consideração a sensibilidade e limite de detecção do laminocultivo ( $10^2$

UFC.mL<sup>-1</sup> – 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>). Desta forma, todas as concentrações preparadas acima de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, pelo laminocultivo são detectadas como 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Na estimativa das concentrações da bactéria *Bacillus pumilus* observadas em Agar PCA no laminocultivo, em 48 horas de incubação a 35 °C foi possível observar a correlação com a técnica padrão de contagem em placa, segundo a Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentrações das soluções pelo gabarito da bula *versus* contagem da concentração em placa. *Bacillus pumilus*

| Concentração das soluções | Concentração pelo Gabarito UFC.mL <sup>-1</sup> (laminocultivos) | Contagem de UFC.mL <sup>-1</sup> das placas de Petri (Agar nutriente) |
|---------------------------|--|---|
| 10 <sup>9</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 1,9±0,5 x10 <sup>9</sup>  |
| 10 <sup>8</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 2,1±0,4 x10 <sup>8</sup>  |
| 10 <sup>7</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 5,4±0,5 x10 <sup>7</sup>  |
| 10 <sup>6</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 3,5±0,6 x10 <sup>6</sup>  |
| 10 <sup>5</sup>           | 10 <sup>5</sup>  | 4,1±0,1 x10 <sup>5</sup>  |
| 10 <sup>4</sup>           | 10 <sup>4</sup>  | 1,1±0,2 x10 <sup>4</sup>  |
| 10 <sup>3</sup>           | 10 <sup>3</sup>  | 2,2±0,3 x10 <sup>3</sup>  |
| 10 <sup>2</sup>           | 10 <sup>2</sup>  | 3,3±0,2 x10 <sup>2</sup>  |

A presença do indicador-redox (sais de tetrazólio) presente no meio de cultura do laminocultivo (Figura 3), para a estimativa de bactérias, permite que as colônias apareçam de cor vermelha, facilitando a visualização. Por esta razão, foi observado o aspecto avermelhado sobre toda a superfície do laminocultivo, na condição considerada de alta contaminação com 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Com uma concentração alta de bactérias, a superfície do meio de cultura colocado na placa, ficou recoberta por uma massa branca, impossibilitando a

contagem. Constatou-se na superfície do laminocultivo, que as colônias (pontos vermelhos) ficaram evidentes no caso da média contaminação. Na condição de baixa contaminação, o que era esperado, apenas algumas colônias cresceram afastadas, tanto na placa como na superfície do laminocultivo.

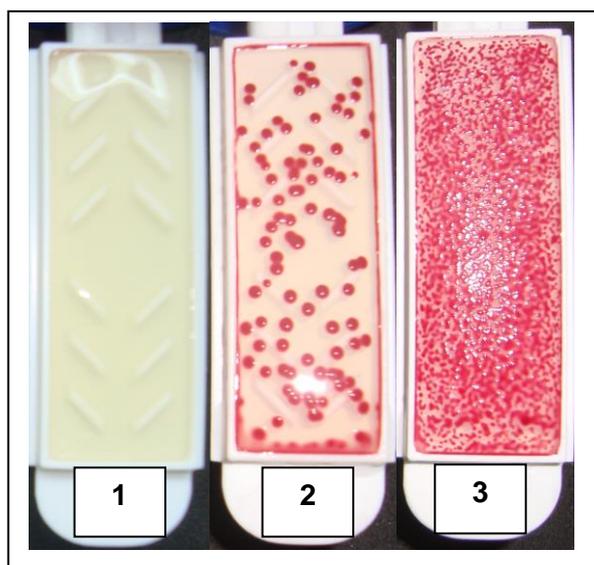


Figura 3. Crescimento da bactéria *Bacillus pumilus* no meio de cultivo PCA que contém o indicador redox TTC, do laminocultivo Nutrilab E. (1- PCA sem crescimento; 2- PCA  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>; 3- PCA  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

Da mesma maneira sob incubação a 28 °C, em 48 horas observou-se, primeiramente os resultados obtidos pelo microrganismo *Candida silvicola* no laminocultivo em meio PCA e Agar Ogye e a contagem em placa em Agar malte, como pode ser observado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Concentrações das soluções pelo gabarito da bula versus contagem da concentração em placa. *Candida silvicola*.

| Concentração das soluções | Concentração pelo Gabarito UFC.mL <sup>-1</sup> (laminocultivos) | Contagem de UFC.mL <sup>-1</sup> das placas de Petri (Agar malte) |
|---------------------------|--|---|
| $10^9$                    | $10^6$   | $1,3 \pm 0,5 \times 10^9$   |
| $10^8$                    | $10^6$   | $2,4 \pm 0,9 \times 10^8$   |

|        |        |                           |
|--------|--------|---------------------------|
| $10^7$ | $10^6$ | $1,2 \pm 0,4 \times 10^7$ |
| $10^6$ | $10^6$ | $2,3 \pm 0,1 \times 10^6$ |
| $10^5$ | $10^5$ | $2,2 \pm 0,4 \times 10^5$ |
| $10^4$ | $10^4$ | $1,2 \pm 0,3 \times 10^4$ |
| $10^3$ | $10^3$ | $1,5 \pm 0,2 \times 10^3$ |
| $10^2$ | $10^2$ | $3,6 \pm 0,2 \times 10^2$ |

Na condição máxima de detecção do laminocultivo de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi observado, que o aspecto visual da placa e do laminocultivo foi similar (Figura 4). A superfície do meio de cultura colocado na placa, assim como da superfície do laminocultivo estava recoberto pela levedura (aspecto branco do crescimento), sendo possível diferenciá-lo da concentração de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, já que nessa ainda era possível visualizar as colônias separadas, e não como uma camada única.

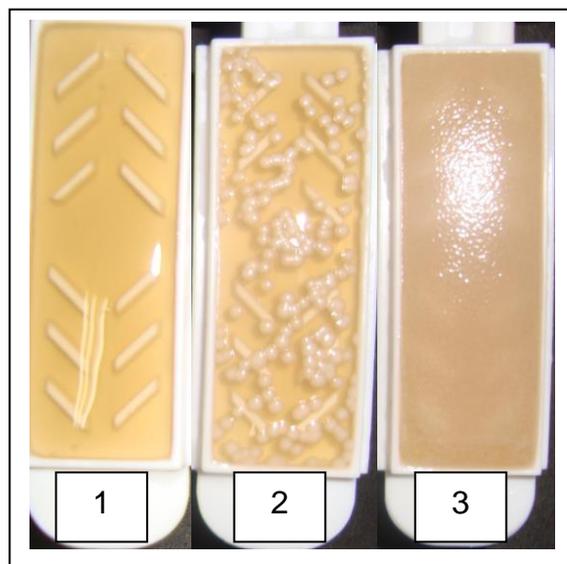


Figura 4. Crescimento da levedura *Candida silvicola* no meio de cultivo Agar Ogye, do laminocultivo Nutrilab F. (1- Agar Ogye sem crescimento; 2- Agar Ogye  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>; 3- Agar Ogye  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

Na Tabela 5, pode-se observar a correlação das concentrações estimadas em laminocultivos e por contagem em placa em 72 horas sob incubação a 28 °C para o fungo filamentososo *Paecilomyces variotii*.

**Tabela 5.** Concentrações das soluções pelo gabarito da bula *versus* contagem da concentração em placa por mL. *Paecilomyces variotii*.

| Concentração das soluções | Concentração pelo Gabarito UFC.mL <sup>-1</sup> (laminocultivos) | Contagem de UFC.mL <sup>-1</sup> das placas de Petri (Agar malte) |
|---------------------------|--|---|
| 10 <sup>8</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 2,1±0,4 x10 <sup>8</sup>  |
| 10 <sup>7</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 3,2±0,4 x10 <sup>7</sup>  |
| 10 <sup>6</sup>           | 10 <sup>6</sup>  | 2,4±0,5 x10 <sup>6</sup>  |
| 10 <sup>5</sup>           | 10 <sup>5</sup>  | 1,7±0,9 x10 <sup>5</sup>  |
| 10 <sup>4</sup>           | 10 <sup>4</sup>  | 6,6±0,6 x10 <sup>4</sup>  |
| 10 <sup>3</sup>           | 10 <sup>3</sup>  | 1,0±0,3 x10 <sup>3</sup>  |
| 10 <sup>2</sup>           | 10 <sup>2</sup>  | 1,1±0,3 x10 <sup>2</sup>  |
| 10 <sup>1</sup>           | 10 <sup>2</sup>  | 3,0±0,2 x10 <sup>1</sup>  |

O crescimento deste fungo é diferente do observado pela levedura. O fungo produz uma massa de hifas, com a coloração amarela escura e aspecto aveludado. Na condição de baixa contaminação, o que era esperado, apenas algumas colônias cresceram afastadas, tanto na placa como na superfície do laminocultivo. Foi possível visualizar que a contaminação pelo fungo recobriu toda a superfície no meio de cultura específico para seu crescimento, em concentrações acima de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 5). Porém, apesar de seu crescimento apresentar este desenvolvimento conseguiu-se diferenciar as colônias para uma contagem favorável nas concentrações menores a 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Durante a incubação do laminocultivo Nutrilab F, notou-se que o fungo *Paecilomyces variotii* pode crescer no meio PCA, mas é conveniente ressaltar que o meio de cultivo destinado para estimativa da concentração de UFC.mL<sup>-1</sup> de fungos é o Agar Ogye.



Figura 5. Crescimento do fungo filamentosso *Paecilomyces variotii* no meio de cultivo Agar Ogye, do laminocultivo Nutrilab F. (1- Agar Ogye sem crescimento; 2- Agar Ogye 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>; 3- Agar Ogye 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>).

Na comparação com o método padrão de contagem em placa, os laminocultivos apresentaram correspondência na estimativa de bactérias, fungos e leveduras. No entanto podem haver diferenças na detecção de determinados microrganismos para cada tipo de laminocultivo e também diferenças no limite de quantificação de microrganismos entre os laminocultivos disponíveis no mercado (Bailey & May, 1979, Vanderzwaag et al., 2009).

Anacleto et al. (2009), conseguiram observar correspondência na análise da contaminação microbiana por *Escherichia coli*, na urina de crianças internadas em ambulatório, entre o número de microrganismos que cresceram

no laminocultivo e o número de colônias cultivadas pelo método padrão de referência.

Pela visualização das placas e laminocultivos, correspondentes a inoculação em mesma concentração, observou-se a correlação das técnicas exceto para as concentrações das soluções de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> e em diante, que não apresentam diferenças que possam ser visualizadas no laminocultivo, devido a sua sensibilidade de detecção de até  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de acordo com o laboratório fabricante (Nutrilab, 2008).

A partir deste ensaio preliminar podemos observar algumas características referentes ao laminocultivo como, o crescimento de bactérias em meio PCA e/ou VRBA, o crescimento de leveduras em meio Agar Ogye e PCA e o crescimento de fungos em Agar Ogye com possibilidade de crescimento de algumas colônias em PCA, tempo e temperatura de incubação em estufa e confirmar o crescimento de microrganismos conhecidamente deteriorogênicos de óleo diesel e misturas com biodiesel nos laminocultivos utilizados neste ensaio.

## **5.2 Estimativa em fase oleosa**

### **5.2.1 Ensaio preliminar para estimativa em fase oleosa**

Nesta etapa de experimento o objetivo foi verificar a diferença que pode ser encontrada na estimativa da contaminação, caso a amostra de combustível contaminada não seja diluída.

Nas estimativas de contaminação microbiana realizadas e avaliadas durante 30 dias de experimento, notou-se uma falta de correspondência na comparação do crescimento obtido pelos kits

microbiológicos de laminocultivos. Esta diferença foi observada mais evidentemente quando as amostras não eram diluídas, sendo imersas diretamente na solução do frasco do experimento com a água de lastro com a contaminação da borra oleosa de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> nas amostras de combustíveis mistura B10 ou B100, obtendo-se um pequeno volume para inoculação.

Pôde ser observado neste ensaio que quando as amostras de combustível B10 e B100 eram diluídas em solução salina 0,085 g.L<sup>-1</sup> e quando era realizada a imersão dos laminocultivos nessa mistura de fase aquosa e fase oleosa, após agitação a estimativa de células viáveis dos microrganismos presentes na fase oleosa tinha um aumento na contagem quando comparadas às mesmas amostras sem a diluição.

Isso possivelmente porque, as microgotículas do combustível, com células de microrganismos, migrariam para a fase aquosa (White *et al*, 2011) e provavelmente estas células poderiam se aderir mais facilmente as faces dos laminocultivos, possibilitando o seu desenvolvimento.

Na Figura 6, pode se observar os resultados do monitoramento microbiológico da fase oleosa por 30 dias, com a amostra de combustível B10 diluída e não diluída. A comparação das médias demonstram que a relação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), é diferente para as médias obtidas pelas amostras diluídas e as amostras não diluídas. Os resultados observados no combustível B100 são comparáveis aos observados na mistura B10.

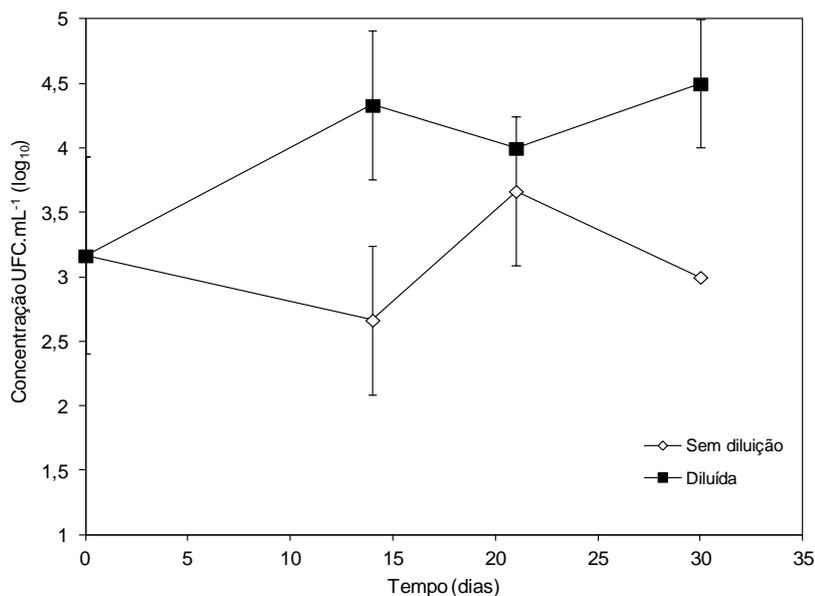


Figura 6. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> dos laminocultivos da amostra de combustível B10 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo PCA.

O fator tempo não apresentou uma relação significativa ( $p > 0,05$ ) com a estimativa da concentração de microrganismos nos meios de cultivo PCA e BDA, tanto para estimativa de microrganismos em mistura B10 como no B100. Isso significa que independente do tempo, o nível de contaminação microbiana variou pouco, na estimativa das populações de fungos e bactérias.

McComb (2009), relata que em um estudo realizado por Hendrick et al., (1963) que ao examinar espécies microbianas encontradas em combustível de aviação, as culturas puras se mantiveram viáveis por mais tempo do que as mantidas em culturas mistas. Sendo assim, provavelmente, o fato de ao longo do tempo não haver crescimento microbiano significativo, pode ser justificado pelo pequeno número de células viáveis e, ainda em crescimento, disponíveis no inóculo formado a partir da borra biológica. Além do mais a borra biológica já poderia manter uma comunidade microbiana estabilizada e, que ao ser

adicionada como inóculo nos frascos de experimento, não sofreu alterações de um crescimento microbiano ao longo do tempo de incubação de 30 dias.

Cerqueira et al. (2011), também observou em experimentos comparando a biodegradação com culturas puras ou mistas que o consórcio de bactérias testado demonstrou uma redução da população microbiana no início do período de incubação e que esta redução poderia estar relacionada ao impacto da borra biológica ao ser adicionada ao meio, o período de adaptação ou competição entre as espécies de microrganismos.

Na Figura 7 são apresentados os resultados da estimativa de células viáveis obtidas pelo laminocultivo que contém o meio específico para fungo, Agar Ogye. No crescimento de microrganismos em combustível B10 houve uma similaridade no crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, ao decorrer dos dias, onde as contagens de  $\text{UFC.mL}^{-1}$  permaneceram na mesma faixa de concentração, obtendo-se uma equivalência no número de fungos e bactérias presentes.

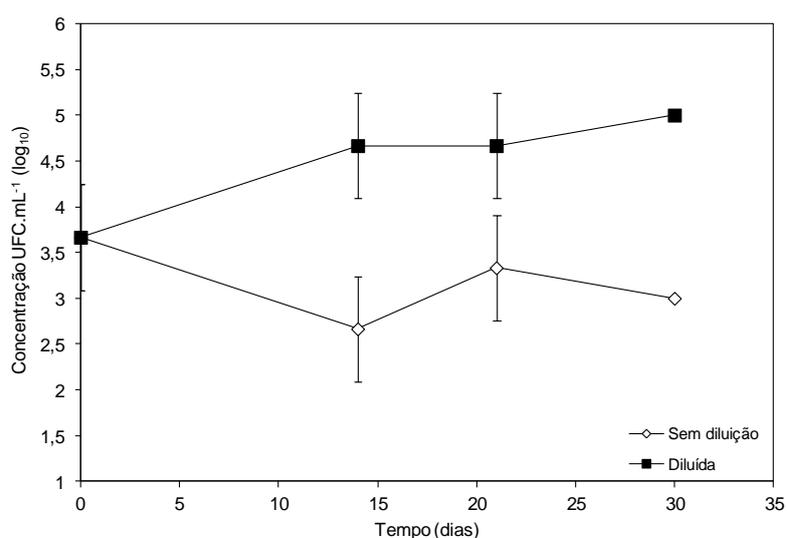


Figura 7. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  dos laminocultivos da amostra de combustível B10 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo Ágar Ogye.

Pode ser observado que as amostras diluídas em solução salina 0,85 g.L, variam mais do que 1 log na estimativa da contaminação em combustível B10 do que as amostras de laminocultivos inoculadas diretamente na amostra de combustível. A contaminação na fase oleosa por microrganismos foi significativa demonstrando uma maior estimativa das células viáveis aos 30 dias de experimento. Quando os laminocultivos foram imersos, sem diluição, foi observado um comportamento inverso na estimativa da contaminação microbiana demonstrando ao final dos 30 dias uma contaminação de aproximadamente  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Esta faixa de contaminação corresponde a uma contaminação ambiental e provavelmente não haveria um alerta ou tomada de ação no combustível com este aspecto (Hill & Hill, 2009).

Nas Figuras 8 e 9 os resultados apresentados são referentes a estimativa de microrganismos em fase oleosa B100, nos meios de cultivo PCA e Agar Ogye respectivamente. Na comparação das médias obtidas, pode-se observar que as amostras diluídas diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das amostras não diluídas.

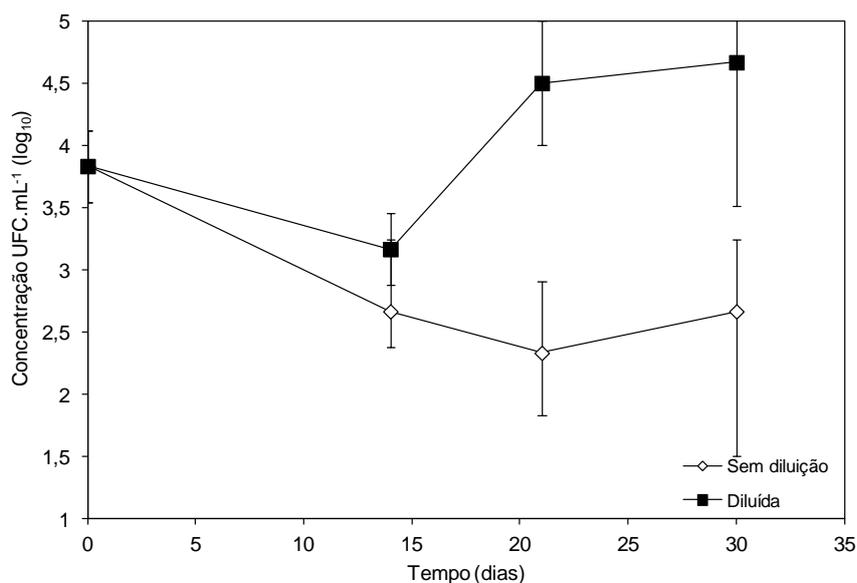


Figura 8. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> dos laminocultivos da amostra de combustível B100 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo PCA.

Não houve diferença na estimativa entre amostras de B100 e da mistura B10, em amostras diluídas, onde a estimativa ficou próxima aos  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> no final dos 30 dias de ensaio. Pode ser observado que o combustível B100 não foi favorecido por sua característica higroscópica na estimativa da contaminação sem a devida diluição, fornecendo contagens na faixa de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, assim como a mistura B10.

Segundo Hill et al. (1997) a metodologia tradicional de contagem de células viáveis para quantificação de microrganismos em amostras aquosas envolve a incubação e a leitura do número de microrganismos em UFC. Este método pode ser realizado por dois procedimentos, a técnica de plaqueamento com a inoculação da amostra em meio de cultivo antes desse se solidificar, ou o espalhamento em superfície de meio cultivo sólido da amostra testada.

Nenhum destes métodos é adequado para estimativa de microrganismos em amostras não-aquosas porque, segundo o mesmo autor, devido a característica inerente aos combustíveis, estes não se dissolvem adequadamente em uma fase aquosa, sendo necessária a filtração da amostra de combustível ou a formação de uma emulsão óleo-água para que o teste de análise microbiológica seja realizado.

Com este tipo de amostra não-aquosa, é realizado o procedimento de filtração em membrana onde esta depois é inoculada em meio de cultivo sólido. Um método alternativo é a emulsificação da amostra não-aquosa antes do procedimento convencional de contagem em placa.

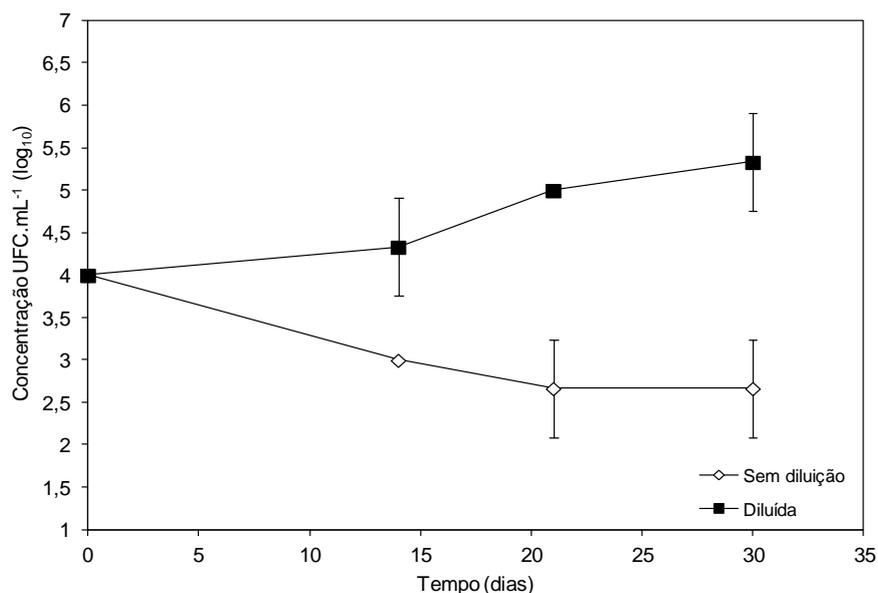


Figura 9. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  dos laminocultivos da amostra de combustível B100 com e sem diluição em solução salina 0,85% no meio de cultivo Ágar Ogye.

Rodríguez-Rodríguez et al. (2010) realizou a investigação da contaminação por fungos filamentosos e leveduras em amostras de combustível provenientes de postos de distribuição, na Costa Rica, uma região

tropical, devido aos poucos relatos sobre a microbiota encontrada nestas regiões. A enumeração dos fungos filamentosos e leveduras foi realizada seguindo a metodologia padrão ASTM D6974-04, similar a IP 385/99, onde cada amostra de combustível foi filtrada em membrana de nitrocelulose antes de ser inoculada em meio de cultura BDA.

Durante o monitoramento microbiológico de um grande número de estabelecimentos distribuidores de combustível diesel, a fim de se garantir a qualidade do produto estocado, a prática de filtração da amostra de combustível demonstra-se dispendiosa e necessita de um técnico responsável com conhecimentos em laboratório de microbiologia para ser realizada. A metodologia de laminocultivos é uma técnica mais rápida e simples de ser realizada, mesmo por uma pessoa sem formação em laboratório de microbiologia, sendo possível adaptá-la para o monitoramento *in situ* a partir da diluição da amostra de combustível, possibilitando a recuperação das células de microrganismos da fase oleosa.

Cooney et al. (1968), realizaram experimentos para determinar a sobrevivência e o crescimento representativo de microrganismos, isolados de sistema de combustíveis, quando eram colocados em solução para emulsificação com combustível de aviação JP4, como única fonte de carbono. Os autores compararam os resultados observados com um sistema similar contendo combustível de aviação JP-4 não emulsificado. Foi possível observar neste estudo que a contagem de células viáveis aumentou 4 logs durante o período de incubação, no sistema de combustível emulsionado e que o crescimento de células para contagem em placa foi satisfatório quando as amostras eram retiradas da emulsão do combustível.

Embora, na solução salina utilizada não tenha sido adicionado nenhum surfactante, foi possível obter a estimativa da contaminação na condição testada. Desta maneira foi possível realizar a estimativa pelos laminocultivos de modo fosse possível realizar a comparação com o gabarito e assim obter a informação da contaminação em UFC.mL<sup>-1</sup>. Este resultado pode estar relacionado com a presença da solução salina/óleo em contato com a superfície do laminocultivo, devido a uma maior disponibilidade das gotículas de óleo com microrganismos.

Com os resultados obtidos nesta etapa de experimentos, espera-se adequar a avaliação de soluções oleosas diluídas apropriadamente, para a estimativa de contaminação com os laminocultivos e, principalmente, poder adaptar da melhor forma possível esta análise para avaliação da contaminação microbiológica de combustíveis *in situ*.

### **5.2.2 Surfactantes para diluição e estimativa da contaminação na fase combustível**

A partir de ensaio realizado com uma concentração estimada de microrganismos em mistura de combustível diesel e biodiesel, onde os laminocultivos foram diretamente imersos no óleo notou-se uma diferença de concentração do crescimento observado nos laminocultivos e a concentração previamente estabelecida.

Após uma revisão de literatura pode-se retomar algumas soluções descritas para formação de emulsões óleo/água e adaptá-las para a avaliação da contaminação microbiológica em amostras de combustível diesel e biodiesel

em mistura B10. A principal referência encontrada foi a normativa AFNOR M 07-070/92 - *Combustíveis para motores diesel e instalações de aquecimento doméstico – Pesquisa de contaminação por microrganismos por meio de ensaios em meio de cultivo em ágar*, a qual descreve a utilização do Tween 80® na concentração de 0,1 % para diluição de amostras de combustíveis e estimativa das concentrações de microrganismos em laminocultivos (Hill, 1998).

Na comparação das médias pelo teste de Tukey, em nível de significância de 5 %, foi observado que a resposta da análise do laminocultivo imerso diretamente na amostra de combustível difere de todas as soluções avaliadas. Quando a amostra de combustível é inoculada diretamente em placa ou quando o laminocultivo é imerso diretamente em uma amostra de combustível, sem a apropriada diluição, a concentração de microrganismos na fase oleosa é subestimada. Desta forma, sua diluição é necessária para garantir a correta interpretação da contaminação existente no combustível (Figuras 10 a e 10b).

Quando as soluções diluentes foram testadas para estimativa na metodologia padrão de contagem em placa, não houve diferença estatisticamente significativa entre as soluções, o que demonstra a aplicação satisfatória dessas soluções para estimativa de células viáveis pelo método de referência de contagem em placa, porém um efeito inverso é observado quando as soluções são utilizadas para estimativa de células viáveis pelo método alternativo de laminocultivos. Nota-se que na metodologia padrão a solução de goma xantana 0,1 % apresentou um desvio padrão diferenciado de  $0,57 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , em relação às outras soluções (Figuras 10a e 10b).

Pelo método padrão de contagem em placas e na estimativa dos laminocultivos obteve-se uma boa correlação para a concentração de microrganismos estimada em  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, na solução salina 0,85 % e no surfactante Tween 80 0,01 %.

A solução salina obteve uma boa correlação do Método de Contagem em Placa com os laminocultivos, devido ao fato dos microrganismos presentes em gotículas de água dispersas na fase oleosa, migrarem para a solução aquosa no momento da diluição. White et al. (2011), na avaliação microbiológica de amostras de combustíveis de tanques de armazenamento, sem a presença de água durante a estocagem, realizou a diluição da amostra de combustível em solução salina basal estéril e após a agitação e homogeneização das duas fases (aquosa e oleosa) foi retirado um volume para a coleta de microrganismos e posterior cultivo.

Na análise de variância entre as soluções testadas, para a estimativa no meio de cultivo PCA dos laminocultivos (Figura 10a), foi observada diferença significativa para cada tipo de diluente testado ( $p < 0,05$ ). Na comparação das médias por Tukey, em nível de significância de 5 %, os diluentes Goma xantana 0,1 % e Tween 80 0,01 % não demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle de Solução salina 0,85 % na estimativa pelos laminocultivos.

Na comparação das médias por Tukey em nível de significância de 5 %, das soluções de surfactantes Tween 20 0,01 %, Tween 80 0,1 %, Triton X-100 0,01 % e SDS 0,01 % foi observada diferença estatística significativa quando comparada a solução controle de salina a 0,85 %, mas entre si as soluções não tiveram diferença estatística significativa.

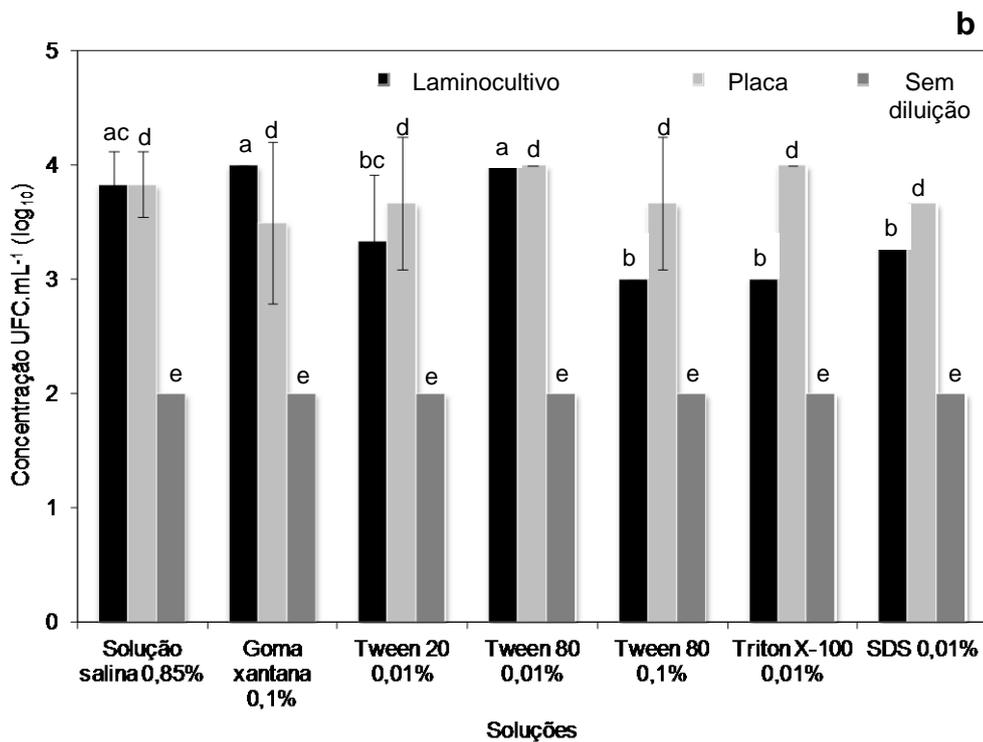
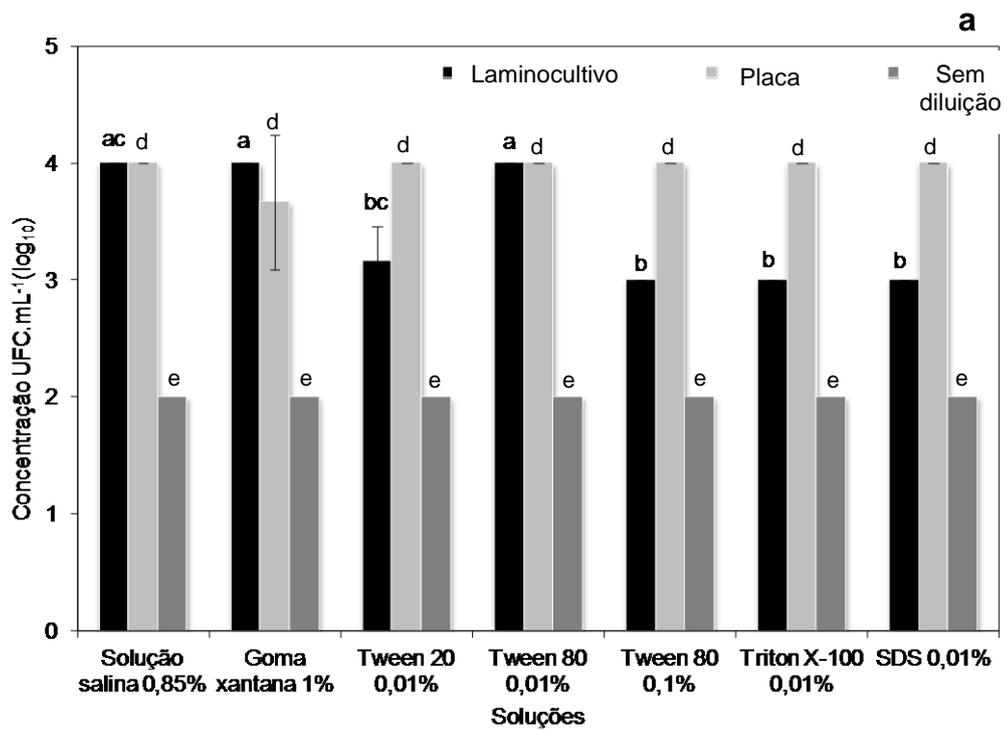


Figura 10. **a.** Estimativa de bactérias e leveduras em óleo B10 em meio PCA. **b.** Estimativa de fungos em óleo B10 em meio Sabouraud e Agar Ogye. Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Van Hamme et al. (2006), destacam que o impacto de surfactantes químicos na atividade e comportamento microbiano podem depender de vários

fatores como a estrutura celular, capacidade de biodegradação ou de efluxo do microrganismo, concentração do surfactante e outras condições ambientais. Os surfactantes aniônicos (como o SDS) são menos tóxicos e mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas e os não-iônicos (como Tweens e Triton X-100) são geralmente não tóxicos.

Na Figura 10b, onde são apresentados os resultados para o meio de cultivo específico para contagem de esporos de fungos, observando-se o desvio padrão, a solução salina não demonstrou resultado tão satisfatório quando comparada a solução de goma xantana 0,1 % para estimativa pelos laminocultivos.

Estatisticamente não houve diferença da diluição da amostra de combustível em Solução salina 0,85 % com os outros diluentes. A diferença significativa observada ( $p > 0,05$ ), na comparação das médias pelo teste de Tukey, foi da solução de Goma xantana 0,1 % com as soluções de surfactantes Tween 80 0,1 % e Triton X-100 0,01 % já que pela estimativa da contaminação pelos laminocultivos os dois últimos citados foram os que mais se distanciaram do valor real inoculado na amostra de combustível.

A avaliação da estimativa de fungos (levedura e fungo filamentoso), pela metodologia padrão, apresentou contagens com um desvio padrão de 0,28 a 0,70 UFC.mL<sup>-1</sup>. Como observado na estimativa da concentração de microrganismos no meio de cultivo PCA, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), das soluções utilizadas para estimava de fungos filamentosos e leveduras, pelo método de referência de contagem de UFC.mL<sup>-1</sup> em placa.

O Tween 80 é utilizado como um tensoativo e empregado para obter-se emulsões óleo/água, sendo sua concentração em 0,01 % determinante para dispersão das células microbianas na solução, diferentemente do demonstrado na AFNOR M 07-070/92, onde a concentração do Tween 80 sugerida é de 0,1 % provavelmente exerce alguma ação sobre as células microbianas inibindo o seu crescimento na concentração estimada em  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Conforme relatado por Damasceno (2011) na avaliação de diluentes para preparo de inoculantes líquidos, de culturas bacterianas, o Tween 80 pode inibir o crescimento em meio de cultura de bactérias e o procedimento de agitação do diluente, com a amostra em frasco, pode prejudicar a homogeneização do surfactante e interferir na ação do Tween nas células.

Por outro lado, baseado em artigos anteriores, Zhang & Zhu, (2012), o Tween é descrito pela sua capacidade de promover a biodisponibilidade e biodegradação de compostos orgânicos hidrofóbicos (HOCs, sigla em inglês), incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), alcanos, tricloroetileno (TCE) e bifenóis policlorados (PCS), através da promoção da solubilização dos HOCs. As interações envolvidas no processo de solubilização de HOCs incluem a capacidade de adsorção da superfície da célula microbiana e transmembrana; e acúmulo intracelular de HOCs.

No ensaio de Hill (1998), o Tween 80 demonstrou resultados mais favoráveis com a diluição do combustível no surfactante, do que com a normativa IP 385/99 na recuperação de células microbianas para estimativa da contaminação em laminocultivos. Provavelmente, a capacidade deste

surfactante em separar e dispersar agregados microbianos, principalmente esporos fúngicos é mais efetiva.

Em ensaios de biorremediação de áreas contaminadas com petróleo, onde os surfactantes podem ser utilizados para aumentar a biodisponibilidade das partículas contaminantes para os microrganismos poderem realizar o processo de biodegradação (Meyer, 2011; Zhang & Zhu, 2012). Foi possível observar que no caso do Tween 80, esse teve influência na remoção de pireno, porém notou-se que com o aumento da concentração de Tween 80, a remoção do mesmo tendia a aumentar inicialmente e depois decrescer e, a maior concentração de Tween 80 0,1 %, inibiu a remoção de pireno em 4,6 %, em 18 dias. A partir desta observação os autores sugerem que uma concentração média de Tween 80 deve ser determinada para promover a remoção do contaminante pireno por *Klebsiella oxytoca* PYR-1 (Zhang & Zhu, 2012).

Por ser um agente tixotrópico e emulsificante, a goma xantana foi selecionada para compor o meio de cultivo desenvolvido por Hill (1998) para análise de amostras de combustíveis sob condições de armazenamento. A recomendação da quantidade de goma xantana para fabricação do meio de cultivo específico para análise de combustível é de 0,2 % em combinação com Agar bacteriológico e Iota-Carragena<sup>2</sup>, porém como esta concentração não forma uma solução aquosa seria dificultada a adição e homogeneização da

---

<sup>2</sup> A carragena é um hidrocolóide extraído de algas marinhas vermelhas das espécies *Gigartina*, *Hypnea*, *Euclima*, *Chondrus* e *Iridaea*. A carragena possui a habilidade exclusiva de formar uma ampla variedade de texturas de gel a temperatura ambiente. Algas de diferentes espécies e fontes produzem carragenas de diferentes tipos: kappa, iota e lambda.

amostra de combustível. Desta forma, optou-se pelo preparo da solução de Goma xantana com 0,1 % de concentração.

Os polissacarídeos microbianos, gomas vegetais e proteínas animais, incluindo a goma xantana, goma guar, concentrado de proteína de soro do leite e proteína de soro de leite isolada, têm demonstrado propriedades emulsificantes satisfatórias (Prasanna, 2012).

A goma xantana é um biopolímero sintetizado *Xanthomonas sp.* O comportamento reológico<sup>3</sup> da sua solução aquosa na natureza é pseudoplástico e forma “géis fracos”. Devido a estas propriedades, a goma xantana é utilizada como espessante, agente e estabilizador de emulsões o que evita a sedimentação das suspensões prejudiciais na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos (Marudova-Zsivanovits, 2007). A goma xantana é comumente adicionada em emulsões óleo-água para aumentar a viscosidade da fase contínua e retardar a formação de “natas” (Krstonošić et al., 2009).

A goma xantana demonstrou bons resultados para avaliação da contaminação microbiana em amostra de combustível B10 com o método padrão de contagem em placa. Na estimativa da contaminação com os laminocultivos não foram observadas contagens satisfatórias devido a emulsão formada não possibilitar uma aderência positiva na superfície do laminocultivo.

Chrzanowski et al. (2005), observou em ensaios com Triton X-100 e Tween 20, que a concentração dos surfactantes sintéticos influenciam o grau de biodegradação de hidrocarbonetos em ensaio com a levedura *Candida maltosa* EH 15. As concentrações ótimas de surfactantes Tween 20 e Triton X-

---

<sup>3</sup> Reo (=fluxo); lógico (=estudo). Estudo das mudanças na forma e no fluxo de um material envolvendo a fricção do fluido, para descrever o fluxo de líquidos e a deformação de sólidos. Ramo da física que estuda a viscosidade, plasticidade e elasticidade.

100 foram estabelecidas na faixa de 0,007 % a 0,03 %, destacando o Triton X-100 como um agente permeabilizante de células de leveduras e com propriedades de romper células microbianas. Foi destacado neste ensaio a correlação de surfactantes sintéticos não-iônicos e o aumento das propriedades hidrofílicas do sistema surfactante-hidrocarbonetos.

Em estudo realizado com Triton X-100 (Chen et al., 2000), em processo de biorremediação, foi observado que o crescimento de microrganismos durante o processo de biodegradação dependia da concentração de surfactante e que esse poderia inibir o crescimento de microrganismos mesmo em uma pequena quantidade como de 160 mg.L<sup>-1</sup>. Como pode ser observado nas Figuras 12a e 12b, o Triton X-100, apesar de ser utilizado em procedimento microbiológico como um surfactante para contagem de células viáveis em placa na metodologia padrão. No entanto pelo método de laminocultivos, esse surfactante não demonstrou a contaminação de microrganismos estimada.

Segundo Mukherjee (2012), foi observada a característica biocida do surfactante Triton X-100 e sua propriedade hidrofílica no sistema, que podem interferir na dispersão das células de microrganismos presentes nas gotículas de óleo B10.

Nas Figuras 10a e 10b, a estimativa de microrganismos em fase óleo, com o surfactante SDS utilizado na concentração de 0,01 %, nota-se que no método padrão em placa com meio de cultivo PCA, foi possível realizar a contagem na concentração de 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Na metodologia dos laminocultivos, no entanto com esta concentração não foi possível estimar a contaminação de microrganismos. Em meio específico para a detecção do crescimento de fungos, o surfactante SDS não permitiu a dispersão e

consequente o crescimento de fungos, nem pelo método padrão ou pelo método alternativo de laminocultivo. Provavelmente esse surfactante possa ter alguma interação negativa com os esporos do fungo testado, não promovendo a dispersão e germinação do esporo do *Paecilomyces variotii*.

Margesin & Schinner (1999), avaliaram o efeito de diferentes concentrações do surfactante Sulfato Dodecil de Sódio (SDS) na biorremediação de óleo diesel e constataram que quanto menor a concentração de SDS (50-100 mg.L<sup>-1</sup>) a biodegradação foi favorecida e, se a concentração de SDS fosse elevada (500-1000 mg.L<sup>-1</sup>), inibiria o processo de biodegradação por parte dos microrganismos.

Conforme experimento realizado por Sun et al. (2008) com *Flavobacterium sp.* Q14 e *Bacillus sp.* DQ02 na biodegradação de óleo diesel, foi verificado que apesar de o surfactante SDS apresentar comportamento similar ao surfactante Triton X-100 no impacto do crescimento microbiano, foi notável sua maior capacidade de inibição do crescimento microbiano mesmo com concentrações menores (0,05 %) do que o Triton X-100.

Conforme observado com estes resultados, há diferença significativa na utilização de surfactantes para a estimativa da contaminação microbiana em amostras de óleo. Esta diferença também é observada quando se utiliza o método de contagem padrão ou o alternativo de laminocultivos, sendo que para alguns surfactantes químicos não houve diferença para realização da contagem em placa, como a solução salina.

Como melhor alternativa ao método de laminocultivos foi observado a utilização de solução salina 0,85 % ou, preferencialmente, Tween 80 0,01 %

que facilitam a utilização deste método para avaliação da contaminação microbiana em amostras de combustível devido a suas características que garantem uma amostra adequada para análise microbiológica.

### **5.3 Determinação do volume da amostra**

A avaliação do volume de amostra, da mistura de combustível B10, para estimativa da contaminação microbiana em laminocultivos e por contagem em placa foi realizada a fim de se obter o volume adequado para avaliação microbiológica de amostras de combustíveis.

De acordo com a literatura podem ser observados diferentes volumes de amostra recomendados, de acordo com cada metodologia descrita. Foram encontrados/observados 6 diferentes volumes de amostra de combustível. O volume de 0,1 mL é recomendado por Hill (1998) e Hill et al. (1997) para avaliação no kit comercial chamado MicrobMonitor®. O volume de 5 mL é adequado para avaliação por laminocultivos por possibilitar a imersão completa deste, em frascos de poliestireno estéreis com capacidade de 50 mL, quando a amostra de 5 mL de combustível é diluída em surfactante para avaliação microbiológica.

Simultaneamente também foram avaliados os volumes de 50 mL e 100 mL de amostras de combustível. Estes volumes são recomendados pela IP 385/99 na filtração da amostra para avaliação microbiológica.

Os volumes de 1 mL e 25 mL foram estipulados como intermediários entre os volumes recomendados pela literatura.

Como pode ser observado na Figura 11a, na comparação das médias obtidas pela estimativa em laminocultivos no meio de cultivo PCA de diferentes volumes de amostra de combustível, na análise de variância não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), este fato demonstra que na contagem de UFC.mL<sup>-1</sup>, das amostras avaliadas com o laminocultivo, não houve influência do volume de amostra na estimativa de contaminação microbiológica, porém observou-se um desvio padrão maior do que quando comparado ao volume utilizado para contagem em placa.

Diferentemente, na comparação das médias obtidas pela estimativa de células viáveis de microrganismos pela metodologia de referência por contagem em placa no meio de cultivo PCA, por Tukey em nível de significância de 5 %, pode ser observado que as amostras de 1 mL, 5 mL, 25 mL, 50 mL e 100 mL, são iguais entre si e não apresentaram diferença estatística significativa na estimativa da concentração de microrganismos estipulada em 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. O volume de 0,1 mL é estatisticamente similar ao volume de 1 mL na estimativa da contaminação de microrganismos, porém diferentes dos demais volumes de amostra avaliados.

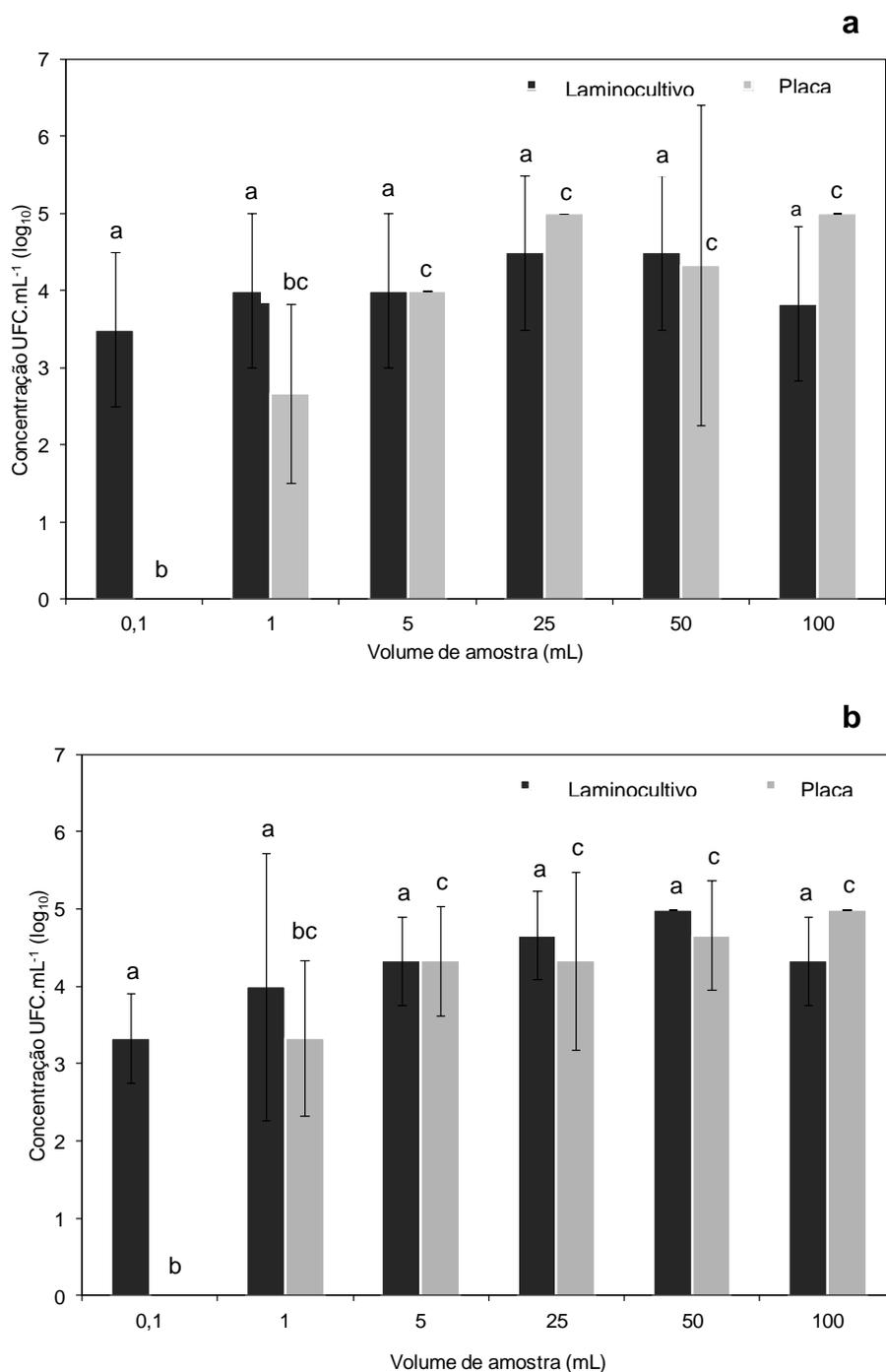


Figura 11. **a.** Ensaio para determinação do volume de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos e IP 385/99 em meio de cultivo PCA. **b.** Ensaio de avaliação de volume de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos, em meio de cultivo Agar Ogye e IP 385/99 em meio de cultivo BDA. Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A avaliação do crescimento de fungos nos meios de cultivo Agar Ogye (laminocultivo) e BDA (placa), como pode ser observada na Figura 11b,

apresentou comportamento similar ao do meio de cultivo PCA. Os resultados de crescimento nos laminocultivos, não demonstraram diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ) nos diferentes volumes avaliados para a estimativa da contaminação de microrganismos.

Na estimativa da contaminação por contagem de células viáveis em placa, nota-se que houve diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) dos diferentes volumes analisados. A principal diferença significativa foi a do volume de 0,1 mL onde, na comparação das médias por Tukey, no nível de significância de 5 %, o volume de 0,1 mL difere dos demais volumes avaliados, não sendo possível ser realizada a contagem de UFC.mL<sup>-1</sup> em placa (Figuras 11a e 11b). Os volumes de 1 mL, 5 mL, 25 mL, 50 mL e 100 mL são iguais entre si e diferentes da média observada com o volume de 0,1 mL. Observou-se também que o volume de 1 mL não apresentou diferença estatística quando comparado ao volume de 0,1 mL., considerando-se também não adequado para estimativa da contaminação (Anexo 9.3.3 a).

Os gráficos obtidos com a estimativa da concentração de microrganismos em diferentes volumes de amostra de B10, demonstram que o volume de 5 mL de amostra se correlaciona adequadamente entre os dois métodos microbiológicos (metodologia padrão IP 385/99 e laminocultivos) e demonstram a mesma estimativa de contaminação. Porém a estimativa é de aproximadamente 1 log de diferença em relação ao volume utilizado na metodologia padrão de IP 385/99, que sugere de 50 ou 100 mL de amostra.

Na literatura não estão disponíveis informações ou estudos sobre o volume de amostra representativa para avaliação microbiológica de combustíveis durante o seu armazenamento. De acordo com os resultados

observados, pode se destacar a grande variação do desvio padrão na estimativa da contagem tanto pelo método padrão da IP 385/99 de contagem em placa como o procedimento microbiológico alternativo de laminocultivos, apesar de o ensaio ter sido realizado em triplicata não houve diferença estatística significativa observada na estimativa da contaminação microbiana.

Quanto à amostragem do combustível, os autores Hill (2003) e Gammon (2009), destacam principalmente a distribuição heterogênea e o estado contínuo de mudança dos microrganismos no sistema de armazenagem, sendo necessário um cuidado para a retirada da amostra de combustível em local apropriado, já que normalmente, esporos de fungos ficam dispersos na fase oleosa e bactérias, leveduras e até biomassa formada por fungos pode ser encontrada mais para o fundo do tanque, próximo da fase aquosa, quando esta existir.

Segundo Hill (2003) a amostra de combustível pode sofrer variações na estimativa de células viáveis se houverem perturbações física no tanque ou no sistema de estocagem, particularmente se a água ou a interface é atingida, causando uma maior dispersão das células dos microrganismos na fase oleosa. Por exemplo, operações de reabastecimento que podem causar turbulência na interface e dispersar os microrganismos por todo o tanque de armazenamento. Outra questão levantada por Gammon (2009), é que o volume de amostra de combustível coletada irá depender do tipo de teste microbiológico a ser utilizado para a avaliação da contaminação, pois cada teste exige uma amostragem específica.

No ensaio para determinação do volume de amostra de combustível representativa para avaliação microbiológica, foi observada uma grande variação no desvio padrão das amostras. Apesar de o ensaio ter sido realizado

em triplicata e com um pequeno volume de amostra sugere-se uma repetição com um número maior de réplicas para a adequada seleção do melhor volume e metodologia a ser aplicada para o monitoramento microbiológico de combustíveis.

#### **5.4 Validação de laminocultivos na mistura B10**

Em um primeiro momento a fase de validação foi realizada somente com a fase oleosa, com a mistura de combustível B10. Com base nos resultados obtidos dos experimentos anteriores, (surfactantes e volume de amostra) foi utilizado o volume de 5 ml de amostra de mistura B10, adequado para imersão dos laminocultivos e o surfactante Tween 80 0,01 %.

Na validação da amostra de mistura B10 com a levedura *Candida silvicola*, foram avaliados parâmetros de exatidão, precisão, especificidade, linearidade, limite de detecção e o limite de quantificação do método de laminocultivos frente a metodologia de referência IP 385/99 na estimativa de células viáveis.

A exatidão do método alternativo de laminocultivos foi obtida pela análise de variância (ANOVA) calculada juntamente com a exatidão do método de referência. A partir da análise de cada concentração, verificou-se que houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação da estimativa do microrganismo *Candida silvicola*, pela metodologia alternativa em relação à metodologia de referência.

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação, sendo o desvio de padrão de cada amostra em cada concentração analisada, conforme pode ser observado na Tabela 6. Os laminocultivos possuem maior exatidão e

precisão estatística quando observados os valores de estimativa entre  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, onde os valores de coeficiente de variação (RSD) situam-se no limite aceitável de até 15 % (USP, 2010).

Ainda na Tabela 6, observa-se que a variação da estimativa pelo método alternativo de laminocultivos, tende a ser negativa, o que significa que o método alternativo fornece estimativas inferiores das observadas pelo método de referência (Anexo 9.2.5).

**Tabela 6.** Coeficiente de variação do método alternativo de laminocultivos.

| Concentrações estimadas UFC.mL <sup>-1</sup><br>(Log <sub>10</sub> ) | Laminocultivo<br>RSD % |
|--|------------------------|
| 7  | -13,5                  |
| 6  | -4,2                   |
| 5  | -8,0                   |
| 4  | -5,1                   |
| 3  | -4,5                   |
| 2  | -23,5                  |

Conforme observado na Tabela 6, o limite de detecção do método alternativo de laminocultivos foi de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, porém este valor de contagem de UFC.mL<sup>-1</sup> não permaneceu dentro do limite máximo de 15 % do coeficiente de variação estabelecido conforme a Farmacopéia Americana (USP, 2010), não sendo considerado um valor determinado com precisão. O limite de quantificação, contagem de UFC. mL<sup>-1</sup> realizada com precisão, foi observada para a contagem a partir de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> até  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

A linearidade do método alternativo de laminocultivos apresentou resultado proporcional a concentração de microrganismos presente na amostra, dentro do alcance do método nas concentrações entre  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Na Figura 12, os dados obtidos podem ser observados frente

a metodologia de referência e sua linearidade, obtendo dados igualmente proporcionais e em conformidade com a definição de linearidade.

Ressalta-se que as respostas da linearidade obtidas da concentração  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> do método alternativo não estão relacionados no gráfico devido a sua diferença significativa ( $p < 0,05$ ) observada pelo teste em ANOVA da regressão, para a comparação com a metodologia de referência, já que, apesar de apresentarem uma regressão linear com o método de referência, quando estas concentrações ( $10^2$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) foram avaliadas pelos laminocultivos apresentaram um amplo desvio padrão, não sendo mais consideradas lineares.

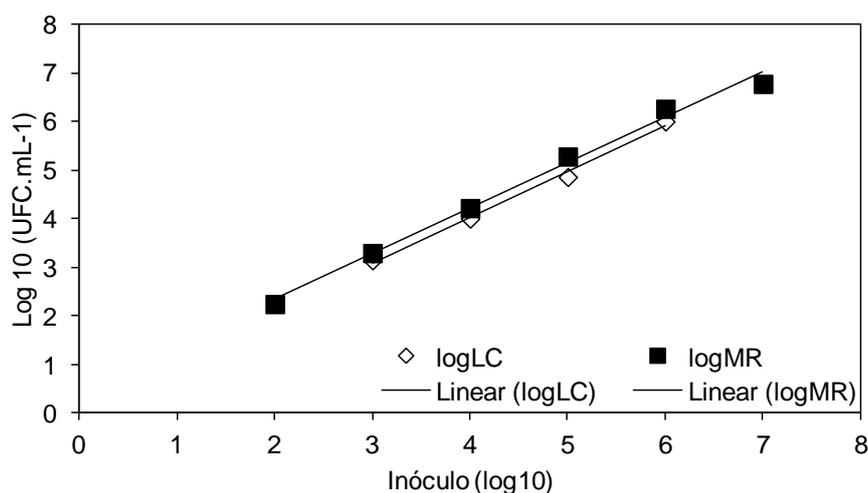


Figura 12. Linearidade do método alternativo de laminocultivos frente ao método de referência IP 385/99.  
Log LC (LC=Laminocultivo). Log MR (MR=Metodologia de referência).

Observando-se que para a validação de um método microbiológico alternativo que o quadrado do valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) não deve ser menor do que 0,95 (USP, 2010) e que quanto mais próximo do valor de 1,0 o coeficiente de correlação, menos dispersos estão os pontos experimentais obtidos, menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (ANVISA, 2003). Observando-se a Figura 13, para se obter um  $r^2=0,99$  é

necessária a desconsideração das concentrações de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, que apesar de serem detectadas pelo método alternativo não se correlacionam com as mesmas concentrações observadas na metodologia de referência IP 385/99.

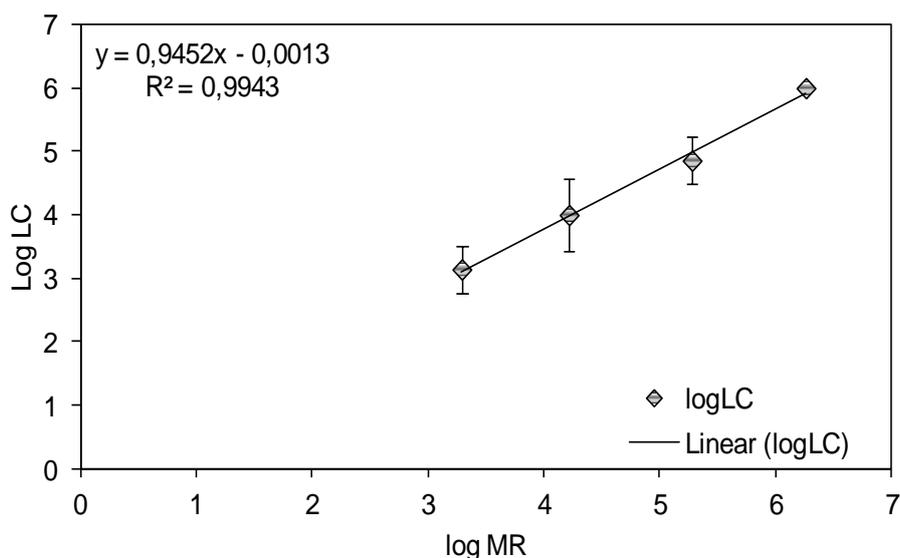


Figura 13. Linearidade do método alternativo de laminocultivo. Log LC (LC=Laminocultivo). Log MR (MR=Metodologia de referência).

Sendo a linearidade a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito (Valderrama, 2009), a análise microbiológica de amostras de combustíveis com laminocultivos podem fornecer informações seguras em relação a contaminação de microrganismos em uma faixa aceitável, dentro do que pode ser observado à campo.

A validação de um método microbiológico, usualmente é realizada sob condições ótimas de laboratório e não sob condições de práticas diárias. Isto pode afetar a validade das características externas de testes de kits microbiológicos (Winkens et al., 2003). Porém dados coletados em laboratório podem não ser úteis em práticas gerais diárias. Muitos estudos concluíram que

a validade de alguns testes foram menores quando a leitura dos laminocultivos eram feitas por enfermeiras ou invés de técnicos de laboratório (Winkens et al., 2003).

A partir da observação dos dados obtidos (precisão, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade) para a validação do método alternativo frente á metodologia de referência, com a contaminação da levedura *Candida silvicola* em mistura B10, pode se considerar até este ponto que, os laminocultivos apresentaram uma boa metodologia para ser aplicada para estimativa da contaminação *in situ*. É um método mais simples por isso seu coeficiente de variação (RSD) é menor, porém dá ordem de grandeza da possível contaminação, sendo esta diferença aceitável, já que possibilita uma tomada de ação para controle da contaminação mais fácil e rápido.

### **5.5 Avaliações de laminocultivos para a estimativa da contaminação microbiana em fase aquosa e fase oleosa B10 com adição de biocida**

Com a finalidade de se avaliar o comportamento dos laminocultivos, durante o monitoramento microbiológico de amostras de combustível com e sem a presença de aditivos, foi realizado este experimento em microcosmos. Simulando uma condição de presença de água durante a estocagem da mistura B10, foram avaliadas condições onde esse combustível não foi tratado com aditivos ou recebia os aditivos MBO-50 e MBO-100 nas concentrações de 500 ppm e 1000 ppm, para o controle da população microbiana de bactérias, leveduras e fungos.

Foram observados e monitorados os cenários de contaminação já presente no combustível recebido e pela inoculação de uma borra biológica. O monitoramento foi realizado pela metodologia de referência de contagem células viáveis em placa em superfície de meio de cultivo comparando-se como o método de monitoramento alternativo de laminocultivos. As amostras foram coletadas da fase aquosa e da fase oleosa. As amostras da fase oleosa foram diluídas em Tween 80 0,01 % com 5 mL de volume de amostra.

No monitoramento da contaminação na fase aquosa pela metodologia padrão de contagem, em placa de PCA, foi possível observar que a condição com ou sem inóculo apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) com todos os tratamentos avaliados. Nos laminocultivos, considerando-se o seu limite de detecção de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> até  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, o comportamento no meio de cultivo PCA foi diferente, pois a condição do combustível, se recebido ou contaminado com inóculo, não apresentou diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) na estimativa da contaminação durante os 60 dias de experimento, na análise de variância. A condição do combustível em relação aos tempos em que foram coletadas amostras não mostraram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

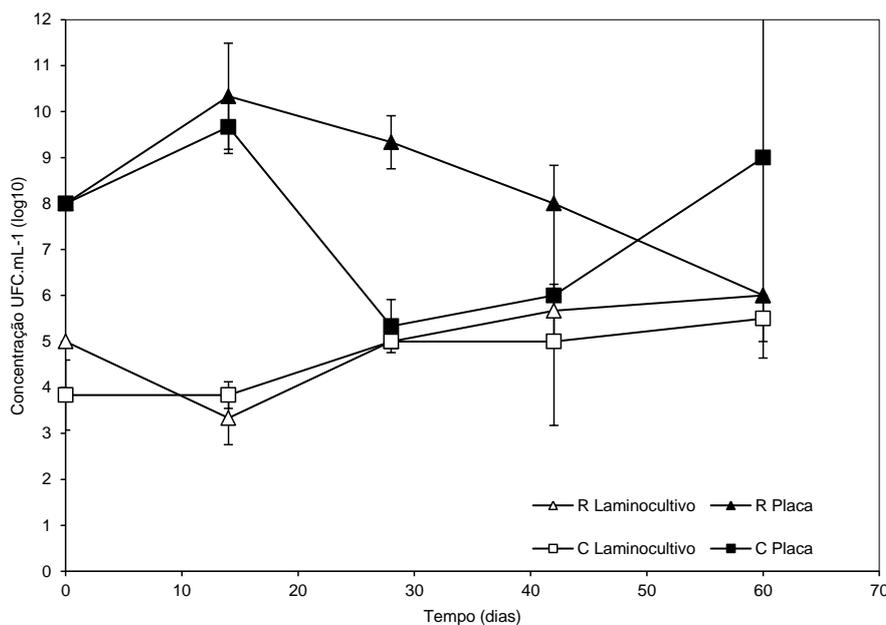


Figura 14. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo PCA da fase aquosa.

Na análise da concentração de microrganismos em fase aquosa, foi observado um alto grau de contaminação por microrganismos, atingindo uma estimativa de até  $10^{11}$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  na contagem em placa no meio de cultivo PCA, no microcosmo com a fase oleosa representada pelo combustível na condição de recebido. Este resultado demonstra uma significativa diferença em relação à amostra que recebeu o inóculo que atingiu até  $10^9$   $\text{UFC.mL}^{-1}$ , no meio de cultivo PCA, no tempo amostral de 60 dias de incubação, demonstrando que provavelmente este inóculo não estaria adaptado às condições encontradas na amostra da mistura B10 utilizada no experimento (Figura 14).

A estimativa na condição controle, sem adição de biocida, nas amostras contaminadas com inóculo microbiano variaram entre  $10^5$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  e  $10^9$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  na contagem em placa e entre  $10^4$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  e  $10^5$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  nos laminocultivos. Nas amostras na condição como recebido, sem adição de biocida, a estimativa ficou entre  $10^6$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  e  $10^{10}$   $\text{UFC.mL}^{-1}$  pela contagem

em placa e entre  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> na estimativa pelos laminocultivos (Figura 14).

Nos meios de cultivos, destinados ao crescimento de fungos e leveduras, tanto na contagem de células viáveis pelo método padrão como pela metodologia de laminocultivos, a condição do combustível, os tratamentos com biocidas e o período de incubação apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), o que demonstra um cenário diferente do observado para contagem de células bacterianas no meio de cultivo PCA (Figura 15).

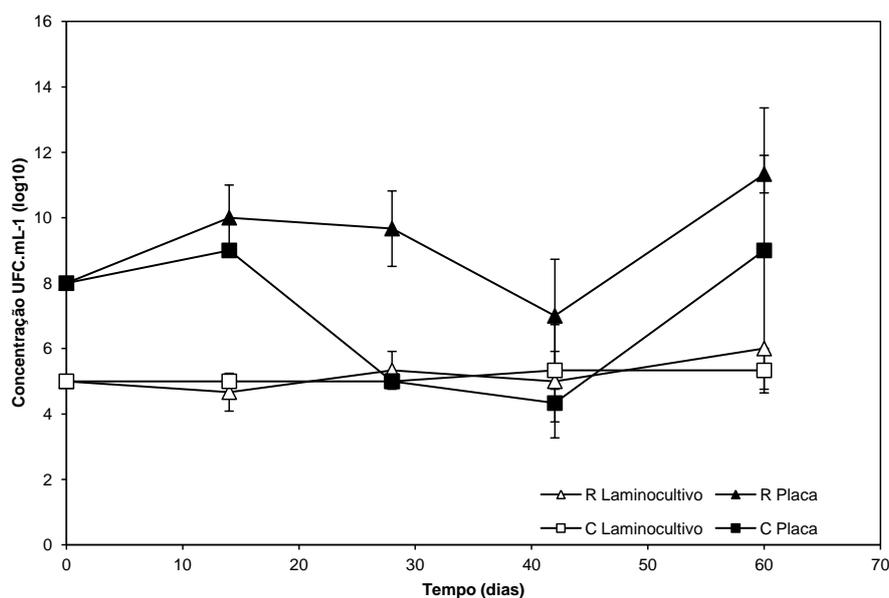


Figura 15. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase aquosa.

A contaminação por fungos e leveduras, foi relativamente menor à encontrada no meio PCA para cultivo principalmente de bactérias. A maior contaminação observada foi no último tempo amostral de 60 dias com uma estimativa de  $10^{11}$  UFC.mL<sup>-1</sup> na contagem em placa no meio de cultivo BDA. Provavelmente devido à especificidade o meio Agar Ogye, dentro do limite de

detecção do laminocultivo, é possível relacionar de forma mais adequada com os resultados obtidos por contagem em placa no meio BDA. Como observado no meio de cultivo PCA, na estimativa de microrganismos por contagem em placa no meio de cultivo BDA, as amostras de fase aquosa do microcosmo com a fase oleosa representada pelo combustível como recebido apresentaram um log de contaminação microbiana maior do que as observadas nas amostras de fase aquosa do microcosmo com a fase oleosa com combustível que recebeu a adição de inóculo microbiano.

O comportamento do laminocultivo na estimativa de microrganismos em amostras de água e combustível B10 tratados com biocidas de diferentes concentrações foi avaliado para observar se existe correspondência na estimativa da população microbiana em laminocultivos e pelo método padrão de contagem em placa.

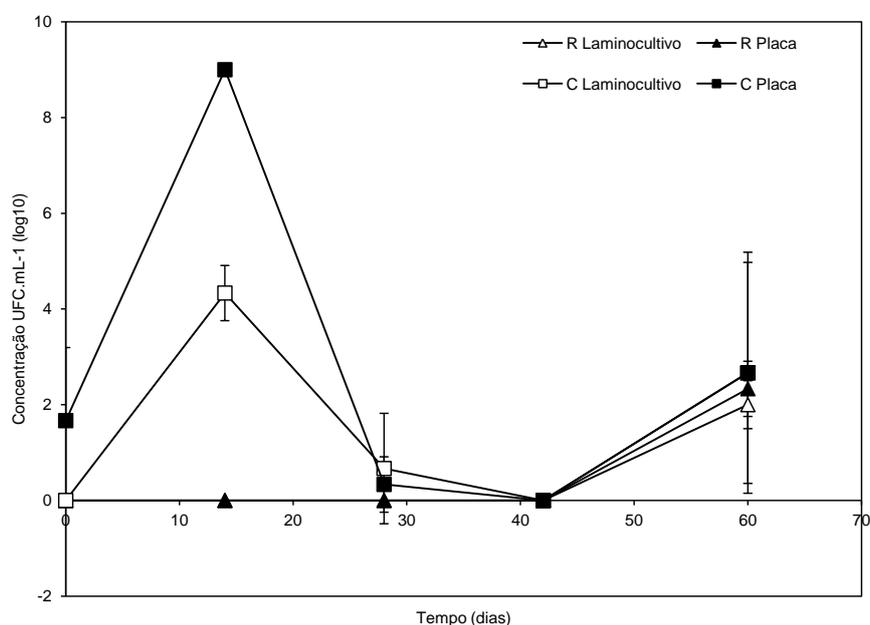


Figura 16. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  das condições recebido e contaminado, com adição do biocida MBO-100 na concentração de 500 ppm, no meio de cultivo PCA da fase aquosa.

A Figura 16, mostra os resultados da estimativa realizada pela contagem em placa no tempo 0 e mostrou uma faixa concentração de

microrganismos em  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, o que não pôde ser detectado nos laminocultivos e, aos 14 dias houve um pico de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> demonstrando, provavelmente a fase em que os microrganismos conseguiram se adaptar ao microcosmo. Pode se sugerir que até os 14 dias não houve migração de parte de compostos do biocida MBO-100 para a fase aquosa, possibilitando o estabelecimento de uma comunidade microbiana. Aos 28 dias já é possível observar a ação deste biocida na fase aquosa, controlando a contaminação até os 42 dias de ensaio. Nos 60 dias foi observada uma estimativa de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> na fase aquosa provavelmente devido a diminuição da ação do composto MBO-100 na fase aquosa e a adaptação da comunidade microbiana novamente, na faixa de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> detectada pela contagem em placa e pelos laminocultivos.

Na estimativa da fase aquosa no microcosmo com adição de biocida composto por MBO-100, na concentração de 500 ppm, avaliado no meio de cultivo para fungos BDA e Agar Ogye (placa e laminocultivos) foi estimada uma contaminação similar a observada no meio para bactérias no mesmo tratamento.

Até os 14 dias com contagem em placa de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e nos laminocultivos de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, após os 14 dias não foi mais observado crescimento microbiano tanto pelo método padrão de contagem em placa como no método alternativo de laminocultivos.

A fase aquosa, do microcosmo tratado com biocida composto por MBO-100 na concentração de 1000 ppm não apresentou nenhum crescimento de bactérias ou fungos, nas condições de contaminado e recebido durante os 60 dias de ensaio, demonstrando ação bactericida e fungicida deste biocida na fase aquosa.

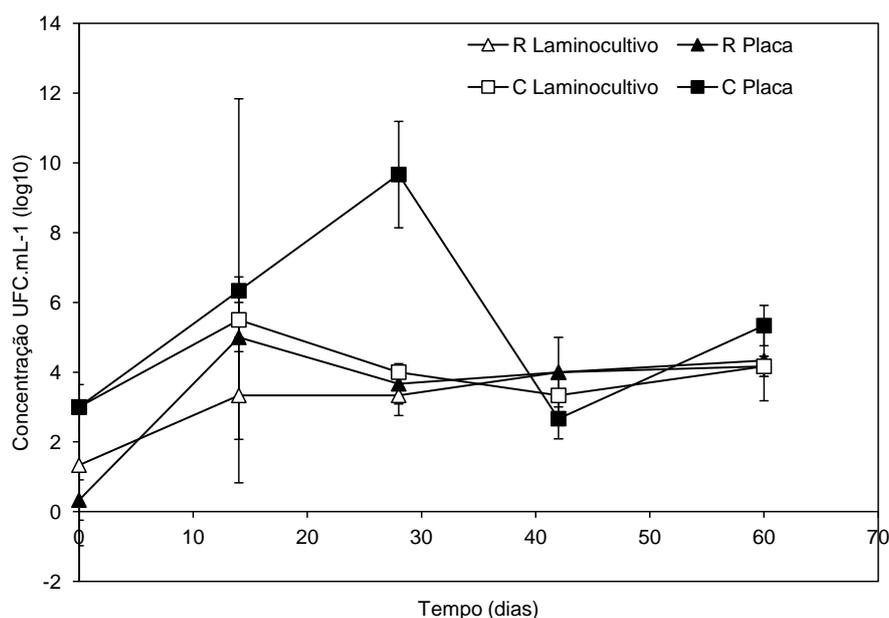


Figura 17. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto por MBO-50 na concentração de 500 ppm, no meio de cultivo PCA da fase aquosa.

A estimativa da contaminação microbiana na fase aquosa presente no microcosmo com adição do biocida composto por MBO-50 na concentração de 500 ppm, pode ser observado na Figura 17. Não houve um controle efetivo da população microbiana que permaneceu até os 60 dias de ensaio com estimativas de  $\text{UFC.mL}^{-1}$  constantes na faixa entre  $10^1 \text{ UFC.mL}^{-1}$  (média obtida a partir da triplicata de laminocultivos, por isso valor observado está abaixo do limite de detecção do método alternativo de laminocultivos, conforme determinado no item 5.4) e  $10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$  na condição de recebido, pelo monitoramento por laminocultivos e por contagem em placa. Na estimativa por laminocultivos de  $10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$  até  $10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$  e pela estimativa por contagem em placa entre  $10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$  e  $10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$  na condição que recebeu a contaminação com inóculo microbiano.

Neste cenário destacam-se as estimativas realizadas no tratamento com adição inóculo microbiano e de biocida MBO-50 com 500 ppm, tanto em meio de cultivo para o crescimento de bactérias (PCA) como o meio de cultivo designado para o crescimento de fungos e leveduras (BDA). Diferente do observado no controle, onde a estimativa de contaminação na condição do combustível adicionado ao microcosmo como recebido foi maior do que a observada no controle com adição de inóculo. No caso da adição dos biocidas, principalmente o MBO-50, o que se observa é o inverso, onde as maiores estimativas de contaminação são observadas na condição dos microcosmos que receberam a adição de inóculo microbiano.

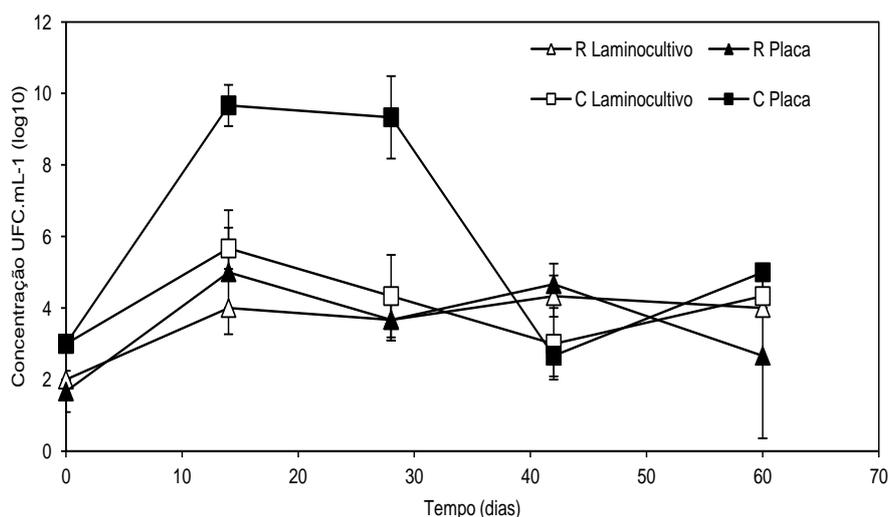


Figura 18. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto por MBO-50 na concentração de 500 ppm, no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase aquosa.

No meio de cultivo PCA a maior estimativa observada foi na amostragem aos 30 dias de experimento da amostra de fase aquosa presente em microcosmo com adição de um inóculo microbiano, correspondendo a  $10^9$   $\text{UFC.mL}^{-1}$ . Como observado na Figura 18, no meio de cultivo para fungos BDA

a maior estimativa observada foi de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> na amostragem de 21 dias e de 30 dias na amostra de fase aquosa com adição de inóculo microbiano.

O monitoramento com laminocultivos demonstrou bons resultados quando comparado às estimativas de UFC.mL<sup>-1</sup> realizadas pela metodologia padrão, nos meios de cultivo PCA e Agar Ogye.

Nos microcosmos que receberam a adição do biocida (MBO-50 na concentração de 1000 ppm), houve um controle da comunidade microbiana na condição do microcosmo com fase oleosa recebida (sem adição de inóculo microbiano) até os 30 dias de incubação. Em nenhum tempo amostral, a concentração 1000 ppm de biocida conseguiu controlar a contaminação de microrganismos em amostras da fase aquosa contaminada pelo inóculo microbiano. O que pode ser observado foi, uma redução do grau de contaminação por microrganismos de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> do controle sem adição de biocida, para  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> aos 60 dias de experimento (Figura 19).

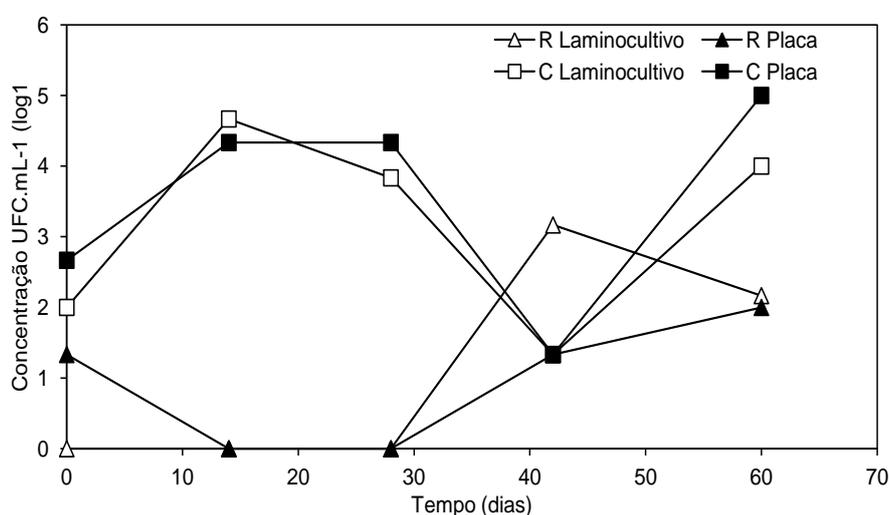


Figura 19. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto MBO-50 na concentração de 1000ppm, no meio de cultivo PCA da fase aquosa.

A estimativa da contaminação na fase aquosa, em meio de cultivo BDA e Agar Ogye no tratamento com a adição do biocida composto pode

MBO-50 na concentração de 1000 ppm, foi similar a observada para o meio de cultivo PCA, tanto na contagem em placa como na estimativa pelos laminocultivos (Figura 20).

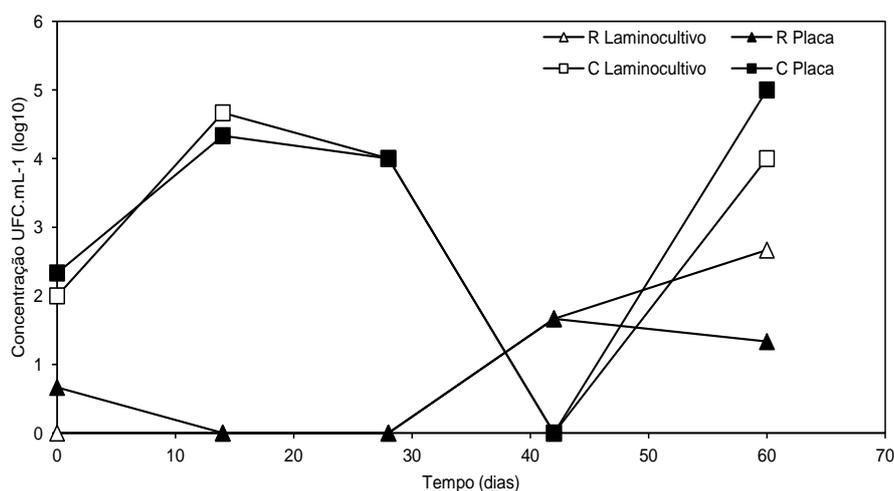


Figura 20. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto de MBO-50 na concentração de 1000ppm, no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase aquosa.

Durante o monitoramento na fase aquosa observou-se que o biocida MBO-50 e MBO-100, principalmente, estariam agindo na fase aquosa do microcosmo, já que as contagens de células viáveis em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  estavam sendo reduzidas ou até mesmo não detectadas. Uma característica importante dos biocidas a ser considerada é o coeficiente de partição, que é a afinidade que o biocida tem pela fase combustível ou pela fase aquosa, sendo que esta propriedade tem uma relação direta de efetividade e tempo de preservação do combustível (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2003; Bucker et al., 2010).

A partir da Figura 21, observam-se os resultados da estimativa de microrganismos obtidos nas amostras de fase oleosa, a contaminação de microrganismos observada no meio de cultivo PCA foram comparáveis pelos laminocultivos e pela contagem em placa.

A estimativa de microrganismos pelo método de laminocultivos e por contagem em placa, foi de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo que a amostra de combustível recebido apresentou uma maior contaminação do que a amostra dos microcosmos que receberam o inóculo microbiano. Dos 42 dias a 60 dias de ensaio, houve uma significativa redução na contaminação microbiana na amostra de  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> para  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, na condição de óleo recebido, inoculada em placa para contagem de células viáveis.

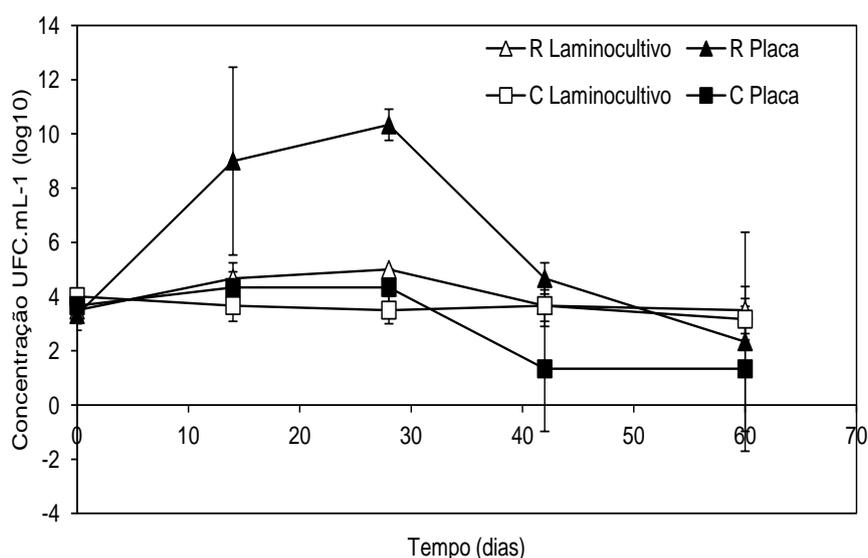


Figura 21. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo PCA da fase oleosa B10.

Na avaliação do crescimento de fungos e leveduras em placa e nos laminocultivos, nota-se que a estimativa na amostra de combustível como recebido foi de  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> e a do combustível contaminado com o inóculo microbiano foi de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A partir dos 14 dias de ensaio, houve um aumento na estimativa das amostras de combustível que receberam o inóculo microbiano, mantendo-se com um grau de contaminação microbiano similar ao encontrado na amostra de combustível na condição de recebido. Nos 60 dias de experimento também houve uma redução na população de fungos e

leveduras presentes na amostra de fase oleosa para  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, tanto na amostra de combustível na condição de recebido como no combustível contaminado com o inóculo microbiano (Figura 22).

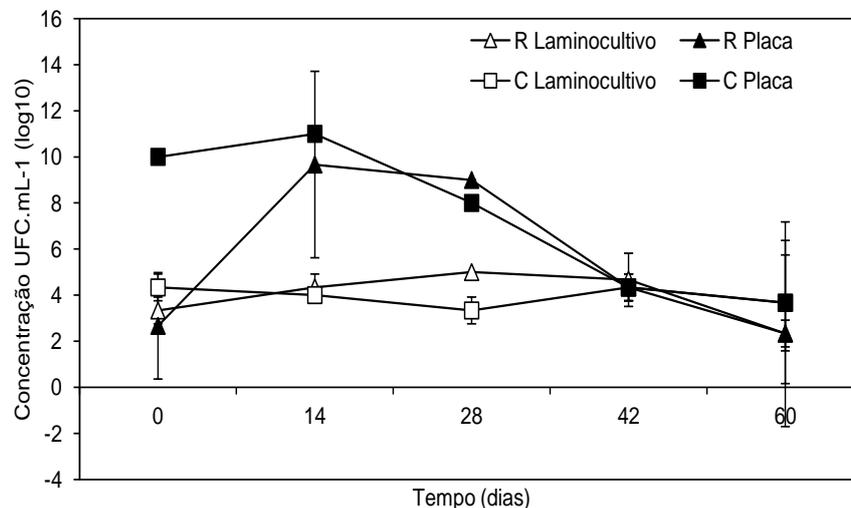


Figura 22. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado sem adição de biocida no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase oleosa B10.

Na fase oleosa não houve crescimento significativo de microrganismos até os 60 dias de ensaio, sendo que foi constatada uma baixa estimativa, de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> do grau de contaminação microbiana. Estas estimativas foram observadas nos meios de cultivo para bactérias e fungos dos laminocultivos e nas placas para contagem, nas amostras de óleo combustível B10 tratadas com o biocida MBO-100 na concentração de 500 ppm. Com a concentração de 1000 ppm o biocida MBO-100 foi efetivo e controlou a contaminação na fase oleosa até os 60 dias de ensaio.

O biocida composto por MBO-50 com a concentração de 500 ppm não foi efetivo no controle da contaminação microbiana na mistura B10, conforme observado na Figura 23. Os microcosmos contendo a contaminação do inóculo microbiano tiveram estimativa de contagem maior do que a observada no combustível como recebido. O maior grau de contaminação observado foi de

$10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> aos 14 dias de ensaio. Nos tempos amostrais de 42 dias e 60 dias as amostras recebidas e contaminadas apresentaram uma estimativa de microrganismos similar, mantendo a contaminação entre  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

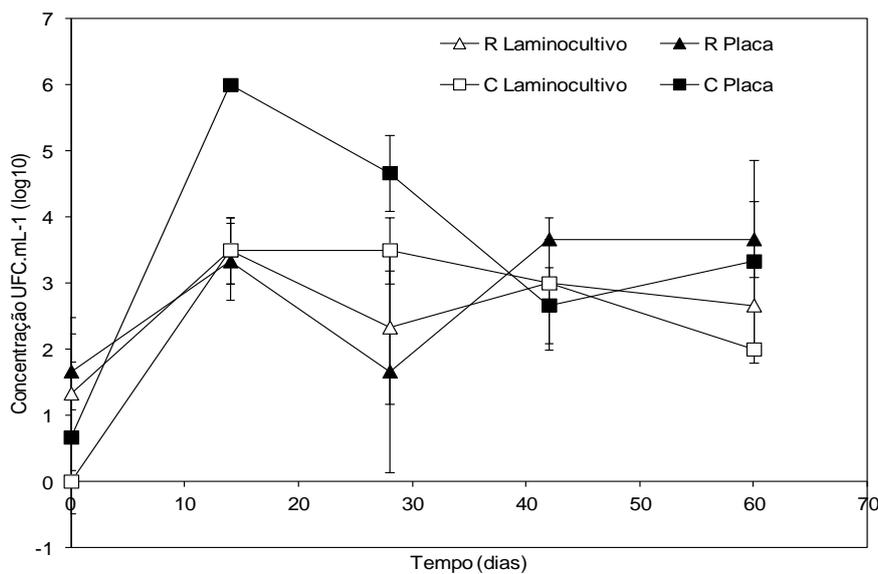


Figura 23. Estimativa em UFC.mL<sup>-1</sup> das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto de MBO-50 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo PCA da fase oleosa B10.

A estimativa nos meios de cultivo BDA e Agar Ogye foi similar a apresentada no meio de cultivo PCA em amostras contendo o biocida MBO-50 com concentração de 500 ppm. O maior grau de contaminação microbiana também foi observado no tempo amostral de 14 dias com  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> pela contagem em placa na amostra da mistura B10 com adição de inóculo microbiano (Figura 24).

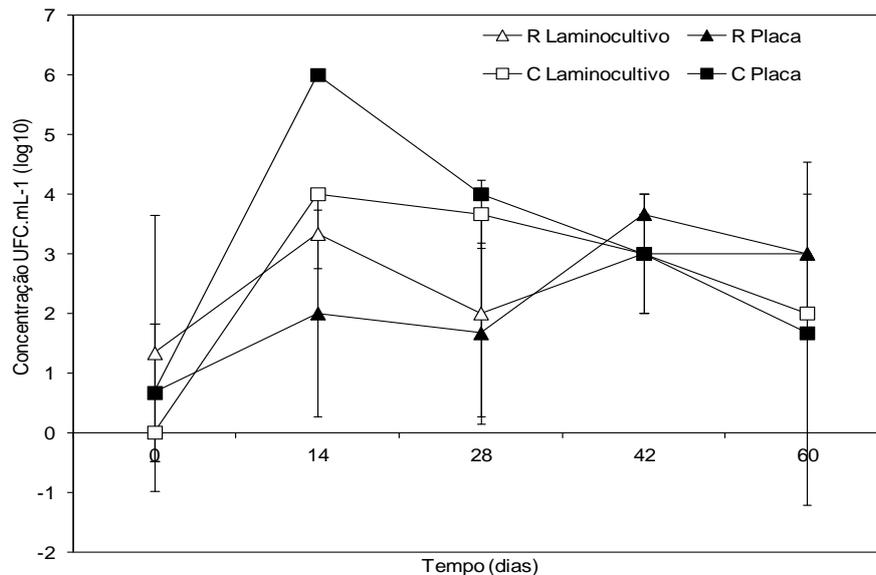


Figura 24. Estimativa em  $\text{UFC.mL}^{-1}$  das condições recebido e contaminado, com adição do biocida composto de MBO-50 na concentração de 500ppm, no meio de cultivo BDA e Agar Ogye da fase oleosa B10.

Os resultados obtidos com os laminocultivos na estimativa de microrganismos nas amostras de fase oleosa, não apresentaram diferenças entre as condições de combustível recebido ou com adição de inóculo microbiano, como pode ser observado nas estimativas observadas pela metodologia padrão de contagem de células viáveis em placa.

Hill (2010) avaliou a aplicação do MBO-100 em amostras com fase aquosa e fase oleosa e verificou a ação antimicrobiana nas duas fases avaliadas pela contagem de células viáveis pela metodologia de referência IP 385/99. O método alternativo de laminocultivos se mostrou útil para estimar a contaminação microbiana, dentro da sua faixa de análise ( $10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$  a  $10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) porque permite estabelecer um cenário de contaminação para tomada de ação e controle da qualidade do combustível. Quando comparado à metodologia de referência pode-se subestimar a contagem de microrganismos

porque esta é mais sensível, mas por se tratar de um método mais simples. Ainda, a metodologia de laminocultivos não deixa de fornecer dados relevantes para uma rotina de monitoramento quando observado os níveis aceitáveis e de alerta, como visto anteriormente na Figura 1 (Item 3.4).

Quando aditivos com características antimicrobianas são adicionados para interromper o crescimento de microrganismos no diesel, ele será efetivo se houver um completo isolamento do tanque de armazenamento para que, principalmente, não haja a penetração de água dentro do tanque (Srivastava & Nandan, 2012).

O aditivo antimicrobiano MBO-100 1.000 ppm, desde as primeiras horas de ação, controlou efetivamente a contaminação microbiana, tanto em fase aquosa como a fase oleosa. Este mesmo aditivo com a concentração de 500 ppm, nos microcosmos com combustível B10 recebido, na análise da fase aquosa houve o controle da população microbiana por todo o tempo de análises, enquanto nos microcosmos que receberam o inóculo microbiano, o aditivo MBO-100 500 ppm só foi eficaz após 28 dias de tratamento.

Na fase oleosa o MBO-100 1.000 ppm estabeleceu um controle da população, onde não foi observado nenhuma contaminação microbiana, enquanto que o MBO-100 com concentração de 500 ppm reduziu em grande quantidade a contagem de microrganismos para  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

## **5.6 Monitoramentos em tanques piloto de 20 L**

Com a finalidade de ser feita uma simulação prática da utilização dos laminocultivos e com base nos dados obtidos nas análises anteriores, com

volume de amostras, surfactantes e a comparação com a metodologia de referência (IP 385/99), foi feito o monitoramento da contaminação microbiana somente com os laminocultivos para estimativa da contaminação em fase aquosa e fase oleosa.

Após as etapas de validação, em condição de laboratório de microcosmos com uma fase oleosa e aquosa (meio mineral), foi conduzida uma escola piloto, mais próxima da realidade. Neste experimento, procurou-se avaliar a utilização dos laminocultivos para o monitoramento da contaminação microbiológica em amostras de fase aquosa e oleosa, em tanques de 20 L em uma simulação de armazenamento de combustíveis em escala piloto.

Foram avaliadas amostras de fase aquosa, representada por água de lastro de tanques reais e amostras de fase oleosa, representada pela mistura B10. Foram avaliados dois cenários de amostras de combustível, uma condição conforme recebido e outro a adição de um inóculo microbiano. Foram separados 4 tanques que receberam o aditivo, contendo a porção antimicrobiana MBO-50 na concentração de 1000 ppm, para avaliação do controle da contaminação microbiana durante o armazenamento. A estimativa da contaminação também foi realizada pela contagem no meio de cultivo PCA.

Na fase aquosa, a condição (com ou sem inóculo microbiano ASTM E1259-10), o aditivo e o tempo tiveram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sendo fatores que influenciaram a estimativa da contaminação microbiana, durante o armazenamento simulado da mistura B10.

Na Figura 25a, que mostra a evolução do crescimento microbiano dos tanques sem biocida, pode ser observado que os tanques 1 e 2, que receberam a adição do inóculo mantiveram um grau de contaminação microbiana entre  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os tanques 3 e 4 sem a adição

do inóculo microbiano, demonstraram uma contaminação considerada ambiental, devido à baixa estimativa de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, aos 60 e 90 dias respectivamente.

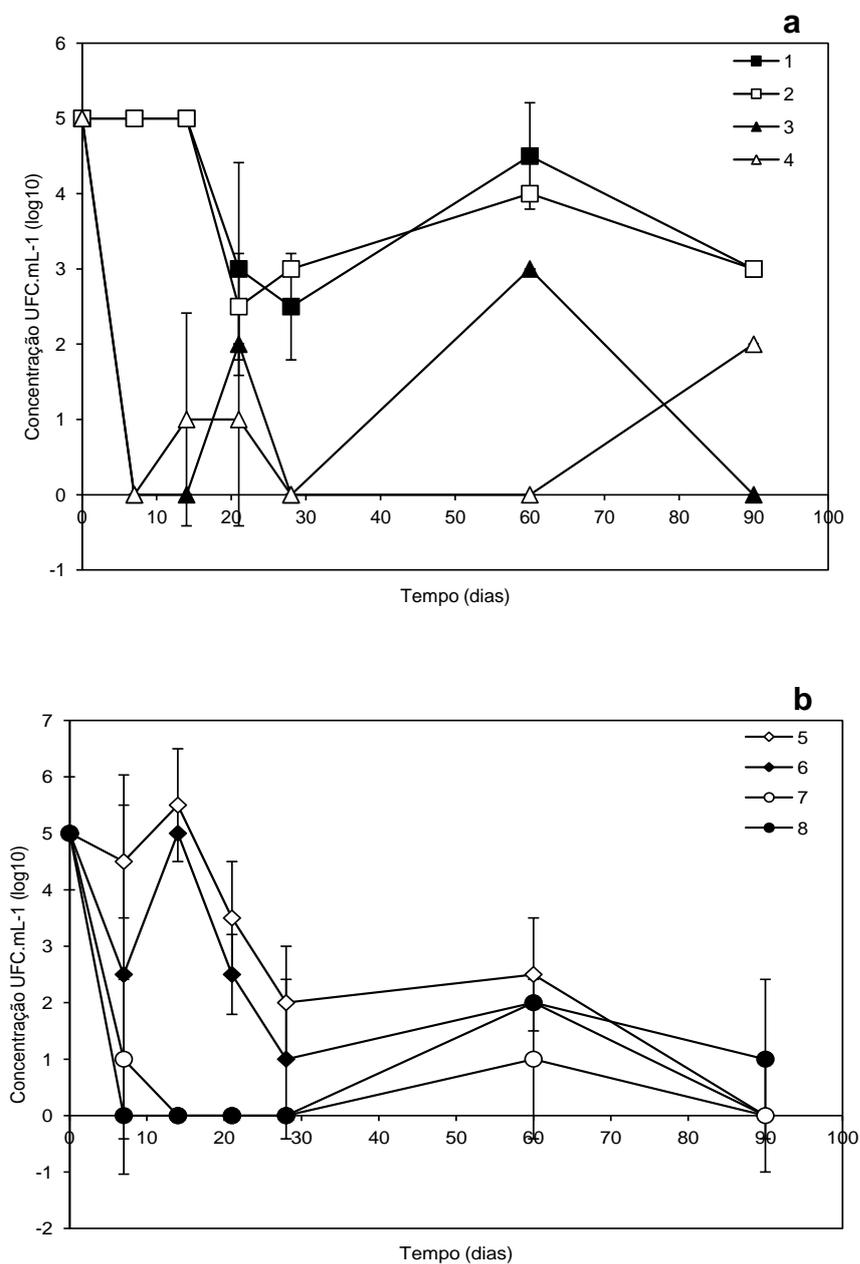


Figura 25. **a.** Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase aquosa. (1-Sem aditivo e com inóculo; 2- Sem aditivo e com inóculo; 3- Sem aditivo e recebido; 4- Sem aditivo e recebido). **b.** Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase aquosa. (5- Com inóculo e aditivo; 6- Com inóculo e aditivo; 7- Recebido e com aditivo; 8- Recebido e com aditivo).

Na figura 25b mostrado, nos tanques 7 e 8, que receberam o aditivo MBO-50 na fase do óleo combustível sem a adição de inóculo, que a partir do 7º dia já não foi possível detectar a contaminação por microrganismos da fase aquosa no laminocultivo. A provável razão para este resultado deve-se a ação bactericida do aditivo MBO-50, na condição de combustível recebido ( $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

No 60º dia de experimento notou-se uma pequena estimativa de microrganismos ( $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>), pelos laminocultivos, que não havia sido observada nos tempos amostrais anteriores. A partir do 90º dia esta contaminação microbiológica estimativa já não foi mais observada (Figura 25b).

No 21º dia, foi observada a redução da concentração de microrganismos de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> em amostras dos tanques 5 e 6, que receberam o inóculo microbiano e foram tratadas com o aditivo.

As amostras coletadas da fase oleosa foram tomadas a aproximadamente 5 cm acima do fundo do tanque experimental.

As amostras sem a adição MBO-50, permaneceram indicando crescimento microbiano na superfície do óleo, até os 90 dias de armazenamento (Figura 26a). Nas amostras sem aditivo e analisadas conforme recebidas a contaminação microbiana ficou na faixa de  $10^2$  UF.mL<sup>-1</sup> dos 7 dias até os 60 dias de experimento.

Os tanques sem aditivo e que receberam o inóculo microbiano mantiveram uma contaminação entre  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> dos 7 dias até os 60 dias de avaliação.

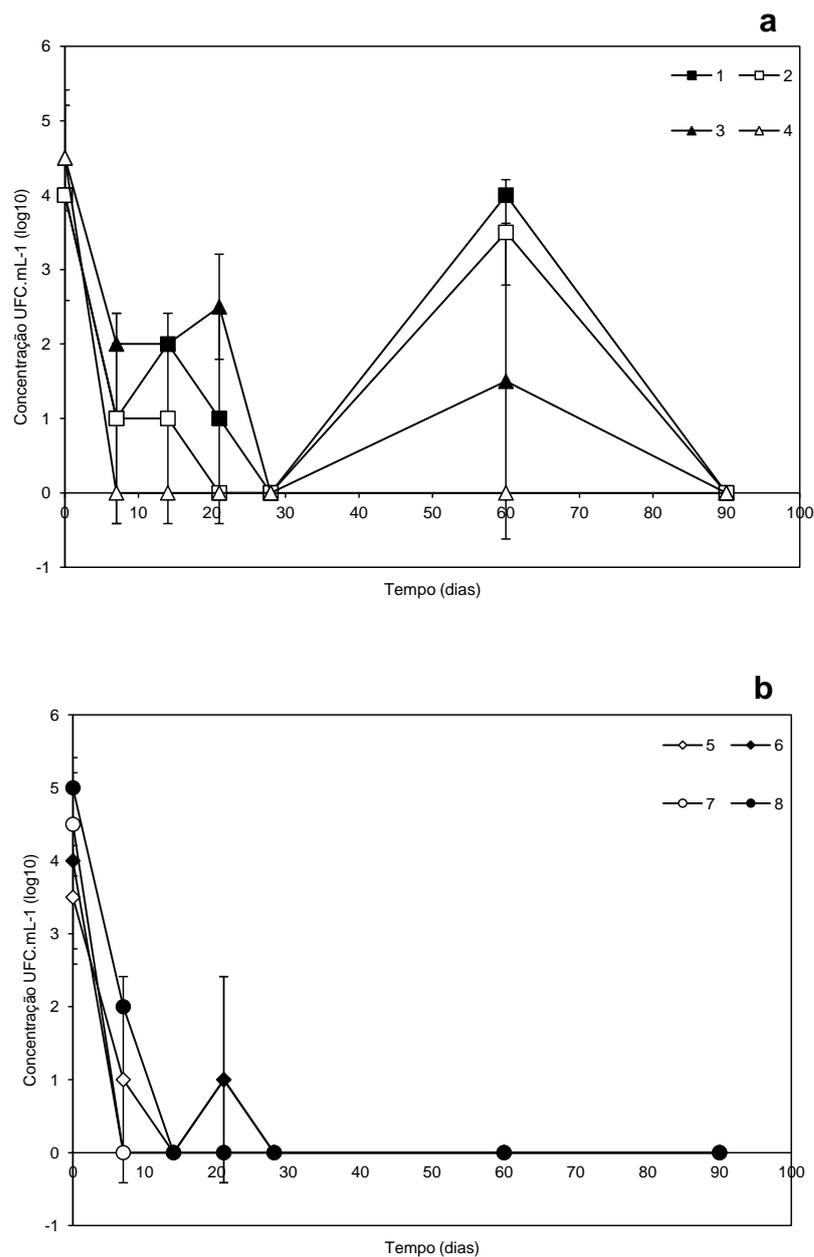


Figura 26. Estimativa da concentração no meio de cultivo PCA em fase oleosa (superfície do tanque). **a.** (1-Sem aditivo e com inóculo; 2- Sem aditivo e com inóculo; 3- Sem aditivo e recebido; 4- Sem aditivo e recebido). **b.** (5- Com inóculo e aditivo; 6- Com inóculo e aditivo; 7- Recebido e com aditivo; 8- Recebido e com aditivo)

O monitoramento das amostras de óleo da superfície com os laminocultivos, nos tanques onde o aditivo MBO-50 foi adicionado, nas amostras recebidas e contaminadas, após o 14<sup>o</sup> dia não indicou contaminação microbiológica (Figura 26b). Nota-se que os laminocultivos não detectaram a

contaminação no 28º dia, no óleo conforme recebido; e, nos tempos amostrais de 7 dias, 21 dias e 28 dias em amostras que receberam contaminação, sendo este fato possivelmente relacionado à sensibilidade do produto, que detecta no mínimo uma contaminação de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

As amostras de combustível que receberam contaminação média de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> no inóculo microbiano, apresentaram uma redução na contaminação a partir do 28º dia.

Passman (2013) sugere que, quando possível os testes a campo com biocidas para o controle da contaminação microbiana em combustíveis, devem ser realizados, pois são preferíveis aos ensaios realizados em laboratório. Desta forma, neste experimento, foi possível monitorar o desenvolvimento microbiano durante o armazenamento simulado da mistura B10 tratados ou não com biocida MBO-50, em tanques.

Também foi possível observar a utilização dos laminocultivos como um método mais simples para se monitorar o crescimento microbiano em amostras de combustível e/ou água presente durante o armazenamento e, avaliar a efetividade um aditivo adicionado para o controle desta população microbiana.

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível avaliar e validar o uso de laminocultivos na estimativa de microrganismos deteriorogênicos de óleo diesel na fase oleosa e aquosa.

A estimativa e o crescimento dos microrganismos deteriorogênicos de óleo diesel (*Paecilomyces variotii*, *Candida silvicola* e *Bacillus pumils*) em fase aquosa foi comparável nas duas metodologias analisadas, de contagem placa e pelos laminocultivos.

Quanto ao monitoramento da contaminação microbiana em duas fases oleosas com o uso de laminocultivos, foi possível observar comportamento distinto na estimativa quanto à imersão em solução salina 0,85 % e diretamente na amostra de combustível B10 ou B100.

Foi possível determinar que a solução diluente de Tween 80 na concentração de 0,01 % apresentou resultados satisfatórios na estimativa de microrganismos da mistura B10 pelo método de laminocultivos.

Foi determinado o volume de 5 mL de amostra como representativo para a diluição que deve ser realizada para a estimativa de microrganismos em fase oleosa com a mistura diesel e biodiesel (B10).

Foram obtidos resultados comparáveis em termos de validação da linearidade e precisão dentro do alcance de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, do método alternativo na estimativa de *Candida silvicola*, em amostra de mistura B10 com a metodologia de referência (IP 385/99) e pela metodologia alternativa de laminocultivo.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na exatidão entre os dois métodos avaliados, quando comparados simultaneamente, pois em alguns casos, devido a alta contagem de microrganismos e a faixa de estimativa, de  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, pelos laminocultivos estes não forneciam um cenário de contaminação acima do seu limite máximo, como o que foi visto quando a contagem era realizada pelo método de referência IP 385/99 (Item 5.5).

Foi possível estabelecer uma faixa ótima de quantificação do método de laminocultivos, já proposto pelo mesmo, em sua estimativa da contaminação microbiana de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, onde uma indicação de tomada de ação, conforme proposto por Hill & Hill (2009) a partir de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Foi possível estimar o comportamento da população microbiana, com o uso dos laminocultivos, durante o monitoramento da contaminação em mistura B10 tratada com os biocidas MBO-50 e MBO-100 em escala laboratorial.

Na escala piloto (tanques de 20 L) com a mistura B10 tratada e não tratada com o biocida MBO-50 (1000 ppm) e com dois níveis de contaminação microbiana (baixa  $10^3$  e média  $10^5$  UFC/mL), a estimativa microbiana com o uso de laminocultivos permitiu avaliar somente a condição de média contaminação na fase oleosa até os 21 dias e na aquosa até os 60 dias.

## 7. PERSPECTIVAS

- Determinar em ensaio o volume de amostra de combustível para análise microbiológica com o biodiesel puro (B100) e o diesel A (B0);
- Realizar o ensaio de validação de método microbiológico alternativo para os microrganismos *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Paecilomyces variotii* com a amostra de mistura B10;
- Realizar o ensaio de validação de método microbiológico alternativo para os microrganismos *Candida silvicola*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Paecilomyces variotii* com a amostra de diesel (B0);
- Realizar o ensaio de validação de método microbiológico alternativo para os microrganismos *Candida silvicola*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Paecilomyces variotii* com a amostra de fase aquosa;
- Avaliar a implementação a campo do método de laminocultivos para estimativa da contaminação microbiana no combustível diesel comercializado atualmente em postos revendedores de combustíveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Orientações e Procedimentos para o manuseio e armazenagem de óleo diesel B. 2010. Disponível em: [www.anp.gov.br/?dw=28386](http://www.anp.gov.br/?dw=28386). Acessado em 09 de Outubro de 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em 03 de Maio de 2012.

AKTAS, D. F.; LEE, J. S.; LITTLE, B. J.; RAY, R. I.; DAVIDOVA, I. A.; LYLES, C. N.; SUFLITA, J. M. Anaerobic metabolism of biodiesel and its impact on metal corrosion, **Energy Fuel** v.24, p. 2924–2928, 2010.

ALEME, H. G.; CORGOZINHO, C. N. C.; BARBEIRA, P. J. S. Diesel oil Discrimination by origin and type using physicochemical properties and multivariate analysis. **Fuel**, v.89, p.3151–3156, 2010.

ANACLETO, F. E.; RESONTOC, P.; PADILHA, G.H. Bedside diagnosis of outpatient childhood urinary tract infection using three-media dipslide culture test. **Pediatric Nephrology**, v. 24, p.1539–1543, 2009.

AQUINO, I. P.; HERNANDEZ, R. P. B.; CHICOMA, D. L.; PINTO, H. P. F.; AOKI, I. V. Influence of light, temperature and metallic ions on biodiesel degradation and corrosiveness to copper and brass. **Fuel**,v.12, p. 795-807, 2012.

ASSIS, P. A.; ANDRADE, S. B.; OLIVEIRA, C. M. C.; ARAÚJO, P. M.; JÚNIOR, S. G.; RAMOS, S. V. V. Development and validation o microbial counting method for mebendazole oral suspension. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.3, p. 555-563, 2011.

BAILEY, C.A; MAY, M.E. Evaluation of microbiological test kits for hydrocarbon fuel systems. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 37, n. 5, p. 871-877, 1979.

BARBOSA, L.S.; SARTORI, M.R.K. Métodos de esterilização de artigos hospitalares efetivos contra micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido. **Cadernos da Escola de Saúde**. v.5, p-136-153, 2012.

BAUTISTA, L.F.; SANZ, R.; MOLINA, M. C.; GONZÁLEZ, N.; SÁNCHEZ, D. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation** v.63, p.913–922, 2009.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. **International Biodeterioration and Biodegradation** v. 38, p. 31-33, 1996.

BENTO, F. M.; Gaylarde C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation** 47(2): 107-112, 2001.

BERRIOS, M. Storage effect in the quality of different methyl esters and blends with diesel. **Fuel** v.91, p.119–125, 2012.

BORSATO, D.; MAIA, E. C. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; SILVA, H.C.; PEREIRA, J.L. Cinética da oxidação de biodiesel de óleo de soja em mistura com TBHQ: determinação do tempo de estocagem. **Química Nova**, v. 35, No. 4, p.733-737, 2012.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v.86, p. 2596–602, 2007.

BOUBETRA, A.; NESTOUR, F. L.; ALLAERT, C.; FEINBERG, M. Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and their application to *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p. 3360-3367, 2011.

BÜCKER, F. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 147f., 2009.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ZIMMER, A.; CAVALCANTI, E.; GAYLARDE, C. C.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Impacto da adição de biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: um enfoque microbiológico e controle. **Revista Biodiesel**. Caderno Técnico. nº47, 2010.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2011.

BRAUN, S.; APPEL, L.G.; SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química Nova** v.27 no.3, p.472-482, 2004.

BRITO, G. C. B.; SOUZA, D. B.; VASCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L. C. A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.3, p. 291-310, 2010.

BRITISH PETROLEUM (BP), Long term storage of diesel. 2005. Document: ADF1403.doc Issued: February 10, 2005 BP Australia Limited A.C.N. 004 085 616. Page 3 of 3. Disponível em: <[http://www.bp.com/liveassets/bp\\_internet/australia/corporate\\_australia/STAGING/local\\_assets/downloads\\_pdfs/f/Long\\_Term\\_Storage\\_ADF.pdf](http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/australia/corporate_australia/STAGING/local_assets/downloads_pdfs/f/Long_Term_Storage_ADF.pdf)> Acesso em 09 de Outubro de 2012.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v.41, p.653–673, 1941.

CAVALCANTI, E. Estabilidade do biodiesel e misturas. **Revista Biodieselbr**, Ano 3, Nº 13, p. 71-73, 2009.

CERQUEIRA, V. S., HOLLENBACH, E. B., MABONI, F., VAISNTEIN, M. H., CAMARGO, F. A. O., PERALBA, M. C. R., BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology** 102. P. 11003-11010. 2011.

CHALUT, J.; ROSE, D. Rapid microbiological monitoring methods. In: **24th Annual Electric Utility Chemistry Workshop, 2004. Proceedings...**

CHAO, Y.; LIU, N.; ZHANG, T.; CHEN, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel** v. 89, p. 3358–3364, 2010.

CHAUAN, S.; GANGOPADHYAY, S.; SINGH, N. Environmental aspects of biofuels in road transportation. **Environmental Chemistry Letters**, p.289–299, 2009.

CHEN, P.; Pickard, M.A.; GRAY, M.R. Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. **Biodegradation**, v.11, p. 341–347, 2000.

CHERVENAK, M.C. The environmental fate of commonly used oxidizing and non-oxidizing biocides: Reactions of industrial water biocides within the system. International Environmental Conference and Exhibit, Denver, O, USA, 6-10 Maio de 2000, v.2 p.579-594, 2000.

CHRZANOWSKI, L.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Relation between *Candida maltosa* hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** v. 21, p.1273–1277, 2005.

CIRELLI, A. F. Surfactants in sludge-amended agricultural soils: a review. **Environmental Chemistry Letters**. v.6, p.135–148, 2008.

COONEY, J. J.; EDMONDS, P.; BRENNER, Q. M. Growth and survival of fuel isolates in hydrocarbon-fuel emulsions. **Applied Microbiology**, v. 16, p.569-571, 1968.

COUTINHO, R. C. P.; GOMES, C. C. Técnicas para biorremediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2006.

CUI, Y.; CHEN, S. The key influence factors of microorganism pollution in jet fuel system. 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI), p 1541-1544, 2011.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S.; ROSÁRIO, M. Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. Série Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p.45, 2008.

DAMASCENO, R. G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 78f., 2011.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon : an overview. **Biotechnology Research International**. 13 p., 2011.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy** v.35, p.4661–4670, 2007.

DIEGIELEWSKI, W.; SARNECKI, J. Discussion on microbial contamination of naval fuels. **Polish Maritime Research**. v,16, p. 41-44, 2009.

DODOS, G. S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S.; ZANNIKOS, F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Global NEST Journal**, Vol 14, No 2, p 175-182, 2012.

DUGUID, J.; BALKOVIC, E.; MOULIN, G.C. Rapid Microbiological Methods: Where are they now?. **American Pharmaceutical Review**. v.14, nº7. Disponível em: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/37220-Rapid-Microbiological-Methods-Where-Are-They-Now/> Acesso em: 05 de Maio de 2012.

EMILSON G.G., KRASSE, B. Comparison between a dip-slide test and plate count for determination of *Streptococcus mutans* infection. **ScandJ Dent Res** v.94:500-6, 1986.

ENERGY INSTITUTE. Implications of biofuels on microbial spoilage and corrosion within the fuel distribution chain and use. **Energy Institute literature review**, 2008.

FAZAL, M.A.; HASEEB, A.S.M.A.; MASJUKI, H.H. Comparative corrosive characteristics of petroleum diesel and palm biodiesel for automotive materials. **Fuel Processing Technology** v.91, p.1308–1315, 2010.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p.174–183, 2007.

FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; MACIEL, M. R. W. Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. **Journal of Chemical & Engineering Data**. v. 57, p. 1817–1821, 2012.

GAMMON, J. Aviation fuel: Quality control procedures. 4<sup>th</sup> edition, ASTM, 2009.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30 p.01-10, 1999.

GELLER, D. P.; ADAMS, T. T.; GOODRUM, J. W.; PENDERGRASS, J. Storage stability of poultry fat and diesel fuel mixtures: Part II – Chemical properties. **Fuel** v. 89 p. 792–796, 2010.

GOMES, E. B.; SORIANO, A. U.; MIRANDA, R. C. M.; SOUSA, M. F. V.; JÚNIOR, N. P. Biodegradation of stored jet fuel by a *Nocardia sp.* isolated from contaminated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n. 5, p.1279-1284, 2009.

GROOT, A.; GEYER, J.; FLYVHOLM, M. A.; LENSEN, G.; COENRAADS, P.J. Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Metalworking fluids and remainder. Part 1. **Contact Dermatitis** v.63, p. 117–128, 2010.

GUTTMANN, D.; NAYLOR, G. R. E. Dip-Slide: An aid to quantitative urine culture in general practice. **British Medical Journal**. v. 3, p.343-345, 1967.

HASSEB, A. S. M. A.; MASJUKI, H. H.; ANN, L. J. FAZAL, M. A. Corrosion characteristics of copper and leaded bronze in palm biodiesel, **Fuel Processing Technology** V.91, p.329–334, 2010.

HEDRICK, H. G., CARROLL, M. T., OWEN, H. P., PRITCHARD, D. J.. Viability of Selected Microorganisms in Hydrocarbon Fuels. **Applied Environmental Microbiology**, 11(6), p.472-475, 1963.

HILL, E. C. Use of thixotropic biopolymers as an alternative to agar for the cultivation of microorganisms on solid media. **Polymer Degradation and Stability**. Elsevier Science Limited, p.121-128, n 59, 1998.

HILL, E. C.; HILL, G. C. Detection and remediation of microbial spoilage and corrosion in aviation kerosene- from refinery to wing. ECHA Microbiology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9., 2005. **Proceedings**... 2000.

HILL, T. Microbial growth in aviation fuel. **Aircraft Engineering and Aerospace Technology**, v.75, p. 497 – 502, 2003.

HILL, E. C.; HILL, G.. Strategies for Resolving Problems Caused by Microbial Growth in Terminals and Retail Sites Handling Biodiesels. ECHA Microbiology.

In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9., 2005. **Proceedings**... 2009.

HILL, E. C.; HILL, G. C.; COLLINS, D. A new on-site quantitative test for microorganisms in fuel. ECHA Microbiology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9., 2005. **Proceedings**... 1997.

HUBER, P.; CARRÉ, B.; ZENO, E. The effect of several non-oxidizing biocides on fine paper wet-end chemistry. **BioResources**, v.5(3), p. 1675-1688, 2010.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Stability of biodiesel and its blends: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 14, p. 667–678, 2010.

KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S.; KARONIS, K. Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. **Fuel** v.89 p. 2483–2489, 2010.

KLINKSPON, N. Impact of biodeterioration on diesel fuel systems. In: IASH 2009- 11<sup>th</sup> International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, October, 18-22, 2009,

KLOFUTAR, B.; GOLOB, J. Microorganisms in diesel and in biodiesel fuels. **Acta Chimica Slovenica** v.54,p. 744–748, 2007.

KRSTONOŠIĆ, V., DOKIĆ, L., DOKIĆ, P., DAPČEVIĆ, T. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. **Food Hydrocolloids** v. 23(8): p. 2212-2218, 2009.

LEE, J.S.; RAY, R.I.; LITTLE, B.J. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. **Biofouling**, v. 26, p. 623-635, 2010.

LIANG, F.; LU, M.; KEENER, T. C.; LUI, Z.; KHANG, S. J. The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator. **Journal Environmental Monitoring**, v.7 , p.983 – 988, 2005.

LOMBARD, B.; LECLERCQ, A. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. **Food Analysis Methods**, v.4, p. 163-172, 2011.

McCOMB, J. P. **A metagenomic analysis of microbial contamination in aviation fuels**. Thesis (Master of Science in Engineering Management). Department of the Air Force. Air Force Institute of Technology. Air University. Ohio. 238f., 2009.

McFARLANE, Elaine. Problems caused by microbes and treatment strategies downstream petroleum microbiology—An industry perspective. **Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems**, p. 159-167, 2011.

MACKEY, J. P.; SANDYS, G. H. Laboratory diagnosis of infections of the urinary tract in general practice by means of a dip-inoculum transport medium. **British Medical Journal**. v 2(5473): p.1286–1288, 1965.

MAILA, M.P; CLOETE, T.E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.55, p. 1–8, 2005.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology—Rev. IFP**, v. 58, p. 441-448, 2003.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; CONTIERO, J.; ANGELIS, D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v.7(9), p. 1323-1328, 2008.

MARUDOVA-ZSIVANOVITS, M.; JILOV, N.; GENCHEVA, E. Rheological investigation of xanthan gum—chromium gelation and its relation to enhanced oil recovery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, p.160–166, 2007.

MATTOS, A. F.; AGUIRRA, D.; SUNAGAWA, D.; BORGES, L.; CONSONI, R. Validação de Métodos Microbiológicos. **Revista Fármacos & Medicamentos**, nº. 59, Setembro, 2009.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, p. 248–268, 2006.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 161f., 2011.

MILLIOLI, V.S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo.** Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 200f, 2009.

MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA. **Cartilla Minoristas - Buenas prácticas de Manejo** para el biodiésel y las mezclas en la cadena de distribución de combustibles en Colombia. Ministerio de Minas y Energía - Dirección de Hidrocarburos, 2011.

MUTHUKUMAR, N.; MARUTHAMUTHU, S.; PALANISWAMY, N. Role of cationic and nonionic surfactants on biocidal efficiency in diesel-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.57, p.152–160, 2007.

MUKHERJEE, I.; MANNA, K.; DINDA, G.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Shear and temperature-dependent viscosity behavior of two phosphonium-based ionic liquids and surfactant Triton X-100 and their biocidal activities. **Journal of Chemical & Engineering Data** v.57, p.1376-1386, 2012.

NADIM, F.; ZACK, P.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J. Non-uniform regulations of underground storage tanks in the United States- Call for a national-scale revision. **Spill Science & Technology Bulletin**, v.6., p-341-348, 2000.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). Biodiesel handling and use guide. 4<sup>th</sup> edition. NREL/TP-540-43672. US Department of Energy, 2009.

NAYLOR, G.R.; GUTTMANN, D. The Dip-Slide: a modified dip-inoculum transport medium for the laboratory diagnosis of infections of the urinary tract. **Journal of Hygiene**, v.65(3), p. 367-71, 1967.

NUTRILAB. Responsável Técnico Elisa H. Uemura. Paraná: Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda., 2008.

PASSMAN, F. J. ASTM International. **Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**, Manual 47. 114p., 2003.

PASSMAN, F.; DOBRANICK, J.K. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9., 2005. **Proceedings...** Espanha, Setembro, p.18-22, 2005.

PASSMAN, F.J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**. p.1-17, 2013.

PRASANNA, P. H. P.; BELI, A.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOUS, D. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.533–540, 2012.

RAIKOS, V.; VAMVAKAS, S. S.; KAPOLOS, J.; KOLIADIMA, A.; KARAIKAKIS, G. Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**. v.90, p. 695-700, 2012.

RAJASEKAR, A.; TING, Y-P. Microbial corrosion of aluminum 2024 aeronautical alloy by hydrocarbon degrading bacteria *Bacillus cereus* ACE4 and *Serratia marcescens* ACE2. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. v 49, p. 6054–6061. Cingapura, 2007.

RAJASEKAR, A.; ANANDKUMAR, B.; MARUTHAMUTHU, S.; TING, Y. P.; RAHMAN, P. K. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 85, p.1175–1188, 2010.

RAUCH, M. E.; GRAEF, H. W.; ROZENZHAK, S. M.; JONES, S. E.; BLECKMANN, C. A.; KRUGER, R. L.; NAIK, R. R.; STONE, M. O. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation

fuel tanks. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33,p.29–36, 2006.

REISFELD, A.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.24 p. 363-36, 1972.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; RODRÍGUEZ,E.; BLANCO, R.; CORDERO, I.; SEGURA, D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22(10), p.1595–1601, 2010.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.E.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E.; BLANCO, R. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.57(3), p.489-504, 2009.

ROUSE, J. D.; SABATINI, D. A.; SUFLITA, J. M.; HARWELL, J. H. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v.24, p.325–370, 1994.

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Infection Control Practices Advisory Committee. Department of health & human services. USA, 2008.

SALO, S.; LAINE, A.; ALANKO, T.; SJÖBER, A.; WIRTANEN, G. Validation of the microbiological methods Hygicult dipslide, contact plate and swabbing in surface hygiene control: A nordic collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n.6, 2000.

SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTRUFF, R. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures. **Bioresource Technology** v. 100 p. 724–730. 2009.

SCHULTZ, F. M. **Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 137f., 2010.

SIEGERT, N. Microbial contamination in diesel fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009- 11<sup>th</sup> International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czeth Republic, 18-22, October, 2009.

SONG, M.; BIELEFELDT, A.R. Toxicity and inhibition of bacterial growth by series of alkylphenol polyethoxylate nonionic surfactants. **Journal of Hazardous Materials** v.219– 220, p.127– 132, 2012.

SORENSEN, G.; PEDERSEN, D. V.; NORGAARD, A. K.; SORENSEN, K. B.; NYGAARD, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v.102, p. 5259–5264, 2011.

Souza, C. S.; Miranda, R. de C. M., Sena, K. X. F. R.; Araújo, J. M.; Chiappeta, A. A.; Sousa, M. de F. V. Q. (2005) Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS. Salvador, Brasil.

SRIVASTAVA, N. K. & NANDAN, N. K. Microbial growth control in diesel by optimization of sulphur. *International Journal of Environmental Pollution and Remediation*, v. 1, p. 119-125, 2012.

SUN, N.; WANG, H.; CHEN, Y.; LU, S.; XIONG, Y. J. Effect of surfactant SDS, Tween 80, Triton X-100 and rhamnolipid on biodegradation of hydrophobic organic pollutants. 2008. ICBBE 2008. The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. 16-18 May, p-4730-4734, 2008.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n.8, 2004.

THOMPSON, M.; ELISSON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**. V.74, p. 835-855, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) Chapter 1223. "Validation of alternative microbiological methods". USPC Oficial USP32–NF27 Page 731 Pharmacopeial Forum: Volume No. 31(5) Page 1475, 2010. Disponível em: <http://www.academy.luminultra.com/images/stories/docs/USP-1223-validation-of-alternative-microbiological-methods.pdf> Pharm. Forum 29 (1).

Acesso em 03 de Maio de 2012.

VALDERRAMA, P., BRAGA, J. W. B. B., POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v.32. n.5 p.1278-1287, 2009.

VAN HAMME, J. D., SINGH, A., WARD, O. P. Physiological aspects-Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.24, p.604–620, 2006.

VANDERZWAAG, J. C.; BARLETT, K. H.; ATWATER, J. W.; BAKER, D. Evaluation of field testing techniques used in a household water treatment study in Posoltega, Nicaragua. **Water Quality Research Journal of Canada**, v.44. p. 122-131, 2009.

VERMELHO, A. B; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Práticas de Microbiologia. **Guanabara Koogan**, p. 239, Rio de Janeiro, 2006.

ZANAROLLI, G.; TORO, S. D.; TODARO, D.; VARESE, G. C.; BERTOLOTTI, A.; FAVA, F. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. **Microbial Cell Factories** v.9:10, 2010.

ZHANG X.; PETERSON, C. L.; REECE, D.; MÖLLER, G.; HAWS, R.. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Trans. ASAE (Am. Soe. Agric. Eng)** v. 41, p.1423–1430, 1998.

ZHANG, D.; ZHU, L. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. **Environmental Pollution** v.164, p.169-174, 2012.

YANG, Z.; HOLLEBONE, B. P.; WANG, Z.; YANG, C.; LANDRIAULT, M. Effect of storage period on the dominant weathering processes of biodiesel and its blends with diesel in ambient conditions. **Fuel**, v.104, p.342–350, 2013.

YANG, Z.; HOLLEBONE, B. P.; WANG, Z.; YANG, C.; LANDRIAULT, M. Factors affecting oxidation stability of commercially available biodiesel products. **Fuel Processing Technology** v.106 p. 366–375, 2012.

YEMASHOVA, A. N.; MURYGINA, V. P.; ZHUKOV, D. V.; ZAKHARYANTZ, A. A.; GLADCHENKO, M. A.; APPANNA, V.; KALYUZHNYI. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 6, n.4, p 315-337, 2007.

WANG, W.; JENKINS, P.E.; REN, Z. Heterogeneous corrosion behaviour of carbon steel in water contaminated biodiesel. **Corrosion Science** v. 53, p.845–849, 2011.

WHITE, J.; GILBERT, J.; HILL, G.; HILL, E.; HUSE, S. M.; WEIGHTMAN, A. J.; MAHENTHIRALINGAM, E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77 n. 13 p. 4527-4538. 2011.

WINKENS, R.; NELISSEN- ARETS, H.; STOBBERINGH, E. Validity of the urine dipslide under daily practice conditions. **Family Practice**, v. 20, No. 4, 2003.

WIRTANEN, G.; SALO, S. Microbial sampling of surfaces in direct and indirect contact with products processed. In: Detection and identification of harmful microbes. 1<sup>ST</sup>WORKSHOP ARRANGED BY SAFOODNET-FOOD SAFETY AND HYGIENE NETWORKING WITHIN NEW MEMBER STATES AND ASSOCIATED CANDIDATE COUNTRIES; FP6-022808-2006, CZECH REPUBLIC, DECEMBER 10-12, 2007.

WU, J.; GONG, Z.; ZHENG, L.; YI, Y.; JIN, J.; LI, X.; LI, P. Removal of high concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil by biodiesel. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, v.4, p. 387-394, 2010.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Meio de cultura utilizados

#### 9.1.1 PCA (Plate count Agar)

|                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| Caseína enzimática hidrolisada | 6.13 g. L <sup>-1</sup> |
| Extrato de Levedura            | 3.06 g.L <sup>-1</sup>  |
| Dextrose                       | 1.23 g.L <sup>-1</sup>  |
| Agar                           | 30.10 g.L <sup>-1</sup> |

pH Final: 7.0

#### 9.1.2 BDA (Batata dextrose Agar)

|                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| Infusão de batatas | 300.00 g.L <sup>-1</sup> |
| Dextrose           | 20.00 g.L <sup>-1</sup>  |
| Agar               | 15.00 g.L <sup>-1</sup>  |

pH final: 5.6

**9.1.3 Ágar malte**

|                              |                      |
|------------------------------|----------------------|
| Extrato de malte             | 30 g.L <sup>-1</sup> |
| Peptona                      | 5 g.L <sup>-1</sup>  |
| pH = 5,4                     |                      |
| Ágar (depois que medir o pH) | 20 g.L <sup>-1</sup> |

**9.1.4 Ágar nutriente**

|                  |                      |
|------------------|----------------------|
| Extrato de carne | 3 g.L <sup>-1</sup>  |
| Peptona          | 5 g.L <sup>-1</sup>  |
| Ágar             | 15 g.L <sup>-1</sup> |

**9.1.5 Solução salina**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Cloreto de Sódio | 0,85% |
|------------------|-------|

**9.1.6 Meio mineral Bushnell-Hass**

|                                      |                        |
|--------------------------------------|------------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1 g.L <sup>-1</sup>    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1 g.L <sup>-1</sup>    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 1 g.L <sup>-1</sup>    |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,2 g.L <sup>-1</sup>  |
| FeCl <sub>3</sub>                    | 0,05 g.L <sup>-1</sup> |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,02 g.L <sup>-1</sup> |
| pH final = 7,2                       |                        |

## 9.2 Certificados de ensaio

### 9.2.1 Certificado de ensaio de combustível B0:



Número: 0743-12 T

CÓPIA

## CERTIFICADO DE ENSAIO

| Produto: OLEO DIESEL A S50  |         | Código: 65P                                  |           |                    |
|---|---------|--|-----------|--------------------|
| Local de Amostragem: TQ 373506  |         | Laboratório: Transpetro/Lab Rio Grande       |           |                    |
| Data/ hora Amostragem: 02/10/12 11:40   |         | Endereço: 2ª Seção Barra S/N Pier Petroleiro |           |                    |
| Data/ hora Recebimento: 02/10/12 12:00  |         | Rio Grande - RS CEP 96204-020                |           |                    |
|   |         | Telefone: (53)3234-3200 Fax: (53)3234-4215   |           |                    |
| Característica  | Método  | Especificação                                | Resultado | Unidade            |
| COR   | VIS 000 | INAM (1)                                     | INAM      | N/A                |
| COR ASTM  | D 1500  | 3,0 max                                      | L1,0      | N/A                |
| 10% RECUPERADOS   | D 86    | Anotar                                       | 206,8     | grau C             |
| 50% RECUPERADOS   | D 86    | 245,0 a 310,0                                | 264,1     | grau C             |
| 90% RECUPERADOS   | D 86    | 360 max                                      | 339,6     | grau C             |
| MASSA ESPECIFICA A 20 GC  | D 4052  | 820 a 850                                    | 837,1     | kg/m <sup>3</sup>  |
| VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC  | D 445   | 2,0 a 5,0                                    | 2,740     | mm <sup>2</sup> /s |
| AGUA E SEDIMENTOS   | D 2709  | 0,05 max                                     | 0,000     | % volume           |
| AGUA (KARL FISCHER)   | D 6304  | Anotar                                       | 223       | mg/kg              |
| PONTO DE FULGOR   | D 93    | 38,0 min                                     | 69,0      | grau C             |
| ENXOFRE TOTAL   | D 2622  | 50 max                                       | 6,940     | mg/kg              |
| CONDUTIVIDADE ELETRICA  | D 2624  | 25 min (2)                                   | 148       | pS/m               |
| <p><b>Notas:</b></p> <p>- Todos os limites especificados sao valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.</p> <p>(1) Usualmente de Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada.</p> <p>(2) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento do combustível pelo produtor e distribuidor. Para o distribuidor, o controle e o atendimento ao limite especificado serão compulsório a partir de 01.01.2010. Nota de Segurança: Manusear o produto com as devidas normas aplicáveis de segurança.</p> <p>- Reamostragem</p> <p>Análise de Enxofre realizada na REFAP (ASTM D2622)</p> <p>Condutividade Elétrica (ASTM D2624), pS/m @ 25,0 oC = 148,0. Ensaio realizado para atendimento ao ofício 344/2011/SBQ/RJ-ANP de 28/11/2011.</p> <p>Tipo de Amostragem: AMOSTRA CORRIDA</p> <p>Tipo de Operação: Reamostragem</p> |         |  |           |                    |



|   |                |  |
|---|----------------|--|
| Data de Emissão: 02/10/2012 16:58:35  | Página: 1 de 1 | Original Assinado Por:                                   |
| Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada. Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo. |                | Responsável:<br>Raquel Madruga Mesquita<br>CRQ: 05407218 |

### 9.2.2 Certificado de ensaio de combustível B100:

- Determinação de volume de amostra
- Validação de amostra

|   |   |   |
|---|---|---|
|    | <b>CERTIFICADO DA QUALIDADE</b><br>Nº 049.12 – 22/09/12 |  |
| <b>FC-BIO-2C</b>  |   |   |
| Cadastrado na ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis)<br>Cadastro: 017      Processo ANP: 48600.001788/2009-11. |   |   |

| Identificação do Produtor                    |          | Granol Indústria Comércio e Exportação S/A  |                  |                     |                         |
|--|----------|---|------------------|---------------------|-------------------------|
| Produto                                      |          | Éster Metílico de Óleo Misto * (Biodiesel - B100)<br>*78% Óleo de Soja - 20% Sebo Bovino - 2% Gordura Suína |                  |                     |                         |
| Produzido                                    | 28/08/12 | Analisado   | 21/09/2012       |                     |                         |
| Número do Lote                               |          | GC-12-CS-049  |                  |                     |                         |
| Lote estocado no tanque                      |          | 205-2-014   |                  |                     |                         |
| Quantidade de produto no tanque              |          | 2.184.835 L   |                  |                     |                         |
| Numeração dos lacres do tanque               |          | 2084482/9751139/5317735/8640028   |                  |                     |                         |
| Numeração dos lacres das amostras testemunho |          | 1973301/1973341   |                  |                     |                         |
| Característica                               | Unidade  | Método de Ensaio  | Resultado        | ANP 04/2012 Limites | Laboratório             |
| Aspecto a 25°C                               | -        | VISUAL  | LII <sup>2</sup> | LII                 | Granol Cachoeira do Sul |
| Massa Específica a 20°                       | kg/m³    | NBR 7148  | 879              | 850 - 900           | Granol Cachoeira do Sul |
| Viscosidade Cinemática a 40° C               | mm²/s    | NBR 10441   | 4,8              | 3,0 - 6,0           | Granol Cachoeira do Sul |
| Teor de água                                 | mg/kg    | EN ISO 12937  | 256              | Máx. 380            | Granol Anápolis         |
| Contaminação Total                           | mg/kg    | EN 12662  | 9                | Máx. 24             | Granol Cachoeira do Sul |
| Ponto de fulgor                              | °C       | ASTM D93  | 152              | Min. 100            | Granol Cachoeira do Sul |
| Teor de éster                                | % massa  | EN 14103  | 97,9             | Min. 96,5           | Granol Cachoeira do Sul |
| Resíduo de Carbono                           | % massa  | ASTM D4530  | 0,01             | Máx. 0,05           | Granol Anápolis         |
| Cinzas Sulfatadas                            | % massa  | NBR 6294  | < 0,01           | Máx. 0,02           | Granol Cachoeira do Sul |
| Enxofre Total                                | mg/kg    | ASTM D 5453   | 3,6              | Máx. 10             | Granol Anápolis         |
| Sódio e Potássio                             | mg/kg    | NBR 15553   | 3,5              | Máx. 5              | Granol Anápolis         |
| Cálcio e Magnésio                            | mg/kg    | NBR 15553   | 2,1              | Máx. 5              | Granol Anápolis         |
| Fósforo                                      | mg/kg    | NBR 15553   | < 0,01           | Máx. 10             | Granol Anápolis         |
| Corrosividade ao Cobre, 3 h a 50° C          | -        | NBR 14359   | 1                | Máx. 1              | Granol Anápolis         |
| Ponto de entupimento de filtro a frio        | °C       | NBR 14747   | + 1              | *                   | Granol Cachoeira do Sul |
| Índice de acidez                             | mg KOH/g | NBR 14448   | 0,40             | Máx. 0,50           | Granol Cachoeira do Sul |
| Glicerol livre                               | % massa  | EN 14105  | < 0,01           | Máx. 0,02           | Granol Cachoeira do Sul |
| Glicerol total                               | % massa  | EN 14105  | 0,18             | Máx. 0,25           | Granol Cachoeira do Sul |
| Monoacilglicerol                             | % massa  | EN 14105  | 0,64             | Máx. 0,80           | Granol Cachoeira do Sul |
| Diacilglicerol                               | % massa  | EN 14105  | 0,04             | Máx. 0,20           | Granol Cachoeira do Sul |
| Triacilglicerol                              | % massa  | EN 14105  | 0,04             | Máx. 0,20           | Granol Cachoeira do Sul |
| Metanol                                      | % massa  | EN 14110  | 0,05             | Máx. 0,20           | Granol Cachoeira do Sul |
| Índice de Iodo                               | g/100g   | EN 14111  | 111,32           | Anotar              | Granol Cachoeira do Sul |
| Estabilidade à oxidação a 110° C             | h        | EN 14112  | 9,2              | Min. 6              | Granol Cachoeira do Sul |

LII = Limpo e isento de impurezas.

\* Limites conforme tabela II do Regulamento Técnico ANP N° 4/2012.

Ana Beatriz Machado Costa  
CRQ 07100659 - V Região  
Bacharel Química Ambiental



Estrada volta do Charqueada, S/N – Cachoeira do Sul /RS

Fone (051) 3722 - 6550

- Ensaio de monitoramento microbiológico em tanques de 20 L



OLEOPLAN S/A – ÓLEOS VEGETAIS PLANALTO

## CERTIFICADO DE QUALIDADE

PRODUTO: BIODIESEL - B100

FABRICAÇÃO: 23/5/2011

LOTE:353

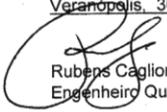
CERTIFICADO Nº: 353

MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS: ÓLEO DE SOJA (75%), GORDURA ANIMAL (25%) E METANOL

DATA DE ENSAIO: 24/05/2011

| Característica                                   | Unidade            | Resultado                        | Especificações                | Métodos     |
|--|--------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------|
| Aspecto/Temperatura lida em °C                   | -                  | Límpido e Isento de Impurezas/20 | Límpido e Isento de Impurezas | Visual      |
| Massa Específica a 20 °C                         | Kg/m <sup>3</sup>  | 879,1                            | 850-900                       | ASTM D 1298 |
| Viscosidade Cinemática a 40°C                    | mm <sup>2</sup> /s | 4,299                            | 3,0-6,0                       | ASTM D 445  |
| Teor de água                                     | mg/kg              | 326                              | 500 (máx.)                    | ASTMD 6304  |
| Contaminação Total                               | mg/kg              | 19,8                             | 24 (máx.)                     | EN 12662    |
| Ponto de Fulgor<br>Vaso fechado Pensky – Martens | °C                 | 132                              | 100,00 (mín.)                 | ASTM D 93   |
| Teor de éster                                    | % massa            | 98,4                             | 96,5 (mín.)                   | EN 14103    |
| Resíduo de Carbono                               | % massa            | 0,02                             | 0,05 (máx.)                   | ASTM D 4530 |
| Cinzas Sulfatadas                                | % massa            | 0,007                            | 0,020 (máx.)                  | ASTM D 874  |
| Enxofre total                                    | mg/kg              | 2,9                              | 50 (máx.)                     | ASTM D 5453 |
| Sódio + Potássio                                 | mg/kg              | 3,3                              | 5(máx.)                       | NBR 15553   |
| Cálcio + Magnésio                                | mg/kg              | 2,6                              | 5 (máx.)                      | NBR 15553   |
| Fósforo  | mg/kg              | 1,7                              | 10 (máx.)                     | NBR 15553   |
| Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C                | -                  | 1                                | 1 (máx.)                      | ASTM D 130  |
| Ponto de entupimento de filtro a frio            | °C                 | 6                                | 19 (máx.)                     | ASTMD 6371  |
| Índice de acidez                                 | mgKOH/g            | 0,4                              | 0,50(máx.)                    | ASTMD 664   |
| Glicerina Livre                                  | % massa            | 0,013                            | 0,02 (máx.)                   | ASTMD 6584  |
| Glicerina total                                  | % massa            | 0,185                            | 0,25 (máx.)                   | ASTM D 6584 |
| Monoglicerol                                     | % massa            | 0,469                            | ANOTAR                        | ASTM D 6584 |
| Diglicerol                                       | % massa            | 0,217                            | ANOTAR                        | ASTM D 6584 |
| Triglicerol                                      | % massa            | 0,172                            | ANOTAR                        | ASTM D 6584 |
| Metanol  | % massa            | 0,06                             | 0,20 (máx.)                   | EN 14112    |
| Estabilidade à oxidação a 110°C                  | h                  | 7,9                              | 6 (mín.)                      | EN 14112    |

Veranópolis, 30 de Maio de 2011.

  
Rubens Cagliani  
Engenheiro Químico – CRQ 05302824

RST 470 – KM 109 – Nº. 3482 – CEP: 95330 – 000 – VERANÓPOLIS – RS  
FONE: (54) 3441 3300 – FAX: (54) 3441 3300  
E-mail: laboratorio\_biodiesel@oleoplanver.com.br, atendimento@oleoplanver.com.br  
Site: www.oleoplanver.com.br

31 MAI 2011

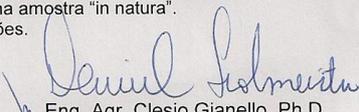
## 9.2.4 Certificado de análise físico-químico da água de lastro:

**LAUDO DE ANÁLISES****NOME:** Profa. Fátima Bento**MUN.:** Porto Alegre**Data de entrada:** 08/12/10**EST.:** RS**Data de expedição:** 20/01/11**Nº DE REG.:** R-389/2010**MATERIAL:** Água retirada do lastro do tanque de estocagem

| Determinações                         | Amostra 01 | Metodologia aplicada / Limite de detecção              |
|---------------------------------------|------------|--|
| N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - mg/L | 192        | destilação, MgO / Titulometria/ 0,1 mg/L               |
| N-NO <sub>3</sub> - mg/L              | < 0,1      | destilação, Liga de Varda / Titulometria/ 0,1 mg/L     |
| Fósforo total - mg/L                  | < 0,01     | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,01 mg/L  |
| Potássio total - mg/L                 | 59         | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,07 mg/L  |
| Cálcio total - mg/L                   | 67         | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,04 mg/L  |
| Magnésio total - mg/L                 | 10         | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,02 mg/L  |
| Enxofre total - mg/L                  | 34         | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 1,0 mg/L   |
| Cobre total - mg/L                    | 0,86       | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,004 mg/L |
| Zinco total - mg/L                    | 483        | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,02 mg/L  |
| Ferro total - mg/L                    | 1454       | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,04 mg/L  |
| Manganês total - mg/L                 | 126        | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,01 mg/L  |
| Sódio total - mg/L                    | 229        | digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP-OES/ 0,1 mg/L   |
| Boro total - mg/L                     | 0,2        | digestão seca/ ICP-OES/ 0,1 mg/L                       |

Obs. 1.: Resultados expressos na amostra "in natura".

Obs. 2.: Média de 2 determinações.



Eng. Agr. Clesio Gianello, Ph.D.  
CREA 8a. Reg. 25.642  
Responsável pelo Laboratório de Análises

### 9.2.5 Coeficiente de variação (RSD) esperado como uma função de Unidade Formadoras de Colônia (UFC) por Placa (USP, 2010).

| Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por Placa | Coeficiente de variação (RSD) esperado |
|--|--|
| 30–300   | <15%                                   |
| 10–30  | <25%                                   |
| <10  | <35%                                   |

## 9.3 Tabelas de Análise de Variância (ANOVA)

### 9.3.1 Estimativa em fase oleosa

a. **Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação             | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (PCA) | 287,0417           | 1   | 287,0417         | 810,4706 | <0,05*  |
| Diluído/Sem diluição          | 8,1667             | 3   | 8,1667           | 23,0588  | <0,05*  |
| Tempo                         | 2,8750             | 3   | 0,9583           | 2,7059   | >0.05   |
| Diluído/Sem diluição*Tempo    | 5,2500             | 3   | 1,7500           | 4,9412   | <0.05*  |
| Erro                          | 5,6667             | 16  | 0,3542           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

b. **Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos no meio de cultivo Agar Ogye.

| Fonte de variação              | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|--------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (Ogye) | 360,3750           | 1   | 360,3750         | 2162,250 | <0,05*  |
| Diluído/Sem diluição           | 15,0417            | 3   | 15,0417          | 90,250   | <0,05*  |
| Tempo                          | 0,4583             | 3   | 0,1528           | 0,917    | >0.05   |
| Diluído/Sem diluição*Tempo     | 6,4583             | 3   | 2,1528           | 12,917   | <0.05*  |
| Erro                           | 2,6667             | 16  | 0,1667           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

c. **Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B100 para estimativa microbiológica por laminocultivos no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação             | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (PCA) | 287,0417           | 1   | 287,0417         | 810,4706 | <0,05*  |
| Diluído/Sem diluição          | 8,1667             | 3   | 8,1667           | 23,0588  | <0,05*  |
| Tempo                         | 2,8750             | 3   | 0,9583           | 2,7059   | >0.05   |
| Diluído/Sem diluição*Tempo    | 5,2500             | 3   | 1,7500           | 4,9412   | <0.05*  |
| Erro                          | 5,6667             | 16  | 0,3542           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

d. **Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B100 para estimativa microbiológica por laminocultivos no meio de cultivo Agar Ogye.

| Fonte de variação              | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F   | Valor p |
|--------------------------------|--------------------|-----|------------------|-----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (Ogye) | 360,3750           | 1   | 360,3750         | 2162, 250 | <0,05*  |
| Diluído/Sem diluição           | 15,0417            | 3   | 15,0417          | 90,250    | <0,05*  |
| Tempo                          | 0,4583             | 3   | 0,1528           | 0,917     | >0.05   |
| Diluído/Sem diluição*Tempo     | 6,4583             | 3   | 2,1528           | 12,917    | <0.05*  |
| Erro                           | 2,6667             | 16  | 0,1667           |           |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

### 9.3.2 Soluções e surfactantes

a. **Tabela.** Análise de variância das soluções diluentes testadas para o crescimento em laminocultivo no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação             | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (PCA) | 256,7604           | 1   | 256, 7604        | 24649,00 | >0,05*  |
| Soluções                      | 10,3229            | 7   | 1,4747           | 141, 57  | >0,05*  |
| Erro                          | 0,1667             | 16  | 0,0104           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

b. **Tabela.** Análise de variância das soluções diluentes testadas para o crescimento em placa no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação     | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F | Valor p |
|-----------------------|--------------------|-----|------------------|---------|---------|
| Placa -UFC.mL-1 (PCA) | 337,5              | 1   | 337,5            | -       | >0,05   |
| Soluções              | 10,5               | 7   | 1,5              | -       | >0,05   |
| Erro                  | 0                  | 16  | 0                |         |         |

**c. Tabela.** Análise de variância das soluções diluentes testadas para o crescimento em laminocultivo no meio de cultivo Agar Ogye.

| Fonte de variação      | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Placa -UFC.mL-1 (Ogye) | 260,7004           | 1   | 260,7004         | 2596,187 | >0,05*  |
| Soluções               | 8,9029             | 7   | 1,2718           | 12,666   | >0,05*  |
| Erro                   | 1,6067             | 16  | 0,1004           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

**e. Tabela.** Análise de variância das soluções diluentes testadas para o crescimento em placa no meio de cultivo BDA.

| Fonte de variação     | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-----------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Placa -UFC.mL-1 (BDA) | 280,0098           | 1   | 280,0098         | 1326,362 | >0,05*  |
| Soluções              | 8,5725             | 7   | 1,2246           | 5,801    | >0,05*  |
| Erro                  | 3,1667             | 15  | 0,2111           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

### 9.3.3 Volume de amostra

**a. Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos em meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação             | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (PCA) | 296,0556           | 1   | 296,0556         | 968,9091 | <0,05*  |
| Volumes                       | 2,2778             | 5   | 0,4556           | 1,4909   | >0,05   |
| Erro                          | 3,667              | 12  | 0,3056           |          |         |

Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

**b. Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B10 para estimativa microbiológica por contagem em placa no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação     | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-----------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Placa -UFC.mL-1 (PCA) | 234,7222           | 1   | 234,7222         | 234,7222 | <0,05*  |
| Volumes               | 58,2778            | 5   | 11,6556          | 11,6556  | <0,05*  |
| Erro                  | 12,0               | 12  | 1,0              |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

- c. **Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B10 para estimativa microbiológica por laminocultivos no meio de cultivo Agar Ogye.

| Fonte de variação              | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|--------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo -UFC.mL-1 (Ogye) | 329,3889           | 1   | 329,3889         | 456,0769 | <0,05*  |
| Volumes                        | 4,4944             | 5   | 0,9889           | 1,3692   | >0,05   |
| Erro                           | 8,6667             | 12  | 0,7222           |          |         |

- d. **Tabela.** Análise de variância dos volumes de amostra de B10 para estimativa microbiológica por contagem em placa no meio de cultivo BDA.

| Fonte de variação     | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-----------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Placa -UFC.mL-1 (BDA) | 227,5556           | 1   | 227,5556         | 273,0667 | <0,05*  |
| Volumes               | 52,4444            | 5   | 10,4889          | 12,5867  | <0,05*  |
| Erro                  | 10,00              | 12  | 0,8333           |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

### 9.3.4 Validação de amostra de B10 com o microrganismo *Candida silvicola*.

- a. **Tabela.** Análise de variância entre a metodologia de referência (IP 385/99) e o método alternativo de laminocultivos para estimativa do microrganismo *Candida silvicola* na amostra de mistura B10.

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Método            | 3,626029           | 1   | 3,626029         | 9,398609 | <0,05*  |
| Amostras          | 202,0323           | 5   | 40,40647         | 104,7329 | >0,05   |
| Erro              | 27,77795           | 72  | 0,385805         |          |         |

\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.

### 9.3.5. Estimativa em fase aquosa e oleosa com adição de biocida

- a. **Tabela.** Análise de variância das condições com e sem inóculo nos tratamentos com concentração de 0, 500 e 100 ppm para os biocidas MBO-50 e MBO-100 em fase aquosa, no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação                        | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|--|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo UFC.mL <sup>-1</sup> (PCA) | 296,8067           | 1   | 296,8067         | 679,7099 | 0       |
| Condição (com ou sem inóculo)            | 1,500              | 1   | 1,500            | 3,4351   | 0,06    |

|                                     |          |     |         |          |        |
|-------------------------------------|----------|-----|---------|----------|--------|
| Biocida/Concentração                | 315,8433 | 4   | 78,9608 | 180,8263 | <0,05* |
| Tempo                               | 12,5433  | 4   | 3,1358  | 7,1813   | <0,05* |
| Condição*Biocida/Concentração       | 7,81667  | 4   | 1,9542  | 4,4752   | <0,05* |
| Condição*Tempo                      | 1,6167   | 4   | 0,4042  | 0,9256   | 0,45   |
| Biocida/Concentração*Tempo          | 33,1400  | 16  | 2,0712  | 4,7433   | <0,05* |
| Condição*Biocida/Concentração*Tempo | 19,5667  | 16  | 1,2229  | 2,8006   | <0,05* |
| Erro                                | 43,667   | 100 | 0,4367  |          |        |

**\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.**

**b. Tabela.** Análise de variância das condições com e sem inóculo nos tratamentos com concentração de 0, 500 e 100 ppm para os biocidas MBO-50 e MBO-100 em **fase aquosa**, no meio de cultivo Agar Ogye.

| Fonte de variação                              | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|--|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivo UFC.mL <sup>-1</sup> (Agar Ogye) | 812,0067           | 1   | 812,0067         | 1581,831 | <0,05*  |
| Condição (com ou sem inóculo)                  | 23,2067            | 1   | 23,2067          | 45,208   | <0,05*  |
| Biocida/Concentração                           | 554,0933           | 4   | 138,5233         | 269,851  | <0,05*  |
| Tempo  | 32,8933            | 4   | 8,2233           | 16,019   | <0,05*  |
| Condição*Biocida/Concentração                  | 26,6267            | 4   | 6,6567           | 12,968   | <0,05*  |
| Condição*Tempo                                 | 30,3600            | 4   | 7,5900           | 14,786   | <0,05*  |
| Biocida/Concentração*Tempo                     | 35,5067            | 16  | 2,2192           | 4,323    | <0,05*  |
| Condição*Biocida/Concentração*Tempo            | 38,9733            | 16  | 2,4358           | 4,745    | <0,05*  |
| Erro   | 51,3333            | 100 | 0,5133           |          |         |

**\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.**

**c. Tabela.** Análise de variância das condições com e sem inóculo nos tratamentos com concentração de 0, 500 e 100 ppm para os biocidas MBO-50 e MBO-100 em **fase aquosa**, no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação                   | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Placa UFC.mL <sup>-1</sup> (PCA)    | 1620,107           | 1   | 1640,107         | 828,3367 | <0,05*  |
| Condição (com ou sem inóculo)       | 49,307             | 1   | 49,307           | 24,9024  | <0,05*  |
| Biocida/Concentração                | 1210,960           | 4   | 302,740          | 1528990  | <0,05*  |
| Tempo                               | 86,827             | 4   | 21,707           | 10,9630  | <0,05*  |
| Condição*Biocida/Concentração       | 108,160            | 4   | 27,040           | 13,6566  | <0,05*  |
| Condição*Tempo                      | 69,093             | 4   | 17,273           | 8,7239   | <0,05*  |
| Biocida/Concentração*Tempo          | 143,440            | 16  | 8,965            | 4,5278   | <0,05*  |
| Condição*Biocida/Concentração*Tempo | 108,107            | 16  | 6,757            | 3,4125   | <0,05*  |

|      |         |     |       |
|------|---------|-----|-------|
| Erro | 198,000 | 100 | 1,980 |
|------|---------|-----|-------|

**\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.**

**d.Tabela.** Análise de variância das condições com e sem inóculo nos tratamentos com concentração de 0, 500 e 100 ppm para os biocidas MBO-50 e MBO-100 em **fase aquosa**, no meio de cultivo BDA.

| Fonte de variação                   | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|-------------------------------------|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Placa UFC.mL <sup>-1</sup> (BDA)    | 1607,207           | 1   | 1607,207         | 1674,174 | <0,05*  |
| Condição (com ou sem inóculo)       | 29,927             | 1   | 29,927           | 31,174   | <0,05*  |
| Biocida/Concentração                | 1202,960           | 4   | 300,740          | 313,271  | <0,05*  |
| Tempo                               | 120,227            | 4   | 30,057           | 31,309   | <0,05*  |
| Condição*Biocida/Concentração       | 122,507            | 4   | 30,627           | 31,903   | <0,05*  |
| Condição*Tempo                      | 98,040             | 4   | 24,510           | 25,531   | <0,05*  |
| Biocida/Concentração*Tempo          | 110,773            | 16  | 6,923            | 7,212    | <0,05*  |
| Condição*Biocida/Concentração*Tempo | 121,360            | 16  | 7,585            | 7,901    | <0,05*  |
| Erro                                | 96,000             | 100 | 0,960            |          |         |

**\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.**

### 9.3.6 Monitoramento tanques de 20L.

**Tabela.** Análise de variância da contagem de células viáveis por laminocultivos durante o monitoramento em tanques piloto em **fase aquosa**, no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação                          | Soma dos quadrados | GDL | Média quadrática | Valor F  | Valor p |
|--|--------------------|-----|------------------|----------|---------|
| Laminocultivos (UFC.mL <sup>-1</sup> (PCA) | 608,2232           | 1   | 608,2232         | 916,4260 | <0,05*  |
| Condição (com ou sem inóculo)              | 139,5089           | 1   | 139,5089         | 210,2018 | <0,05*  |
| Condição (com ou sem aditivo)              | 12,2232            | 1   | 12,2232          | 18,4170  | <0,05*  |
| Tempo                                      | 169,4643           | 6   | 28,2440          | 42,5561  | <0,05*  |
| Condição/Com ou sem aditivo                | 3,9375             | 1   | 3,9375           | 5,9327   | <0,05*  |
| Condição*Tempo                             | 70,1786            | 6   | 11,6964          | 17,6233  | <0,05*  |
| Com ou sem aditivo*Tempo                   | 8,2143             | 6   | 1,3690           | 2,0628   | >0,05*  |
| Condição*Com ou sem aditivo*Tempo          | 15,5000            | 6   | 2,5833           | 3,8924   | <0,05*  |
| Erro                                       | 55,7500            | 84  | 0,6637           |          |         |

**\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.**

**Tabela.** Análise de variância da contagem de células viáveis por laminocultivos durante o monitoramento em tanques piloto em **fase oleosa**, no meio de cultivo PCA.

| Fonte de variação | Soma dos | GDL | Média | Valor F | Valor p |
|-------------------|----------|-----|-------|---------|---------|
|-------------------|----------|-----|-------|---------|---------|

|  | <b>quadrados</b> |    | <b>quadrática</b> |          |        |
|--|------------------|----|-------------------|----------|--------|
| Laminocultivos (UFC.mL <sup>-1</sup> (PCA) | 130,7232         | 1  | 130,7232          | 220,7186 | <0,05* |
| Condição (com ou sem inóculo)              | 0,4375           | 1  | 0,4375            | 0,7387   | >0,05  |
| Condição (com ou sem aditivo)              | 9,7232           | 1  | 9,7232            | 16,4171  | <0,05* |
| Tempo                                      | 204,5893         | 6  | 34,0982           | 57,5729  | <0,05* |
| Condição/Com ou sem aditivo                | 1,0804           | 1  | 1,0804            | 1,8241   | >0,05  |
| Condição*Tempo                             | 11,3750          | 6  | 1,8958            | 3,2010   | <0,05* |
| Com ou sem aditivo*Tempo                   | 17,5893          | 6  | 2,9315            | 4,9497   | <0,05* |
| Condição*Com ou sem aditivo*Tempo          | 11,7321          | 6  | 1,9554            | 3,3015   | <0,05* |
| Erro                                       | 49,7500          | 84 | 0,5923            |          |        |

**\*Estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%.**

## **10. Vitta**

### **10.1 Dados pessoais**

Nome: Cristiane Santos Barbosa

e-mail: [crisbbarbosa@gmail.com](mailto:crisbbarbosa@gmail.com)

### **10.2 Formação acadêmica**

2011-2013 Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

2007-2009 Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura  
Centro Universitário Metodista do IPA, RS, Brasil.

### **10.3 Experiência Profissional**

09/2010 – 03/2011 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bolsista CNPq DTI (Desenvolvimento Tecnológico Industrial)- Modalidade III

01/2010 – 08/2010 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Estágio voluntário

Análise microbiológica de diesel/biodiesel; Isolamento de microrganismos potencialmente degradadores de diesel/biodiesel; Teste de degradação com DCPIP e TTC; Avaliar potencial de biocidas.

10/2008 – 01/2010 Laboratório Andradas Ltda.

Estágio extracurricular durante a graduação

Identificação dos principais procedimentos realizados na unidade; Setor de Bioquímica/Imunologia, Setor de Hematologia e Setor de Bacteriologia/Parasitologia.