

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE  
DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM ÓLEO DIESEL

Fátima Menezes Bento  
Bióloga (UFRGS)

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Outubro, 1994

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

B478i Bento, Fátima Menezes  
Isolamento, caracterização e  
controle de microrganismos pre-  
sentes em óleo diesel / Fátima  
Menezes Bento. - Porto Alegre :  
UFRGS, 1994.  
xiii, 121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Uni-  
versidade Federal do Rio Grande  
do Sul. Programa de Pós-Gradua-  
ção em Agronomia - Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto A  
legre, 1994.

1. Microbiologia: Combustí-  
veis. 2. Microbiologia: Óleo  
diesel. I. Título.

CDD: 576

CDU: 576.8:665.75

Catálogo na publicação: Biblio-  
teca Setorial da Faculdade de  
Agronomia da UFRGS.

16601

16601  
T  
576.165  
B478I

AGR  
1995/170468-4  
1995/06/19

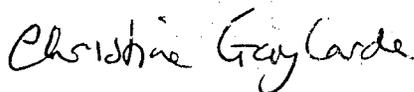
FÁTIMA MENEZES BENTO  
Bióloga (UFRGS)

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
**MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E  
DO AMBIENTE**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 10.10.1994.  
Pela Banca Examinadora

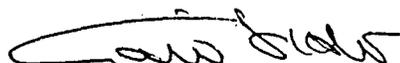


CHRISTINE CLAIRE GAYLARDE  
Orientadora

Homologado em: 10.01.1995.  
Por



HOMERO BERGAMASCHI  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia



CAIO VIDOR



IDUVIRGES LOURDES MULLER



GABRIEL HENRIQUE DA SILVA  
CENPES/PETROBRÁS/RJ



NILTON RODRIGUES PAIM  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

“As hipóteses são redes:  
só quem as lança colhe  
alguma coisa”.

NOVALIS

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelas oportunidades de participar de programas de Iniciação Científica, Aperfeiçoamento e Pós-Graduação ao nível de Mestrado, fundamentais na formação profissional proporcionada.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Faculdade de Agronomia - UFRGS pela oportunidade de investigação na área de Microbiologia do Petróleo.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro durante as etapas da vida acadêmica.

À Professora Christine Gaylarde pela orientação e amizade.

Ao professor João Riboldi e Mônica Cadenazzi pela orientação na análise estatística.

Às empresas ROHM & HAAS, UNION CARBIDE do Brasil e COALITHE CHEMICALS, pelas amostras fornecidas de biocida.

A todos os colegas e professores do Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelo apoio e orientação na condução do trabalho, bem como pela amizade e união característica do grupo.

A meus pais Manoel e Cerenita, Flávia e Tia Ana pelo carinho e incentivo.

A Otacílio Leopoldino de Menezes pelo carinho e incentivo, presentes em minha memória.

A Flávio O. Camargo pelo amor, companheirismo, paciência e incentivo em cada etapa.

## ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE MICROORGANISMOS PRESENTES EM ÓLEO DIESEL<sup>1/</sup>

Autora: Fátima Menezes Bento  
Orientadora: Christine Claire Gaylarde

### RESUMO

A deterioração microbiana de hidrocarbonetos, principalmente em combustíveis destilados, leva à formação de uma biomassa na interface óleo-água em sistemas de armazenagem, causando a obstrução de filtros, mangueiras e tubulações, sólidos suspensos no óleo (atividade biosurfactante) e corrosão dos tanques metálicos. Visando a determinar a população presente no sedimento de tanques armazenadores de óleo diesel (naval, comum e urbano), procedeu-se o isolamento, caracterização, estimativa da população bacteriana pela técnica do número mais provável (NMP) que realiza a estimativa do número de bactérias por ml, assim como a possibilidade de controle com o uso de 4 biocidas. Foram isolados os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Amorphotheca resinae*; 2 isolados identificados como prováveis *Bacillus* e 2 como *Pseudomonas*, detectando-se também a presença de bactérias redutoras de sulfato - BSR. O isolado caracterizado como provável pertencente ao gênero *Pseudomonas* apresentou-se com maior atividade surfactante. A estimativa da população aeróbia foi de 5,4 a 7,0 unidades logarítmicas/ml e da população de BSR foi de 5,4 a 6,4 unidades logarítmicas/ml presentes no sedimento e na fase aquosa. Os biocidas à base de sal quaternário de amônio e de isotiazolona apresentaram atividade superior aos demais biocidas testados (aldeídos).

<sup>1/</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (121p.) Outubro, 1994.

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND CONTROL OF  
MICROORGANISMS PRESENT IN DIESEL FUEL<sup>1/</sup>

Author: Fátima Menezes Bento  
Adviser: Christine Claire Gaylarde

SUMMARY

Microbial deterioration of hydrocarbons, mainly distilled fuels, causes the formation of a biomass at the oil-water interface, leading to the blockage of filters and pipes, the presence of suspended solids in the oil phase (due to biosurfactant activity) and corrosion of the metallic tanks. The isolation, characterization and enumeration by the MPN (Most probable number) technique of the microbial population in the water and sediment phase of tank diesel was carried out with a view to investigating microbial contamination in diesel storage tanks. The anti-microbial activity of 4 biocides against the isolated microorganisms was also tested. Four fungi and 5 bacteria were isolated: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Amorphotheca resinae*; 2 types of *Bacillus*; 2 of *Pseudomonas* and 1 sulphate-reducing bacteria - SRB. One isolate tentatively identified as *Pseudomonas* was shown to be the best biosurfactant producer. The aerobic population was  $10^{5.4} - 10^{7.0}/\text{ml}$  and the anaerobic  $10^{5.4} - 10^{6.4}/\text{ml}$ . The 2 biocides based on a quaternary ammonium salt and an isothiazolone mixture were more active against the isolated microorganisms than the other biocides (aldehydes).

<sup>1/</sup> M.Sc. Dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology. Agronomy Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (121p.) - October, 1994.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO . . . . .	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .	3
2.1. Degradação microbiana de hidrocarbonetos . .	3
2.1.1. Solubilização e absorção de hidrocar- bonetos . . . . .	5
2.1.2. Captação de hidrocarbonetos por sur- factantes . . . . .	6
2.1.2.1. Estrutura dos biossurfactantes.	9
2.1.2.2. Biossíntese dos biossurfactan- tes . . . . .	9
2.1.2.3. Propriedades e aplicação de biossurfactantes . . . . .	11
2.1.2. Oxidação de hidrocarbonetos . . . . .	12
2.1.3. Oxidação de hidrocarbonetos aromáticos	14
2.2. Contaminação microbiana . . . . .	16
2.2.1. Fatores responsáveis pelo processo de contaminação . . . . .	19
2.2.2. Vias de acesso microbiano em sistemas de combustível . . . . .	20
2.2.3. Caracterização de um sistema com com- bustível contaminado . . . . .	20
2.2.3.1. Composição de sedimentos biológicos . . . . .	21
2.2.4. Microrganismos envolvidos na biodete- rioração de combustíveis . . . . .	23
2.2.4.1. Fungos filamentosos . . . . .	23
2.2.4.2. Levéduras . . . . .	25

	Página
2.2.4.3. Bactérias aeróbias . . . . .	25
2.2.4.4. Bactérias anaeróbias . . . . .	29
2.3. Conseqüências do crescimento microbiano em sistemas de armazenamento de combustível . .	30
2.3.1. Corrosão microbiológica . . . . .	32
2.4. Medidas de prevenção da contaminação microbiana . . . . .	33
2.4.1. Prevenção . . . . .	33
2.4.2. Tratamento com biocidas . . . . .	34
2.4.2.1. Modo de ação dos biocidas . .	35
2.5. Especificações do óleo diesel . . . . .	41
2.5.1. Natureza e composição . . . . .	41
2.5.2. Obtenção . . . . .	42
2.5.3. Tipos . . . . .	42
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	45
3.1. Manipulação das amostras . . . . .	45
3.2. Isolamento dos microrganismos . . . . .	45
3.2.1. Filtração . . . . .	45
3.2.2. Plaqueamento do sedimento . . . . .	46
3.2.3. Detecção de bactérias anaeróbias . . .	46
3.3. Purificação dos isolados . . . . .	46
3.4. Manutenção dos isolados . . . . .	47
3.5. Identificação dos isolados . . . . .	47
3.6. Estimativa da população aeróbia e de redutoras de sulfato . . . . .	48
3.6.1. Centrifugação . . . . .	48
3.6.2. Diluição . . . . .	49
3.6.3. Contagem dos microrganismos viáveis .	49
3.7. Avaliação da produção de surfactante . . . . .	50
3.7.1. Preparação do inóculo . . . . .	50
3.7.2. Esterilização do óleo diesel . . . . .	51
3.7.3. Seleção prévia dos isolados bacterianos . . . . .	52

	Página
3.7.3.1. Condições de cultivo . . . . .	52
3.7.3.2. Detecção do biossurfactante . . . . .	52
3.7.4. Isolado DU . . . . .	53
3.7.4.1. Condições analíticas . . . . .	53
3.7.4.2. Determinação quantitativa do açúcar . . . . .	54
3.8. Avaliação dos biocidas . . . . .	54
3.8.1. Concentração mínima inibitória . . . . .	54
3.8.1.1. Preparação do inóculo . . . . .	56
3.8.1.2. Determinação da concentra- ção mínima inibitória . . . . .	56
3.9. Avaliação dos biocidas para <i>Amorphoteca</i> <i>resinae</i> . . . . .	57
3.9.1. Teste em placas . . . . .	57
3.9.2. Cultura líquida . . . . .	58
3.10. Avaliação dos biocidas para bactérias anaeró- bias . . . . .	59
3.11. Avaliação dos biocidas para bactérias aeróbias	59
3.12. Análise estatística . . . . .	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	61
4.1. Avaliação da comunidade microbiana presente no óleo diesel e no sedimento formado na interface óleo-água . . . . .	61
4.1.1. Fungos . . . . .	61
4.1.2. Bactérias aeróbias . . . . .	63
4.1.3. Bactérias anaeróbias . . . . .	64
4.2. Estimativa da população aeróbia e anaeróbia do sedimento biológico de óleo diesel naval, urbano e comum . . . . .	64
4.2.1. Centrifugação . . . . .	64
4.2.2. Diluição do sedimento biológico . . . . .	66
4.3. Detecção do biossurfactante . . . . .	69
4.4. Avaliação dos biocidas . . . . .	72

	Página
4.4.1. Concentração mínima inibitória . . . . .	72
4.5. Avaliação de biocidas para <i>Amorphotheca</i> <i>resinae</i> . . . . .	75
4.6. Avaliação dos biocidas para bactérias reduto- ras de sulfato . . . . .	79
4.7. Avaliação da atividade antibacteriana dos bio- cidas em meio mineral e óleo diesel estéril.	80
4.7.1. Isolado bacteriano DN . . . . .	80
4.7.2. Isolado bacteriano DU . . . . .	82
4.7.3. Isolado bacteriano DC <sub>I</sub> . . . . .	84
4.7.4. Isolado bacteriano DC <sub>II</sub> . . . . .	87
5. CONCLUSÕES . . . . .	100
6. BIBLIOGRAFIA CITADA . . . . .	102
7. APÊNDICES . . . . .	110

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Fungos filamentosos isolados de combustíveis com cadeia de C <sub>9</sub> -C <sub>21</sub> . . . . .	26
2. Bactérias aeróbias e anaeróbias isoladas de combustíveis com cadeia de C <sub>9</sub> -C <sub>21</sub> . . . . .	28
3. Efeito de agentes antimicrobianos nos constituintes celulares (adaptado de Denyer, 1990; Cloete et al., 1992). . . . .	37
4. Composição química, ingredientes ativos e procedência dos quatro biocidas avaliados. . . . .	55
5. Fungos filamentosos isolados em membrana filtrante de amostras de óleo diesel naval, comum e urbano. . . . .	62
6. Caracterização morfológica celular e bioquímica dos isolados bacterianos de óleo diesel (naval, comum e urbano). . . . .	65
7. Produção relativa de biossurfactantes determinada pelo método de emulsão do óleo (xileno) por isolados bacterianos após 48 horas de incubação com óleo diesel estéril (Média de 3 repetições). . . . .	70
8. Determinação da concentração mínima inibitória de 3 biocidas para fungos em caldo de extrato de malte, pH 5,4. . . . .	73
9. Determinação da concentração mínima inibitória de 4 biocidas para bactérias aeróbias e redutoras de sulfato em caldo nutritivo, pH 7,4. . . . .	73
10. Atividade dos biocidas no crescimento de <i>Amorphotheca resinae</i> em placas e cultura líquida. . . . .	76
11. Tempo observado de incubação para detecção do efeito bactericida (tempo de morte, 100% de redução das células) . . . . .	95

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Mecanismo proposto do processo de difusão facilitada para a captação de alcanos e outros hidrocarbonetos insolúveis em água para o interior da célula microbiana. . . . .	7
2. Estrutura de uma molécula surfactante, com suas porções hidrófoba e hidrófila. . . . .	10
3. Rotas metabólicas básicas para a degradação de hidrocarboneto alifático . . . . .	15
4. Rotas metabólicas básicas para a degradação de hidrocarboneto aromático . . . . .	18
5. Presença do lodo biológico na interface óleo diesel/água. . . . .	22
6. Ação do biocida na célula (DENYER, 1990). . . . .	36
7. Frações formadas após a centrifugação do sedimento biológico. . . . .	66
8. Estimativa da população de microrganismos aeróbios e redutoras de sulfato no lodo biológico do óleo diesel (Média de 3 repetições). . . . .	68
9. Atividade biossurfactante pelo isolado DU detectada pelo método de emulsão do xileno e avaliação do consumo de glicose, em diferentes intervalos de tempo. (Média de 3 repetições) . . . . .	72
10. Comportamento do isolado bacteriano (DN) em resposta à adição do biocida Phylatol, durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente. . . . .	81

11. Comportamento do isolado bacteriano DU em resposta à adição dos biocidas Adesol e Phylatol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente. . . . .	83
12. Comportamento do isolado bacteriano (DC <sub>I</sub> ) em resposta à adição do biocida Ucarcide durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	85
13. Comportamento do isolado bacteriano (DC <sub>I</sub> ) em resposta à adição do biocida Kathon durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	86
14. Comportamento do isolado bacteriano DC <sub>I</sub> em resposta à adição do biocida Phylatol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	88
15. Comportamento do isolado bacteriano DC <sub>II</sub> em resposta à adição do biocida Phylatol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	89
16. Comportamento do isolado bacteriano DC <sub>II</sub> em resposta à adição do biocida Adesol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	91
17. Comportamento do isolado bacteriano DC <sub>II</sub> em resposta à adição do biocida Ucarcide durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	92
18. Comportamento do isolado bacteriano DC <sub>II</sub> em resposta à adição do biocida Kathon durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.	94

## 1. INTRODUÇÃO

As refinarias e sistemas de distribuição têm enfrentado problemas com a contaminação microbiana em produtos derivados do petróleo. Mudanças nas práticas utilizadas durante os processos de refino e sistemas de distribuição, bem como o aumento no uso de aditivos proporcionam composições variáveis dos combustíveis que irão refletir na intensidade do desenvolvimento microbiano. Esse desenvolvimento resulta na contaminação do combustível em função da capacidade de alguns microrganismos utilizarem esses produtos como fonte de carbono e energia na presença de pequenas quantidades de água. Os grupos de microrganismos envolvidos no processo de contaminação de combustíveis são os fungos filamentosos, leveduras, bactérias aeróbias e bactérias redutoras de sulfato. Além de promoverem a oxidação de hidrocarbonetos, com produção de metabólitos corrosivos, como ácidos orgânicos e inorgânicos, estes microrganismos produzem mais água aos sistemas. Como consequência do crescimento microbiano, desenvolve-se uma grande biomassa na interface óleo-água em sistemas com combustível, ocorrendo problemas operacionais resultantes do entupimentos de filtros, mangueiras, tubulações, produção de emulsão

(atividade biossurfactante), alteração na qualidade do combustível e corrosão dos tanques metálicos.

Levando-se em consideração os problemas potenciais causados pelo crescimento microbiano em combustíveis armazenados em refinarias e postos de distribuição, desenvolveu-se a presente pesquisa com o objetivo de avaliar os principais contaminantes presentes no lodo formado no fundo dos reservatórios de óleo diesel (naval, comum e urbano). Utilizaram-se técnicas de isolamento e caracterização dos microrganismos contaminantes encontrados. Objetivou-se também quantificar as populações de bactérias aeróbias e anaeróbias com ênfase às redutoras de sulfato, assim como avaliar a produção de biossurfactante pelos isolados bacterianos. Realizou-se também experimentos de controle de crescimento microbiano pelo uso de biocidas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Degradação microbiana de hidrocarbonetos

A contaminação microbiana em combustíveis está relacionada com a disponibilidade de nutrientes e água. Associado a estes fatores está a habilidade com que alguns microrganismos são capazes de utilizar o carbono presente nos hidrocarbonetos como fonte de energia para seu crescimento.

O estudo da utilização de derivados do petróleo pelos microrganismos datam do final do século passado, com o 1º registro para fungos (*Botrytis cinerea*) que cresceram em parafina, um dos constituintes do fracionamento do óleo cru, (MYOSHE, 1895), citado por SCHWARTZ & LEATHEN (1976).

KASERER & SÖHNGEN (1906), citado por VIDELA (1981), registraram a oxidação do metano por uma bactéria, atualmente conhecida como *Pseudomonas methanica*. A oxidação bacteriana também foi evidenciada em gasolina (C<sub>5</sub> - C<sub>9</sub>) e querosene (C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub>) (SÖHNGEN, 1915), citado por VIDELA (1981).

BUSHNELL & HAAS (1941) desenvolveram um meio mineral simples com o objetivo de isolar os microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Esses autores encontraram que o petróleo, o querosene, a gasolina, os óleos minerais e a

parafina podem ser usados como fonte de carbono por diversos microrganismos (DAVIS, 1967).

A biodeterioração é resultante da oxidação de hidrocarbonetos e da presença de metabólitos oriundos do crescimento de microrganismos que causam alterações na composição e qualidade do combustível.

O desenvolvimento microbiano em hidrocarbonetos ( $C_5 - C_{20}$ ) tem contribuído na deterioração, principalmente de óleo diesel ( $C_9 - C_{20}$ ), durante a estocagem em tanques de embarcações (BRUCE, 1982; NEIHOF & MAY, 1983; HETTIGE & SHERIDAN, 1989a; PITCHER, 1989; HAGGETT & MORCHAT, 1992) e em tanques armazenadores (FRANÇA *et al.*, 1992; MAGALHÃES *et al.*, 1992; RODRIGUES, 1992; SOLANA, 1994).

As moléculas de hidrocarbonetos suscetíveis ao ataque microbiano podem estar presentes sob a forma de cadeias alifáticas, aromáticas, longas, curtas, lineares, ou ramificadas, que são modificadas para a obtenção de compostos usados no metabolismo das células (ALSOPP & SEAL, 1986).

A oxidação microbiana desses hidrocarbonetos varia desde simples cadeias alifáticas (metano, n-alcanos, isoalcanos, oleofinas, etc), considerados um grande potencial em termos de substrato (WATKINSON & MORGAN, 1990), até os aromáticos (benzeno, tolueno, naftaleno), dos quais nem todos são completamente oxidados a dióxido de carbono e água (SCHWARTZ & LEATHEN, 1976).

Na realidade, o crescimento microbiano às expensas de moléculas hidrocarbonadas encontra seu maior impedimento

devido ao caráter hidrófobo dessas substâncias.

### 2.1.1. Solubilização e absorção de hidrocarbonetos

A solubilidade dos componentes alifáticos decresce rapidamente com o aumento do peso molecular (WATKINSON & MORGAN, 1990). Como consequência, os microrganismos precisam desenvolver adaptações específicas que os habilitem a utilizar a maioria dos substratos hidrocarbonados.

Existem três rotas possíveis para a absorção de hidrocarbonetos:

- a) absorção de materiais solúveis;
- b) via micro gotículas (quando essas gotículas são muito menores que a célula microbiana) - pseudo-solubilização.
- c) via macrogotícula

O primeiro mecanismo é geralmente descartado, devido à baixa solubilidade dos alcanos (acima de  $C_{12}$ ). Os outros dois mecanismos, provavelmente, podem operar sozinhos ou simultaneamente.

A absorção do hidrocarboneto na forma de gotícula é considerada muito comum e freqüentemente envolve a produção de moléculas biológicas surfactantes. Essas moléculas são agentes emulsificantes que promovem a formação de gotículas do hidrocarboneto, reduzindo a tensão superficial do meio aquoso. Devido à variabilidade no tamanho das gotículas, os microrganismos apresentam uma variedade de adaptações à

captação dos mesmos (WATKINSON & MORGAN, 1990). Essas adaptações têm sido extensivamente demonstradas pelas mudanças na composição lipídica da membrana que ocorre durante o crescimento das células em n-alcenos ( $C_{12}$  -  $C_{20}$ ) (REDDY et al., 1982; FINNERTY & SINGER, 1984; LANG & WAGNER, 1987; WATKINSON & MORGAN, 1990; KOCH et al., 1991; ZHANG & MILLER, 1992).

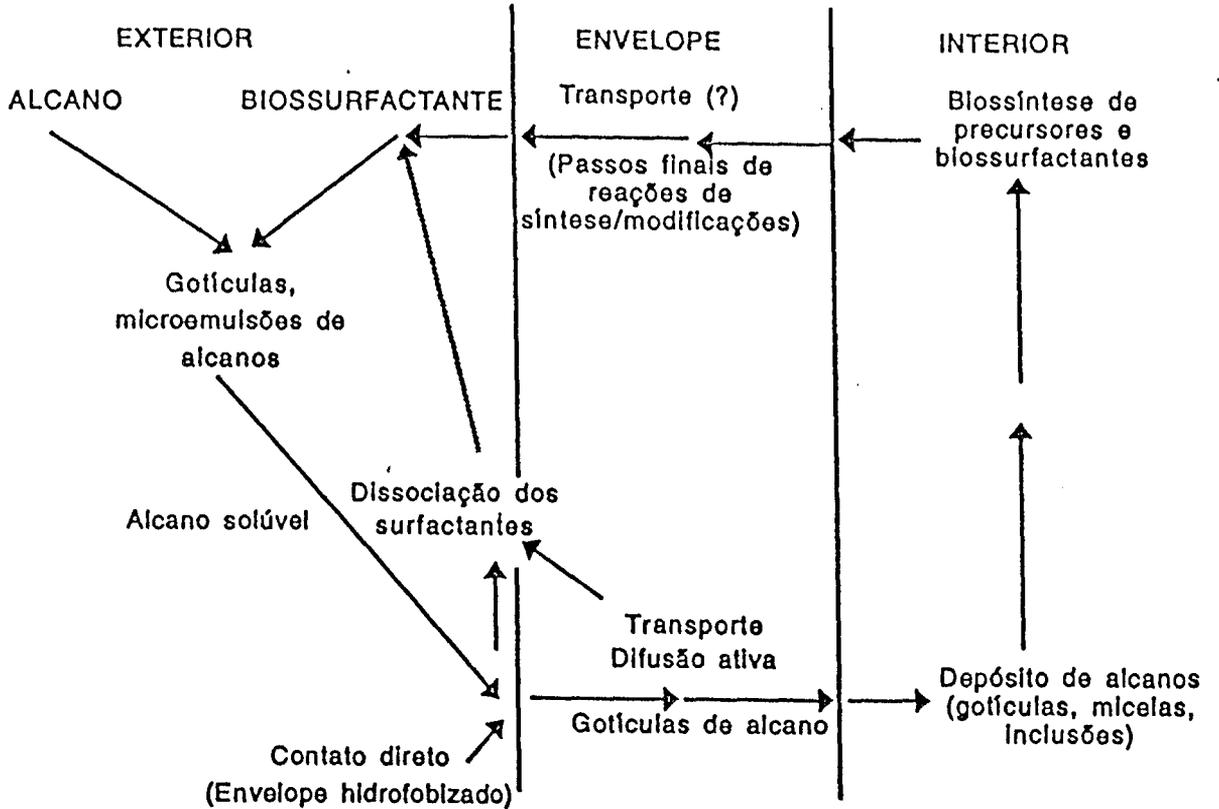
A utilização de alcanos por certos microrganismos demonstram a habilidade de produzirem uma variedade de tipos de moléculas surfactantes intracelulares (FINNERTY & SINGER, 1984).

### 2.1.2. Captação de hidrocarbonetos por surfactantes

O esquema proposto para a captação de hidrocarbonetos tem sido bastante estudado (REDDY et al., 1982; RATLEDGE, 1988; WATKINSON & MORGAN, 1990; RATLEDGE, 1992) (Figura 1).

WITHALT et al. (1990), citados por RATLEDGE (1992), sugeriram que a membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS) encontrado em *Pseudomonas oleovorans* pode ser modificada pela presença de um emulsificante, o qual é liberado gradualmente para fora da célula para formar uma camada monomolecular de LPS emulsificante, envolvendo a gotícula de hidrocarboneto. Dessa forma, não haveria a exigência da biossíntese de qualquer surfactante de baixo peso molecular para aumentar a solubilização do alcano, mas simplesmente evitaria o dispêndio da metabolização celular, de forma a modificar somente um dos seus componentes existentes.

### A - Esquema Geral



### B - Canal Receptor (Captação ao nível molecular)

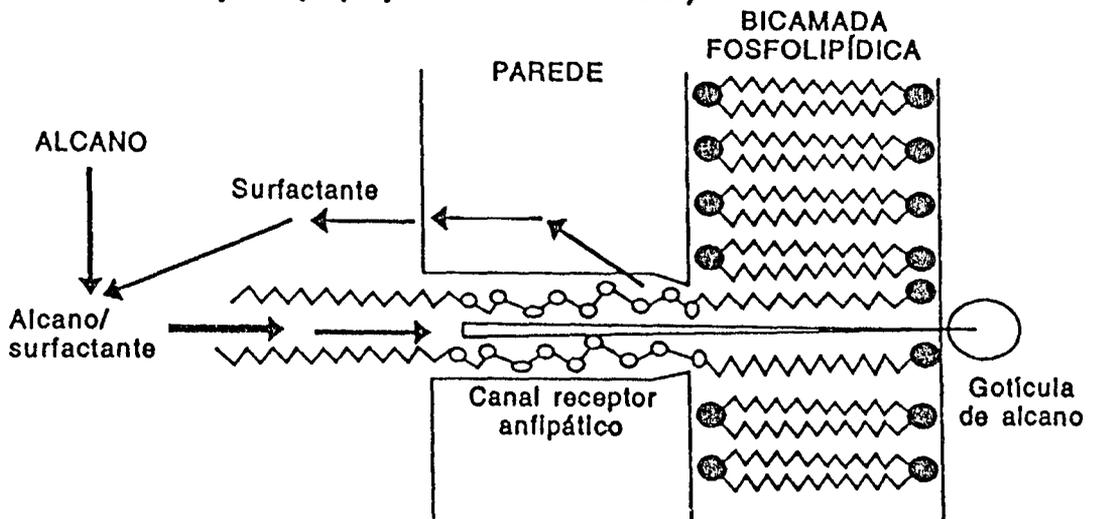


FIGURA 1. Mecanismo proposto para o processo de difusão facilitada na captação de alcanos e outros hidrocarbonetos insolúveis em água para o interior da célula microbiana (RATLEDGE, 1992).

Demonstrou-se em estudo sobre a biodegradação de alcanos que o transporte desse substrato insolúvel poderia ser realizado por encapsulamento desses alcanos ( $C_{18}$  e  $C_{36}$ ) em pequenas vesículas unilamelares (lipossomas). O encapsulamento aumenta com a dispersão aquosa dos alcanos por intercalação do alcano dentro da dupla camada fosfolipídica da vesícula aos quais medem aproximadamente 20 a 50 nm de diâmetro. No entanto, o encapsulamento é facilitado pela liberação dos alcanos para a membrana provida do aparato enzimático bacteriano, ocorrendo a fusão das vesículas com a membrana celular propriamente dita (MILLER e BARTHA, 1989).

Na realidade, esse tipo proposto de captação seria uma forma de pinocitose, enquanto que o processo de difusão facilitada (Figura 1) envolve uma pseudo-solubilização do alcano e de outros hidrocarbonetos insolúveis em água pela presença de um biossurfactante (RATLEDGE, 1988). Nesse caso, a superfície celular mudaria seu caráter hidrófobo, permitindo a entrada de gotículas do alcano emulsificado, com a liberação da molécula surfactante. A assimilação através do envelope celular, provavelmente, ocorreria por difusão passiva ou através de poros criadas por mudanças na estrutura do envelope celular. Essa captação do alcano é normalmente mais rápida. Dessa forma, o excesso de alcano é coalecido em gotículas discretas que se tornam facilmente visíveis dentro da célula. Esse confinamento não evitaria sua subsequente oxidação, mas funcionaria como uma estratégia de reserva da célula (RATLEDGE, 1992).

#### 2.1.2.1. Estrutura dos biossurfactantes

Essas biomoléculas apresentam glicolipídeos de alto e baixo peso molecular, tais como lipopeptídeos, complexos lipopolissacarídeo - proteínas, ácido graxos e polímeros como lipoproteínas, que geralmente são classificados com base no seu tipo de lipídeo (LANG et al., 1983; FINNERTY & SINGER, 1984; ZHANG & MILLER, 1992; WATKINSON & MORGAN, 1990; RATLEDGE, 1992).

Esses biopolímeros apresentam uma porção hidrófila e uma hidrófoba. Na porção hidrófoba, encontram-se porções de lipídeos ligados a um ou mais ácidos graxos (Figura 2), as quais podem ser saturadas ou insaturadas. Na porção polar, a parte solúvel em água do biossurfactante pode ser uma carboxila, uma hidroxila ou uma mistura complexa de fosfato, carboidratos, aminoácidos (COOPER, 1986; LANG & WAGNER, 1987). Muitos dos biossurfactantes podem ser carregadas negativamente ou neutros. Em biossurfactantes aniônicos, a carga é devida ao grupo carboxila, fosfato ou ocasionalmente sulfato. Um pequeno número de biossurfactantes catiônicos apresentam funções aminas.

#### 2.1.2.2. Biossíntese dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono desde substâncias hidrófilas como a glicose até substratos hidrófobos como os hidrocarbonetos (GUERRA SANTOS, 1984; COOPER, 1986; LANG &

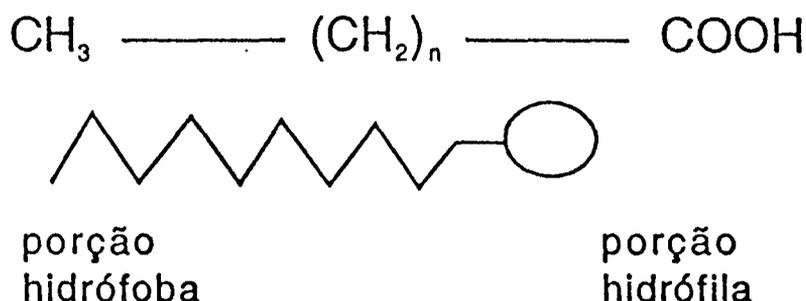


FIGURA 2. Estrutura de uma molécula surfactante com suas porções hidrófoba e hidrófila (COOPER, 1986).

WAGNER, 1987; ROCHA et al., 1992). Neste caso, podemos encontrar dois tipos possíveis de produção: a) quando os surfactantes são extracelulares eles causam emulsificação do hidrocarboneto dentro da célula; b) quando estão associados à parede celular podem facilitar a penetração do hidrocarboneto no espaço periplásmico (KOCH et al., 1991).

Muitos dos surfactantes produzidos por microrganismos degradadores de combustível não são constitutivos, requerendo a presença de alcanos para induzirem sua síntese. A síntese de biosurfactante também pode ser constatada na presença de substratos insolúveis em água como ácidos graxos ou óleos triglicerídeos (RATLEDGE, 1988). A produção de biosurfactantes por microrganismos requer a presença de enzimas induzidas que são sintetizadas apenas quando o microrganismo estiver se desenvolvendo na presença de um

determinado hidrocarboneto. No entanto, WASKO & BRATT (1990) sugerem que o processo pode ser constitutivo e não induzido em função da produção de surfactante por *Ochrobactrum anthropii*, um contaminante de óleo diesel, em meio com glicose e Bushnell-Haas sem a presença de hidrocarboneto.

### 2.1.2.3. Propriedades e aplicações de biossurfactantes

A propriedade conferida a todo o surfactante é sua habilidade em reduzir a tensão superficial de um meio líquido. Por exemplo, a água destilada apresenta uma tensão superficial de 73 dyn/cm. Um surfactante efetivo produzido microbianamente (biossurfactante) pode reduzir este valor para uma taxa menor que 30 dyn/cm (LANG & WAGNER, 1987; ZHANG & MILLER, 1992).

Os biossurfactantes podem ser produzidos em grandes quantidades por microrganismos e dessa forma não necessitam ser dependentes de produtos derivados do petróleo (KOCH et al., 1991). O interesse por surfactantes microbianos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente por seu potencial na recuperação de óleos, redução da viscosidade de óleos crus (emulsificação), na biorremediação e como espumantes pesados, entre outros (FINNERTY & SINGER, 1984; GUERRA SANTOS et al., 1984; COOPER, 1986; KOSARIC et al., 1987):

Os biossurfactantes de origem microbiana têm sido

reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petrolífera e de óleos. É preciso que essas moléculas sejam biodegradáveis, não tóxicas e que possam ser produzidas por fermentação com substratos a baixos custos (BANAT *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1992). Na limpeza de tanques, seu modo de ação é a dispersão de componentes oleosos pesados por meio da redução da viscosidade do resíduo oleoso, formando macro e micro emulsões de óleo na água ou de água no óleo. A emulsão menos viscosa é facilmente bombeada e a fração oleosa pode ser facilmente separada após a quebra da emulsificação.

BANAT *et al.* (1991) produziram biossurfactantes com a estirpe bacteriana denominada PET 1006, crescendo em glicose e hidrocarboneto como fonte de carbono. Desenvolveram uma planta-piloto com uma produção de 2 toneladas de cultura com atividade biossurfactante. O produto foi utilizado como um substituto para o surfactante químico no teste de demonstração de limpeza em um tanque de estocagem de óleo da Companhia de Óleo do Kuwait. A limpeza foi feita sucessivamente removendo o resíduo oleoso do fundo do tanque, e também permitiu a recuperação de mais de 90% de hidrocarboneto aderido ao resíduo oleoso.

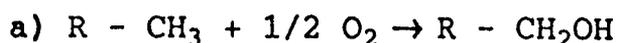
### **2.1.2. Oxidação de hidrocarbonetos**

Várias rotas metabólicas responsáveis pela degradação de grande variedade de hidrocarbonetos têm sido registradas

(DAVIS, 1967; SCHWARTZ & LEATHEN, 1976; WATKINSON & MORGAN, 1990; RATLEDGE, 1992). Muitos hidrocarbonetos que não podem ser utilizados para o crescimento precisam ser oxidados até um co-substrato, o qual funcionaria como um substrato capaz de suportar o crescimento inicial para que ocorra a oxidação completa do hidrocarboneto. Uma característica comum dessas rotas metabólicas é a incorporação inicial do oxigênio no substrato. Geralmente, a degradação só pode ser iniciada, sob condições aeróbias, uma vez que a fonte de oxigênio utilizada é a molecular e o sistema enzimático responsável pela ativação metabólica inicial é chamado oxigenase (SCHWARTZ & LEATHEN, 1976; WATKINSON & MORGAN, 1990).

Existem duas categorias de oxigenases envolvidas no processo. As mono-oxigenases incorporam um átomo de oxigênio dentro de substrato e o outro átomo é reduzido para a água. As dioxigenases catalizam a incorporação de ambos átomos de oxigênio para o substrato. Esquematizando as rotas metabólicas básicas para a degradação de alcanos (grupo estrutural mais biodegradável), tem-se:

1ª - Oxidação terminal: a oxidação inicial de um alcano é feita em um dos grupos metil terminal, ao qual é hidroxilado ao álcool correspondente (álcool primário), via sistema mono-oxigenase:



Reações de hidroxilação desse tipo podem estar ligadas a vários tipos de sistemas carreadores de elétrons ou

cofatores para completar a seqüência de oxidação. Em muitas bactérias (*Pseudomonas putida*), a mono-oxigenase está ligada à rubrodonina e em leveduras (*Candida spp.*) ao citocromo P-450.

A oxidação inicial também pode ser via sistema de dioxigenases que parece menos comum. Nesse sistema, os alcanos são transformados no hidroperóxido correspondente e, subseqüentemente, reduzido ao álcool correspondente.

2º - Oxidação subterminal: As oxidações subterminais de alcanos resultam em álcool secundário, sendo de rara ocorrência. Apesar de uma variedade de bactérias e fungos, utilizar preferencialmente a via de oxidação terminal de hidrocarbonetos com cadeia C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>, algumas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Bacillus spp.* utilizam a via oxidação subterminal (REHM & REIFF, 1982, citado por WATKINSON & MORGAN, 1990).

b) Oxidação do álcool a aldeído.

c) Oxidação do aldeído a ácido gráreo

d) Oxidação do ácido gráreo via  $\beta$ -oxidação

3º - Oxidação diterminal ( $\omega$ -oxidação): Ocasionalmente ambos grupos metil terminal são oxidados, resultando na formação de um ácido dicarboxílico, sendo degradados via  $\beta$ -oxidação (WATKINSON & MORGAN, 1990) (Figura 3).

### 2.1.3. Oxidação de hidrocarbonetos aromáticos

O passo inicial do catabolismo microbiano envolve a modificação do hidrocarboneto aromático pela oxidação a

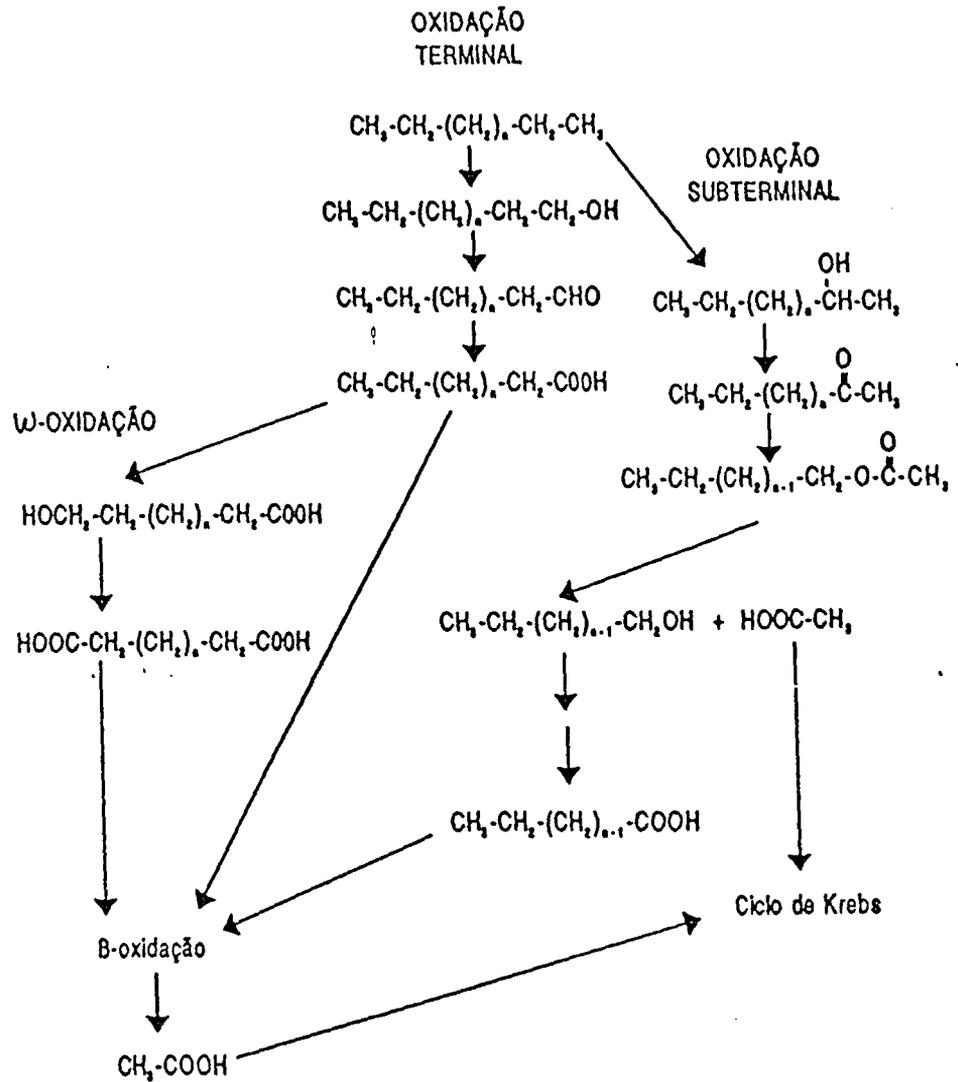


FIGURA 3. Rotas metabólicas básicas para a degradação de hidrocarboneto alifático (WATKINSON & MORGAN, 1990).

compostos dihidroxilados, como o catecol, como um primeiro passo à fissão do anel e assimilação dos produtos via ciclo de Krebs.

O processo metabólico segue uma seqüência de reações e produtos intermediários que apresentam variações quanto à complexidade do hidrocarboneto aromático. Porém, de um modo geral, segue as seguintes etapas:

a) o hidrocarboneto é oxidado a cis-dihidrodiol por um sistema multienzimático DIOXIGENASE, em que os dois átomos de oxigênios são incorporados ao núcleo aromático.

b) cis-dihidrodiol é desidrogenado por ação da enzima cis-dihidrodiol desidrogenase, com a formação de catecóis que atuam como substrato para o rompimento enzimático dos anéis aromáticos.

c) o catecol pode ser oxidado pela via orto, em que há o rompimento da ligação entre os átomos de carbono de dois grupos OH para formar o ácido cis-mucônico, ou pela via meta, em que há a clivagem da ligação entre um átomo de carbono adjacente com o grupo COOH, formando 2-hidroxi-mucônico semialdeído.

d) os produtos das vias orto e meta são metabolizados a produtos intermediários do ciclo de Krebs (SCHWARTZ & LEATHEN, 1976; HARAYAMA & TIMMIS, 1979; MICHAEL *et al.*, 1988) (Figura 4).

## 2.2. Contaminação microbiana

A contaminação microbiana de hidrocarbonetos, tem se

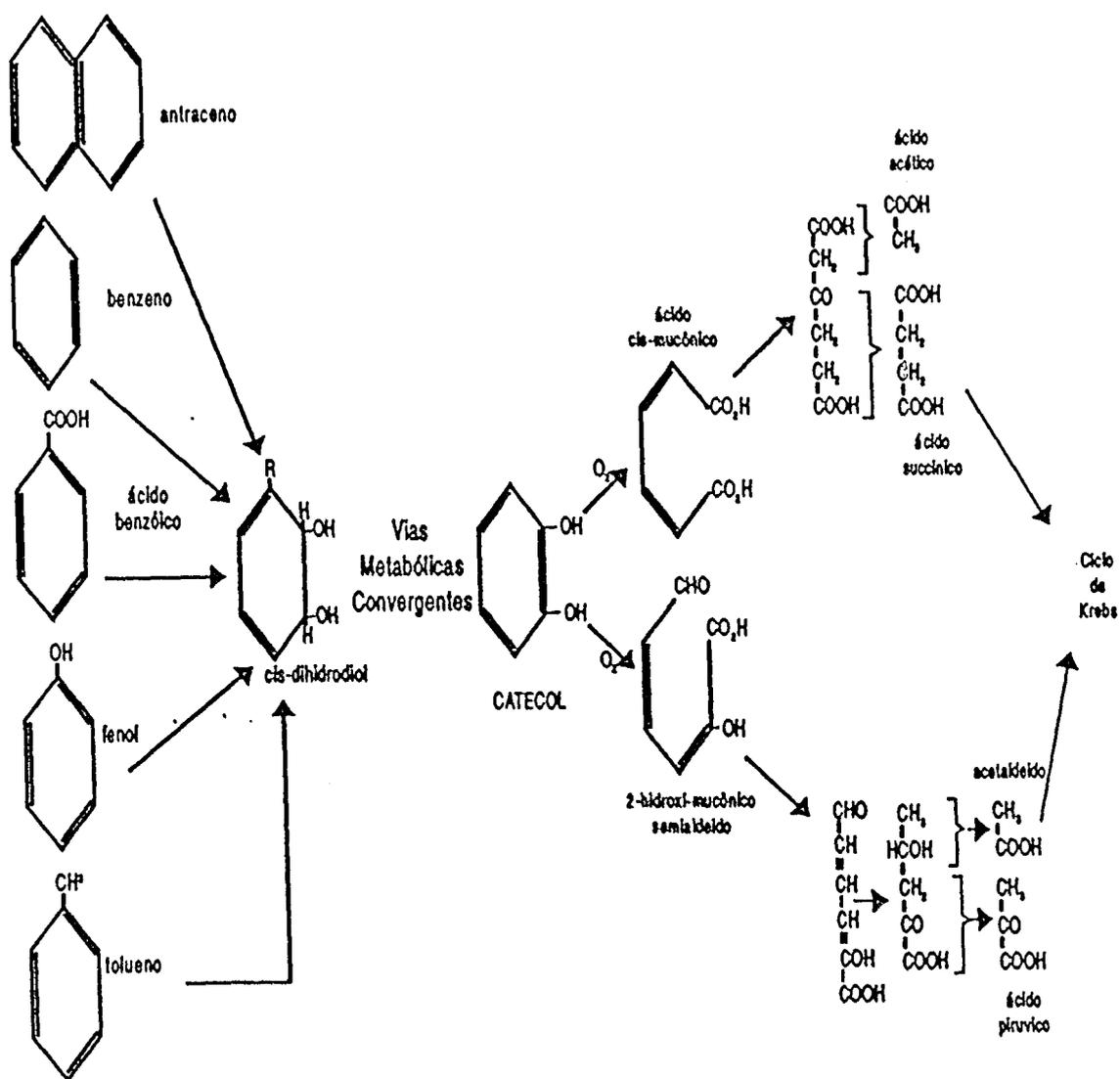


FIGURA 4. Rotas metabólicas básicas para a degradação de hidrocarboneto aromático (adaptado de SCHWARTZ & LEATHEN, 1976; HARAYAMA & TIMMIS, 1979).

manifestado significativamente na indústria de petróleo com efeito considerável sobre sistemas de estocagem de combustíveis em refinarias e distribuidoras (PITCHER, 1989; HILL & HILL, 1993). Essa contaminação tem sido amplamente registrada desde os anos 50. Um dos primeiros trabalhos realizados sobre a natureza microbiana dos resíduos em lodos dos tanques de armazenagem de combustível em aeronaves foi realizado por BAKANAUKAS em 1958, com amostras providas de reservatórios localizados em diferentes bases da Força Aérea dos Estados Unidos. A análise dos sedimentos mostrou que continham fundamentalmente microrganismos, resíduos metabólicos e substâncias surfactantes (DAVIS, 1967; WILLIAMS *et al.*, 1981; VIDELA, 1981).

Os sistemas mais documentados pela literatura referem-se à contaminação em aeronaves, onde os problemas de desenvolvimento microbiano são mais preocupantes, pelos riscos que apresentam. A obstrução das linhas de combustível e filtros pode levar a um mau funcionamento da aeronave (McKENZIE *et al.*, 1977; CABRAL, 1980; WILLIAMS & LUGG, 1980; SMITH & CROOK, 1980). A contaminação microbiana em tanques do armazenamento de combustível na indústria naval tem sido estudado, especialmente quanto à composição do material particulado que bloqueia o sistema de filtragem e estocagem em navios (BRUCE, 1982; NEIHOF & MAY, 1983; ANDRYKOVITCH & NEIHOF, 1987; HETTIGE & SHERIDAN, 1989a; HETTIGE & SHERIDAN, 1989b; HAGGETT & MORCHAT, 1992).

### 2.2.1. Fatores responsáveis pelo processo de contaminação

A colonização desse microecossistema por parte de microrganismos deve-se a vários fatores, bem como a combinação desses.

**1º - Presença de água:** um aspecto fundamental para o desenvolvimento dos microrganismos é a presença de quantidades variáveis de água que acompanham o combustível. Um filme fino de água ou alguns microlitros de água acumulados nas microcavidades do metal, bem como a água condensada, podem ser o suficiente para iniciar o crescimento dos microrganismos. A água também torna-se disponível através do metabolismo microbiano, após o início do crescimento (OKPOKWASILI & OKORIE, 1990). Na ausência de água, o microrganismo pode sobreviver mas não se desenvolver até encontrar condições de temperatura, umidade e nutrição adequadas.

Embora o combustível saia da refinaria sob rigorosas condições de controle, é realmente difícil prevenir ou eliminar a incorporação de pequenas quantidades de água no trajeto entre a refinaria e os postos de distribuição (DAVIS, 1967; VIDELA, 1981).

**2º - Alteração das técnicas de manejo do combustível,** que vão desde os processos de refino ao armazenamento na refinaria, e no sistema de distribuição, alterando a fonte e a qualidade do combustível (HILL, 1987; PITCHER, 1989).

**3º - Aumento no uso de aditivos,** aos quais podem

tornar disponível muitos micronutrientes limitantes para o crescimento microbiano. Os nutrientes minerais podem invadir os sistemas com combustíveis através das partículas de poeira que penetram nos tanques pela ação do vento; entrada eventual de insetos ou outros animais pequenos que ficam aderidos ao combustível. Com a morte desses organismos, ocorre a liberação de nutrientes. O combustível pode conter inibidores de corrosão que podem atuar como fonte de nutrientes ou de água. A própria água apresenta sais inorgânicos em solução (HILL, 1987; PITCHER, 1989; SMITH, 1991).

Como resultado global da intervenção e ou combinação desses fatores citados, muitos combustíveis podem ser utilizados como substratos pelos microrganismos.

#### **2.2.2. Vias de acesso microbiano em sistemas com combustível**

A colonização pode ocorrer por contaminação do ar, através do combustível que retorna ao tanque ou ainda através da água que entra no tanque (formas analisadas anteriormente).

#### **2.2.3. Caracterização de um sistema com combustível contaminado**

O sistema de armazenagem de combustíveis apresenta-se com 3 fases distintas que se formam dentro de um reservatório: a fase oleosa, a fase aquosa e a interface óleo-água. A fase oleosa corresponde à camada superior do tanque que

normalmente contém grande quantidade de água - cerca de 10 ppm (ALSOPP & SEAL, 1986); podendo haver crescimento, principalmente de bactérias (WILLIAMS & LUGG, 1980). A água presente no sistema se depositará na região inferior do tanque. O melhor indicador do grau de contaminação do tanque é a inspeção da interface óleo-água, pois o crescimento e desenvolvimento microbiano se concentrará nessa região (Figura 5).

#### 2.2.3.1. Composição de sedimentos biológicos

Os microrganismos normalmente encontram-se agregados na interface óleo-água, formando uma biomassa que apresenta como consequência da alta atividade microbiana, a formação de sólidos visíveis. Os microrganismos comumente isolados e caracterizados de sistemas com combustíveis são os fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Condições de anaerobiose são criadas dentro de alguns pontos da biomassa microbiana formada, permitindo o aparecimento de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato.

A avaliação do sedimento biológico realizada por vários autores permitiu concluir que esse lodo é formado pela combinação de material celular vivo (esporos; fragmentos de hifas e bactérias) e morto, substâncias orgânicas (por exemplo: ácidos orgânicos, produzidos por fungos) e inorgânicas ( $H_2S$ , produzido por bactérias redutoras de sulfato) resultantes do metabolismo microbiano, material membranoso, agentes emulsificantes (atividade biossurfactante),



FIGURA 5. Presença do lodo biológico na interface óleo diesel/água.

água, areia e alguns metais (ELPHICK & HUNTER, 1968; SMITH & CROOK, 1980; WILLIAM *et al.*, 1981; BRUCE, 1982; NEIHOF & MAY, 1983; SMITH, 1988; SHENNAN, 1988; HETTIGE & SHERIDAN, 1989a,b; PITCHER, 1989; SMITH, 1991; HAGGETT & MORCHAT, 1992; HILL & HILL, 1993). Portanto, a composição do lodo biológico está relacionada em parte com o tipo de combustível utilizado (óleo diesel, gasolina, querosene); com o sistema avaliado (tanque de aeronave, de embarcações, de armazenagem) e com condições de temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes. A interação desses fatores é responsável pela colonização e desenvolvimento de uma determinada população microbiana.

As espécies de fungos e bactérias presentes na maioria dos depósitos de armazenagem de combustíveis, de aeronaves, também encontradas no lodo ou resíduos dos tanques de estocagem em refinarias, ocorrem naturalmente no ar, no solo e na água (SMITH, 1991).

#### **2.2.4. Microrganismos envolvidos na biodeterioração de combustíveis**

Os grupos de microrganismos isolados e identificados dos sistemas com combustíveis são os fungos filamentosos, as leveduras e as bactérias aeróbias e anaeróbias.

##### **2.2.4.1. Fungos filamentosos**

O fungo mais freqüentemente encontrado e conhecido como o mais clássico contaminante e deteriogênico de óleos

combustíveis ( $C_9 - C_{21}$ ) é o *Amorphotheca resinæ*, também chamado de *Hormoconis resinæ*. Em uma inspeção conduzida durante os anos de 1982-83 em tanques de estocagem de navios da Nova Zelândia, foram isolados os fungos: *Amorphotheca resinæ*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium corylophyllum*, sendo classificados como organismos capazes de alta atividade e bom crescimento em combustíveis. Embora o *Amorphotheca resinæ* tenha sido considerado como o mais problemático contaminante em combustível de aeronaves (GUTHEIL, 1966; VIDELA, 1981) e óleo diesel (HENDEY, 1964), estudos de crescimento em laboratório indicaram que *Paecilomyces varioti* e *Penicillium corylophyllum* poderiam apresentar crescimento micelial similar ao *Amorphotheca resinæ* na interface combustível - água (HETTIGE & SHERIDAN, 1989b). Esses fungos também foram considerados com efeito deteriogênico no óleo diesel.

O *Amorphotheca resinæ* produz uma lama filamentosa preta na interface óleo-água e um filme escurecido viscoso nas paredes dos tanques de estocagem, ao qual geralmente ocasionam a corrosão do metal, devido a sua produção metabólica de ácidos orgânicos. Além disso, ocorre a formação de uma grande biomassa desenvolvida na interface óleo-água resultante de esporos e fragmentos de hifas (ELPHICK & HUNTER, 1968; SMITH, 1991). A agitação do combustível dentro do tanque promove o aumento dos pontos de infecção, pois permite que fragmentos de hifas se dispersem por todo o sistema com combustível (SMITH & CROOK, 1983).

Os principais fungos filamentosos considerados como contaminantes de combustíveis podem ser classificados conforme a habilidade de crescerem em hidrocarbonetos de tamanho de cadeias diferentes, tais como o querosene (C<sub>10</sub> - C<sub>18</sub>) e óleo diesel (C<sub>9</sub> - C<sub>20</sub>) (Tabela 1).

#### 2.2.4.2. Leveduras

Algumas espécies de leveduras apresentam habilidades de crescer em meio com hidrocarbonetos como fonte de carbono. Entre os gêneros já descritos incluem-se: *Rhodotorula*; *Criptotococus*; *Candida*; *Sporobolomyces* e *Hansenula* sp. (BRUCE, 1982; NEIHOF & MAY, 1983; WATKINSON & MORGAN, 1990; SMITH, 1991; HAGGETT & MORCHAT, 1992).

#### 2.2.4.3. Bactérias aeróbias

A deterioração em sistemas com combustíveis também tem sido atribuída à atividade de certas bactérias pela formação de material membranoso. Esse material pode ser um polissacarídeo ou lipopolissacarídeo, cuja função é reduzir a tensão superficial e permitir a emulsificação do combustível na fase aquosa. Forma uma película na interface óleo-água, e pode acumular-se, formando então, uma densa camada. Trata-se de um material membranoso fortemente lipofílico, podendo ficar em suspensão no combustível, além de ser altamente hidratado, e gerar mais água ao sistema (WILLIAMS & LUGG, 1980; WILLIAMS et al., 1981; SMITH, 1988).

TABELA 1. Fungos filamentosos isolados de combustíveis com cadeia de C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub>.

Fungos.	Referência
<i>Amorphotheca resinae</i>	Hendey, 1964; Smith & Crook, 1981; Bruce, 1982; Gardner & Williams, 1982; Neihof & May, 1983; Smith, 1988; Pitcher, 1989; Hettige & Sheridan, 1989; Smith, 1991; Hill & Hill, 1993; Solana, 1994
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Smith & Maw, 1987; Solana, 1994
<i>Aspergillus flavus</i>	Solana, 1994
<i>Aspergillus niger</i>	Pitcher, 1989; Solana, 1994
<i>Fusarium moniliforme</i>	Videla, 1981; Neihof & May, 1983; Pitcher, 1989
<i>Paecilomyces variotti</i>	Neihof & May, 1983; Hettige & Sheridan, 1989; Solana, 1994
<i>Paecilomyces niveus</i>	França et al., 1992
<i>Alternaria alternata</i>	Solana, 1994
<i>Penicillium corylophyllum</i>	Hettige & Sheridan, 1989

As bactérias podem apresentar um papel determinante na contaminação de sistemas com combustível. O alto número desses organismos encontrados em tanques com óleo diesel sugere que possa tratar-se dos primeiros colonizadores desse ecossistema (BRUCE, 1982).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados sobre a degradação metabólica de hidrocarbonetos por diversas espécies de bactérias, sendo que a maioria refere-se ao gênero *Pseudomonas* (WILLIAMS et al., 1981; GARDNER & WILLIAMS, 1982; HARAYAMA & TIMMIS, 1989; KOCH et al., 1991). CRONEY & KULA (1970), citados por VIDELA (1981), encontraram 33 isolados bacterianos de sistemas com combustíveis, onde somente três estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de apresentar um bom crescimento e um longo tempo de sobrevivência (maior que 1 mês) na fase aquosa (Tabela 2).

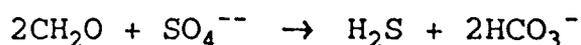
Por apresentarem importante papel na formação da biomassa na interface óleo-água em sistemas com combustível, vários autores investigaram a ação deteriogênica das bactérias, especialmente com relação à produção de agentes emulsificantes. Estudos relacionados com a produção, isolamento, estrutura e propriedades de biossurfactantes bacterianos que crescem às expensas de hidrocarbonetos têm amplamente divulgados (REILING et al., 1986; LANG & WAGNER, 1987; SMITH, 1988; BRYANT, 1990; BANAT et al., 1991; KOCH et al., 1991; ROCHA et al., 1992).

TABELA 2. Bactérias aeróbias e anaeróbias isoladas de combustíveis com cadeia de C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub>.

Bactérias	Referência
<i>Achromobacter</i>	França et al., 1992
<i>Acinetobacter</i>	França et al., 1992
<i>Alcaligenes</i>	França et al., 1992; Smith, 1991
<i>Bacillus</i>	Pitcher, 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Videla, 1981; Pitcher, 1989; França et al., 1992
<i>Pseudomonas putida</i>	Williams et al., 1981
BSR - bactérias redutoras de sulfato	Davis, 1967; Bruce, 1982; Neihof & May, 1983; Pitcher, 1989; Smith, 1991; França et al., 1992; Hill & Hill, 1993.

#### 2.2.4.4. Bactérias anaeróbias

As condições de anaerobiose que se formam no lodo biológico, na interface óleo-água, proporcionam o ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato (BSR). Esse grupo especializado de anaeróbias caracteriza-se por participar do processo de respiração denominado "redução desassimilatória do sulfato", em que o íon sulfato atua como receptor de elétrons, em lugar do oxigênio (POSTGATE, 1984). A equação equivalente ao processo pode ser esquematizada da forma descrita abaixo.



Todo o sulfato reduzido é liberado na forma de sulfeto e pode ser convertido a  $\text{H}_2\text{S}$  ou  $\text{HS}^-$ .

Esses microrganismos podem ser definidos com um grupo morfológica e nutricionalmente diverso. Estritamente anaeróbias, são inibidas por traços de oxigênio, utilizando o sulfato (ou outro composto sulfuroso oxidado), como acceptor de elétrons para a metabolização de componentes orgânicos (GIBSON, 1990). Dentro do grupo de bactérias relacionadas com o enxofre temos as bactérias oxidantes (aeróbias) e as redutoras (anaeróbias). Segundo POSTGATE (1984), as bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrio desulfuricans*) são consideradas ambientalmente importantes pelo seu papel ecológico no ciclo do enxofre. Provavelmente, o aspecto mais significativo do seu metabolismo refere-se à produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , um forte agente redutor, capaz de inibir o crescimento de determinados microrganismos aeróbios. A área de tecnologia de

petróleo tem apresentado bastante interesse nesse grupo de microrganismo principalmente devido a produção do  $H_2S$ , considerado um metabólito potencialmente corrosivo (GIBSON, 1990; EDYVEAN, 1991) para as paredes dos tanques metálicos, além de conferir alteração no índice de corrosividade do combustível (DAVIS, 1967; PITCHER, 1989; MAGALHÃES *et al.* 1992; FURTADO, 1992).

Das diversas espécies microbianas presentes no combustível, nem todas são capazes de ocasionar danos posteriores. Em parte, isso está relacionado com a capacidade da espécie em utilizar os hidrocarbonetos componentes dos combustíveis, os aditivos orgânicos, os componentes dos resíduos ou os materiais hidrosolúveis (VIDELA, 1981).

### 2.3. Conseqüências do crescimento microbiano em sistemas de armazenamento de combustível

A biomassa microbiana formada na interface óleo-água causam problemas típicos em sistemas com combustíveis (WILLIAMS & LUGG, 1980; SMITH & CROOK, 1980; HILL, 1987; SHENNAN, 1988; SMITH, 1988; SMITH, 1991; HILL & HILL, 1993) como:

- obstrução de tubulações, válvulas, filtros e mangueiras;
- aumento do conteúdo de água;
- produtos poliméricos extracelulares resultantes da atividade bacteriana que se incorporam à biomassa interfacial do sistema;

- produção de biossurfactante, causando a emulsão do hidrocarboneto na água, e migração da biomassa microbiana para a fase oleosa;

- escurecimento da água presente no fundo dos tanques armazenadores por precipitação do sulfeto de ferro, resultante da atividade de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato;

- instalação do processo de corrosão microbiológica devido a: a) produção de metabólitos corrosivos (ácidos e sulfetos); b) degradação de inibidores de corrosão; c) degradação de camadas protetoras, como poliuretano e poliesteruretano; d) formação de biofilmes (incrustações microbiana) de oxidação não estáveis sobre metais como aço e alumínio.

- alterações nas propriedades químicas (degradação das cadeias hidrocarbônicas) e físicas (deterioração, pela produção de sólidos suspensos) e alteração na qualidade do combustível.

Na maioria dos casos, esses problemas somente são estudados quando começam a ocorrer danos nos equipamentos (HILL, 1987). Atualmente, a indústria do petróleo tem se preocupado com o aspecto da manutenção dos equipamentos, tubulações, tanques de armazenagem e, nesse setor, os problemas de corrosão microbiológica se mostram cruciais.

As medidas tomadas pela desativação e recuperação de tanques armazenadores danificados pela corrosão tornam-se cada vez mais dispendiosos para as refinarias, sistemas de

distribuição e estocagem de combustíveis.

### 2.3.1. Corrosão microbiológica

O processo de corrosão microbiológica conhecido também como corrosão induzida microbiologicamente envolve a participação de microrganismos através de seus metabólitos, os quais podem ter natureza química diversa como ácidos, sulfetos, etc.; ou através da formação de pilhas de aeração diferencial, devido ao consumo desigual de oxigênio em zonas localizadas (VIDELA, 1981).

Na indústria do petróleo, o processo de corrosão microbiológica ocorre principalmente em superfícies de aço, ferro e alumínio. O sistema de armazenagem de combustível (paredes de tanques, tubulações) tornou-se o sistema mais suscetível à instalação do processo corrosivo induzido microbiologicamente, devido à contaminação microbiana em produtos derivados do petróleo (DAVIS, 1967; BRYANT et al., 1991; FURTADO, 1992; MAGALHÃES et al., 1992; DO VALLE & VIDELA, 1992).

Os microrganismos comumente envolvidos no processo de corrosão microbiológica são os fungos filamentosos, como *Amorphotheca resiniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp. e *Trichosporon* sp. (MCKENZIE et al., 1977; IVERSON, 1987; DO VALLE & VIDELA, 1992). O grande crescimento microbiano na interface óleo/água promove condições de anaerobiose necessárias para a proliferação de bactérias redutoras de sulfato do gênero *Desulfovibrio*

(SMITH, 1991). Em sistemas com combustível, essas bactérias vivem consorciadas, principalmente com *Amorphotheca resiniae* e bactérias aeróbias do gênero *Pseudomonas* (VIDELA, 1981).

## 2.4. Medidas de prevenção e tratamento da contaminação microbiana

### 2.4.1. Prevenção

O sistema de estocagem de combustíveis apresenta duas fases distintas - a fase aquosa e a fase oleosa - que devem ser monitoradas separadamente, como medidas de prevenção da contaminação.

Freqüentemente, procedimentos de drenagem da fase aquosa são citados como uma eficiente medida preventiva (PITCHER, 1989; HETTIGE & SHERIDAN, 1989b; HILL & HILL, 1993). No entanto, algumas instalações apresentam um formato de tanque que torna impossível a drenagem em alguns pontos (HETTIGE & SHERIDAN, 1989b; PITCHER, 1989). Nesses casos, são utilizados desinfetantes adicionados diretamente na água acumulada no fundo dos tanques (SMITH, 1991).

A infecção microbiana pode 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. Dessa forma, também não deve se realizar a transferência de combustível para um tanque que tenha sido anteriormente estocado com combustível contaminado (HILL & HILL, 1993).

Uma efetiva manutenção das técnicas de limpeza e

drenagens regulares minimizam a entrada de água e constituem uma forma estratégica de controle da infecção microbiana. Uma forma complementar de controle seria o monitoramento microbiológico para a determinação de esporos e células viáveis presentes no sistema com combústível (fase oleosa e fase aquosa).

Uma maneira de refrear a ação corrosiva das bactérias anaeróbias consiste em modificar as características do meio, tornando-o inadequado ao desenvolvimento das mesmas. Através de: 1. remoção de metabólitos essenciais à bactéria (por exemplo eliminação das fontes de enxofre). 2. o pH tem limites mais ou menos precisos para o desenvolvimento ótimo de cada espécie bacteriana. Geralmente com pH inferior a 5 pode inibir o crescimento das bactérias redutoras de sulfato (VIDELA, 1981).

#### 2.4.2. Tratamento com biocidas

A aplicação de agentes antimicrobianos para reduzir ou eliminar o desenvolvimento de contaminantes microbianos tem sido proposta como um dos métodos de controle químico mais eficiente na biodeterioração de combustíveis (SMITH & CROOK, 1980; ANDRYKOVITCH & NEIHOF, 1987; SHENAN, 1988; HETTIGE & SHERIDAN, 1989; PITCHER, 1989; ROSSMOORE, 1990; ROSSMOORE & ROSSMOORE, 1991; HAGGETT & MORCHAT, 1992; SANDOSSI *et al.*, 1993).

Os biocidas compreendem um grupo com largo espectro de produtos de estruturas químicas diversas, cujo objetivo é

prevenir a contaminação microbiológica e a deterioração de produtos (DENYER, 1990; ANTUNES *et al.*, 1992). Os agentes antibacterianos podem exercer efeito bacteriostático ou bactericida, dependendo da concentração utilizada. Os mecanismos que estão envolvidos nesses efeitos podem não ser necessariamente os mesmos. Os eventos bacteriostáticos podem ser consideradas geralmente como o resultado de algumas formas de inibição metabólica, que podem ser controladas pela remoção do biocida, enquanto que a ação bactericida é causada por danos irreparáveis ou irreversíveis à estrutura vital ou funcional da célula (DENYER, 1990).

Os estágios de interação biocida-célula podem ser esquematizadas conforme a Figura 6.

#### **2.4.2.1. Modo de ação dos biocidas**

Os biocidas agem sobre as funções celulares submetendo a célula a um estresse, tanto no estágio bacteriostático como bactericida (CLOETE *et al.*, 1992).

A região de ataque dos agentes antimicrobianos, inicialmente, é a estrutura da parede celular, e posteriormente a membrana plasmática e citoplasma. A interação com a membrana plasmática provoca mudanças fundamentais em sua estrutura e função, repercutindo em um desequilíbrio na bioquímica celular. Funções como respiração (inibição da cadeia respiratória), processos de transporte celular e reservas intracelulares tornam-se comprometidas (DENYER, 1990; CLOETE *et al.*, 1992; SANDIN, 1993) (Tabela 3).

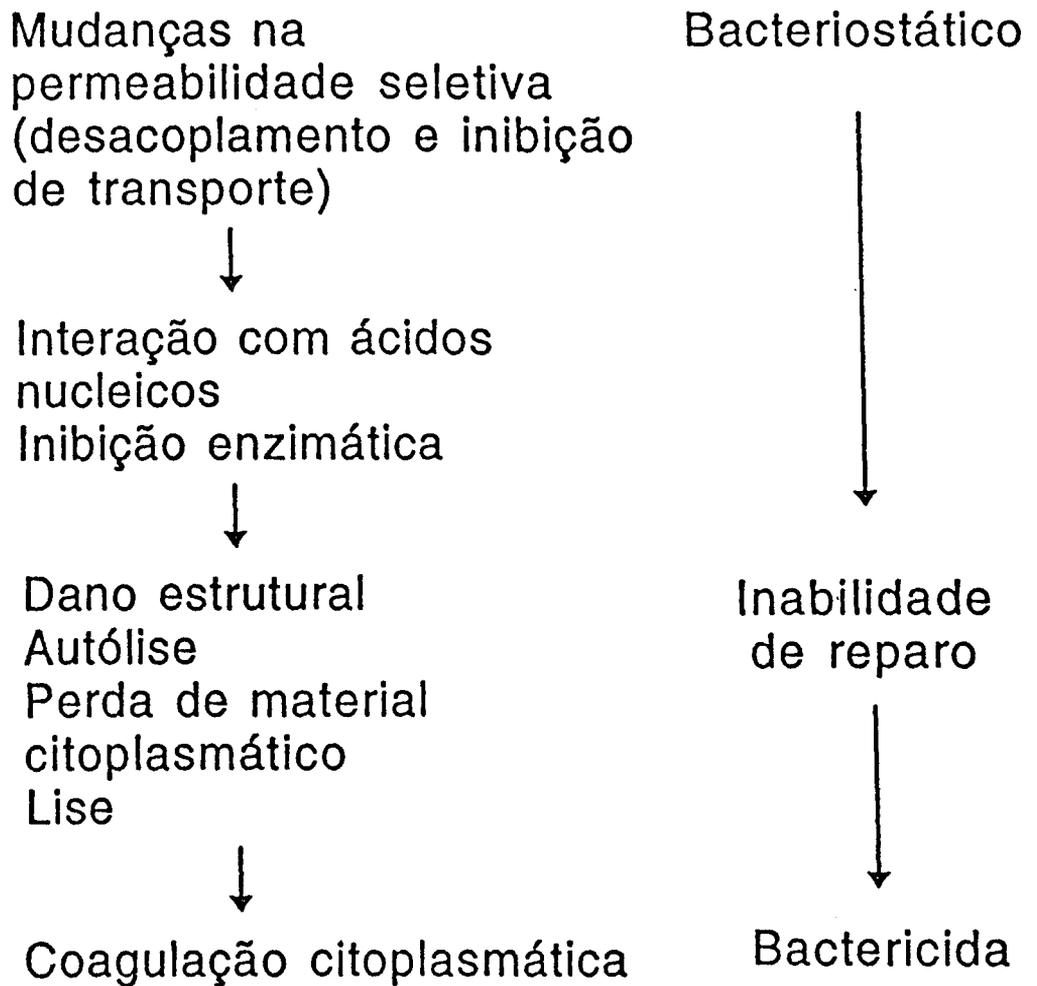


FIGURA 6. Ação do biocida na célula (DENYER, 1990).

TABELA 3. Efeito de alguns agentes antimicrobianos nos constituintes celulares (adaptado de Denyer, 1990; Cloete *et al.*, 1992).

Região atacada	Conseqüência	Biocida
Parede celular	Formação anormal da parede e início de autólise	Fenol Hipoclorito de sódio Formaldeído Mercuriais
Membrana	Perda da organização estrutural e integridade	Compostos quaternários de Amônio Chlorhexidine Fenoxietanol
	Inibição das enzimas associadas à membrana, com inibição da cadeia respiratória e transferência de energia, da oxidação de substrato e de processos de transporte	Tetrachloro Salicilanilide
Citoplasma	Precipitação e coagulação dos constituintes citoplasmáticos	Biguanides Compostos quaternários de amônio Gluteraldeído
	Formação de disulfetos por ação da oxidação dos grupos tiol das proteínas de membrana	Bronopol Isotiazolonas Peróxido do hidrogênio

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos, formaldeído, gluteraldeído, compostos quartenários de amônio, basicamente, é atribuída ao seu efeito sobre a permeabilidade celular. Estas substâncias danificam a permeabilidade seletiva da membrana, permitindo o vazamento de constituintes celulares, além de comprometer o funcionamento de diversas enzimas (PELCZAR, 1981).

Biocidas que em sua composição liberam formaldeído (PHYLATOL) atacam os constituintes do envelope celular, reagindo especificamente com proteínas (ligação com o grupo (S-H) tiol da cisteína) e lipopolissacarídeos, formando compostos tóxicos para o citoplasma (SANDIN, 1983). O  $\text{Cu}^{+2}$  é conhecido por reagir com os grupos tiol livres na célula. Vários estudos mostram o sinergismo do  $\text{Cu}^{+2}$  e formaldeído (ROOSMORE & SONDOSSI, 1988; ROOSMORE, 1990; RIHA et al.; 1990; SONDOSSI et al., 1993).

O gluteraldeído (UCARCIDE) também deriva sua ação antimicrobiana da penetração na parede celular. Porém, reagem com os grupos amino da lisina, inibindo a captação de precursores metabólicos (SANDIN, 1993).

A maior parte dos detergentes catiônicos germicidas são sais quaternários de amônio (ADESOL). Seu modo de ação compreende vários mecanismos; inicialmente alteração da permeabilidade celular, inibição enzimática, desnaturação protéica e lesão da membrana plasmática com vazamento dos constituintes celulares. O poder bactericida dos compostos quaternários é excepcionalmente elevado contra organismos

gram-negativos, revelando-se também com ação fungicida. As propriedades combinadas de ação germicida, poder detergente, acrescidas de outras vantagens como, toxicidade relativamente baixa, solubilidade, ausência do poder corrosivo e estabilidade resultaram em muitas aplicações práticas desses compostos quaternários de amônio no saneamento e desinfecção (PELCZAR, 1981).

As isotiazolonas (KATHON) constituem um grupo de agentes antimicrobianos de considerável aceitação no cenário mundial pela sua alta atividade (amplo-espectro de ação) e baixa toxidez (HETTIGE & SHERIDAN, 1989b; PAGE & GAYLARDE, 1990; ROSSMOORE, 1991; HILL & HILL, 1992; HAGGETT & MORCHAT, 1992; ANTUNES *et al.*, 1992; SONDOSSI *et al.*, 1993).

O modo de ação de biocidas a base de isotiazolonas, envolve a oxidação do grupo (S-H) tiol da cisteína e glutadiona. Esse grupo é oxidado a dissulfito, resultando no caso da cisteína, em uma alteração na conformação e funcionalidade das proteínas da membrana (SANDIN, 1993; BRÓZEL & CLOETE, 1994).

Vários biocidas para sistemas de combustível, comercialmente disponíveis, têm sido citados na literatura (SMITH & CROOK, 1983; HILL, 1987; ANDRYKOVITCH & NEIHOF, 1987; SHENAN, 1988; PITCHER, 1989).

A combinação de agentes antimicrobianos no controle da contaminação microbiana parece ser uma medida bastante eficaz. Essas composições sinérgicas apresentam como vantagem aumentar o espectro antimicrobiano, minimizar as

incompatibilidades físico-químicas e minimizar a toxicidade (devido à redução de dosagem) (PARR, 1990; ANTUNES et al., 1992; SONDOSSI et al., 1993).

A maioria das investigações com biocidas para sistemas com combustível refere-se à avaliação da atividade antifúngica (SMITH & CROOK, 1983; ANDRYKOVITCH & NEIHOF, 1987; HETTIGE & SHERIDAN, 1989b; HAGGETT & MORCHAT, 1992). No entanto, apenas o conhecimento da atividade fungicida não é aceitável como critério utilizado para a efetividade de um biocida de sistemas com combustível. A atividade antimicrobiana com leveduras, bactérias aeróbias e bactérias redutoras de sulfato é igualmente importante (SMITH, 1991).

Uma consideração importante a cerca da escolha de um biocida, refere-se à fase do sistema óleo-água que se deseja tratar: se a fase aquosa, a fase oleosa ou ambas (PITCHER, 1989). Existem vantagens e desvantagens no tratamento da fase aquosa ou oleosa, mas para um tempo longo de proteção, um biocida que possa atingir todo o sistema parece ser a solução ideal.

Os critérios de seleção para biocidas em sistemas com combustível devem ser considerados para uma efetiva preservação e controle da biodeterioração. Um biocida dito "ideal" deve cumprir as seguintes exigências (VIDELA, 1981; SHENAN, 1988; PITCHER, 1989; PARR, 1990):

1. apresentar um bom coeficiente de partição entre a fase aquosa e o combustível.

2. um largo espectro de atividade com o uso a baixas concentrações.
3. não ser corrosivo.
4. ser efetivo a níveis (dosagem) que não comprometam o custo final.
5. ser efetivo por largo período de tempo.
6. apresentar baixa toxicidade para segurança dos operadores e do ambiente.
7. capacidade para manter sua ação inibitória frente a outras substâncias presentes no meio em condições similares de temperatura e pH, não devendo desenvolver tolerância por parte dos microrganismos.
8. não afetar as propriedades de combustão do combustível.

## **2.5. Especificações do óleo diesel**

### **2.5.1. Natureza e composição**

Os combustíveis normalmente utilizados nos motores diesel são constituídos de mistura de hidrocarbonetos, com uma faixa de pontos de ebulição variando aproximadamente entre 170°C e 370°C, o que corresponde aos destilados intermediários do petróleo (CAMPOS et al., 1974).

A composição química é muito variável no que diz respeito à distribuição desses hidrocarbonetos que podem ser classificados em 4 tipos: parafinas, olefinas, naftênicos e aromáticos. A predominância de um ou outro tipo depende do petróleo que deu origem ao combustível e do processamento e tratamento que ele sofreu na refinaria. O peso molecular

médio é também variável, mas geralmente, o óleo diesel apresenta hidrocarbonetos variando de 9 a 20 átomos de carbono. A distribuição dos hidrocarbonetos dessas 4 categorias é muito importante porque as propriedades do combustível serão em função dela. Assim, a relação carbono/hidrogênio, tão importante na combustão, é variável, sendo maior nos hidrocarbonetos aromáticos e menor nas parafínicos. Propriedades como a densidade, faixa de destilação, poder calórico, viscosidade, ponto de fluído e número de cetano variam com a distribuição dos diversos hidrocarbonetos (CAMPOS *et al.*, 1974).

### 2.5.2. Obtenção

O combustível diesel é obtido por destilação direta do petróleo na operação de topeamento. A fração corresponde a um produto mais pesado do que o querosene e mais leve do que o gasóleo pesado. Hoje, com o desenvolvimento de vários processos de craqueamento, o combustível diesel pode conter quantidades variáveis de destilados craqueados selecionados que contribuem para aumentar a disponibilidade do produto no mercado (CAMPOS *et al.*, 1974).

### 2.5.3. Tipos

No Brasil, é produzido apenas um tipo de óleo diesel, caracterizado pela Resolução 07/80 do Conselho Nacional de Petróleo.

A ASTM na norma padronizada ASMT D 975 classifica

três tipos de óleo diesel, nos graus nº 1-D, nº 2-D e nº 4-D. Os 2 primeiros são destinados para motores diesel de alta velocidade, motores estacionários de velocidade média e motores de locomotivas. O tipo nº 4-D é mais viscoso ou mesmo uma mistura de destilado com um óleo residual e destinado para motores de baixa ou média velocidade, operando com velocidade constante sob carga uniforme. Os combustíveis analisados referem-se ao diesel comum, urbano e naval, respectivamente. Na realidade, as diferenças observadas entre os óleos diz respeito a diferenças quanto as suas especificações. Vários testes são realizados nos combustíveis para atender as especificações necessárias, destacando-se:

\* Ponto de fulgor: é a temperatura mais baixa em que o combustível se vaporiza em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar ao ser passada um chama.

\* Corrosividade: os combustíveis devem ser isentos de ação corrosiva, uma vez que em seus diversos usos eles estão em contato com superfícies metálicas. O método usado nestes testes baseia-se na verificação qualitativa de enxofre livre, compostos agressivos do enxofre e ácidos livres, que são os maiores causadores de ataques aos metais em tanques com óleo diesel (CAMPOS et al., 1974).

São realizados ainda ensaios quanto à destilação, cor, água e sedimentos, cinzas e ponto de fuligem, entre outros.

As diferenças apresentadas pelos 3 tipos de óleos,

utilizados nestes trabalho, quanto às suas especificações são as seguintes:

- Óleo Diesel Naval: atinge o ponto de fulgor em um tempo máximo de 60 minutos.
- Óleo Diesel Comum: teor de enxofre de 1% máximo.
- Óleo Diesel Urbano: teor de enxofre de 0,5% máximo.

Os métodos de avaliação usados para estes testes, bem como os valores aceitos para a liberação do produto no mercado, encontram-se no Apêndice 1.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Manipulação das amostras

Foram coletadas amostras de óleo diesel (naval, comum e urbano) e amostras com óleo, água e sedimento do lastro de tanques de armazenagem (tanques de óleo diesel naval, comum e urbano). As amostras foram acondicionadas em garrafas de vidro esterilizadas com capacidade de 1 litro. Após a chegada ao laboratório, foram imediatamente armazenadas em geladeira a 4°C.

O recipiente que continha a amostra permitiu uma reprodução do sistema característico da interface óleo-água dos tanques de estocagem de óleo diesel (Figura 5).

#### 3.2. Isolamento dos microrganismos

##### 3.2.1. Filtração

O óleo diesel foi filtrado em bomba de vácuo, utilizando funis Gallenpac, através de membranas filtrantes previamente esterilizadas com 0,45 µm de poros (Millipore Corporation). Após a filtração, essas membranas foram transferidas para placas de petri com ágar-malte (pH 5,4) (Apêndice 1) e ágar nutritivo (pH 7,4) (Apêndice 3) com auxílio de pinça esterilizada. As placas foram incubadas à

28°C, a fim de proporcionar o desenvolvimento dos microrganismos retidos na membrana.

### **3.2.2. Plaqueamento do sedimento**

Com o auxílio de uma alça de vidro esterilizada, amostras do sedimento foram riscadas em placas de petri com meios de cultura ágar-malte e ágar-nutritivo. Este procedimento foi realizado como uma forma adicional de isolamento dos microrganismos presentes na borra.

### **3.2.3. Detecção de bactérias anaeróbias**

As bactérias anaeróbias redutoras de sulfato foram detectadas mediante a colocação de aproximadamente 0,5 ml de borra em meio específico, denominado Meio Postgate B (POSTGATE, 1984) (Apêndice 5), em frascos hermeticamente fechados, para a manutenção das condições de anaerobiose. A incubação foi conduzida a 30°C por 72 horas aproximadamente. A atividade da bactéria redutora de sulfato foi estimada através da rapidez com que o meio escureceu, resultado da reação microbiológica do sulfeto com o ferro, um precipitado preto. As amostras que apresentaram organismos ativos, produziram o escurecimento do meio em cerca de 2 a 3 dias.

### **3.3. Purificação dos isolados**

Colônias de bactérias e de fungos foram selecionadas com o objetivo de purificá-las, em meios apropriados, para posterior identificação.

### 3.4. Manutenção dos isolados

A manutenção dos microrganismos foi realizada em tubos inclinados, com ágar-extrato de malte para fungos; e ágar-nutritivo para bactérias aeróbias, mantidos em refrigeração à 4°C. As culturas foram transferidas para tubos novos a cada 14 dias. As bactérias redutoras de sulfato foram mantidas em frascos fechados, com meio POSTGATE B, à temperatura ambiente, sendo transferidas para frascos novos a cada 30 dias.

### 3.5. Identificação dos isolados

A identificação dos fungos após a purificação foi realizada com base nas estruturas morfológicas usuais, com o auxílio de chaves sistemáticas (ONIONS *et al.*, 1981; ATTILI *et al.*, 1993).

Os isolados bacterianos aeróbios obtidos após a purificação, seguindo a técnica de esgotamento em placa, foram caracterizados quanto à morfologia colonial, após 24 horas da inoculação em placas, de acordo com a terminologia empregada por CONN *et al.* (1957). Para a avaliação da morfologia celular foram realizadas observações microscópicas em esfregaços com coloração de Gram, bem como o exame a fresco em microscópio de contraste de fase, para a verificação da motilidade.

Os isolados obtidos foram submetidos a testes bioquímicos, visando à sua classificação provável ao nível de gênero, segundo SEELEY & VANDEMAR, 1965; SIROCKIN &

CULLIMORE, 1969; OXOID, 1981; CAPPUCINO & SHERMAN, 1983. Realizaram-se os testes de anaerobiose, formação de endosporos, catalase, oxidase, fermentação de sacarose, glicose e lactose.

### 3.6. Estimativa da população aeróbia e de redutoras de sulfato

Para se estimar os microrganismos presentes nas amostras de borra procedeu-se a metodologia descrita por NEIHOF & MAY (1983), utilizando os dispersantes TWEEN 80 e TRITON-X-100 em substituição aos utilizados no método original e o método do NMP (Número Mais Provável) COLLINS & LYNE (1985).

#### 3.6.1. Centrifugação

A separação por centrifugação possibilita fracionar e purificar as fases aquosa e oleosa e estimar o volume da densidade das partículas presentes.

Amostras de borra com aproximadamente 10 ml foram centrifugadas em 19.656 g por 15 minutos. A análise do tubo da centrífuga permitiu a detecção de frações compostas por sedimento, água e óleo. A camada de óleo foi descartada com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada, sendo então a água homogeneizada com o restante do sedimento.

### 3.6.2. Diluição

As diluições dessas amostras foram feitas partindo-se de 1 ml do homogeneizado colocadas em 9 ml de diluente. Neste momento, foi avaliada a eficiência de dois detergentes biológicos, o TWEEN 80<sup>o</sup> (éster do ácido oléico, surfactante lipoidal) e o TRITON-X-100 (éter polyoxietileno, surfactante não iônico), ambos na concentração de 0,5%.

Após a agitação dos tubos em VORTEX por 30 segundos, procedeu-se a transferência de 1 ml da suspensão para tubos previamente preparados com 9 ml do diluente e homogeneizado. Esta operação foi repetida até a obtenção da diluição de 10<sup>-6</sup>.

### 3.6.3. Contagem dos microrganismos viáveis

A técnica utilizada tanto para bactérias aeróbias como para anaeróbias foi a do NMP - Número Mais Provável. O método do NMP é também conhecido como método das diluições, onde se realiza uma estimativa, sem qualquer contagem direta, da densidade do organismo em um líquido.

A estimativa da densidade é baseada na aplicação da teoria das probabilidades, com o objetivo de avaliar os números baixos de microrganismos. Atualmente, esse método tem sido muito usado para a enumeração de bactérias redutoras de sulfato, sem a necessidade de técnicas anaeróbias (GAYLARDE, 1990; RICHARDSON *et al.*, 1990; BRYANT *et al.*, 1991; FRANÇA *et al.*, 1992).

Os meios de cultura foram preparados com caldo nutritivo em tubos de ensaio para bactérias aeróbias e meio

Postgate B em frascos para bactérias redutoras de sulfato, com três repetições para cada diluição.

Os tubos e frascos foram divididos em 3 grupos (A, B, C). O grupo A recebeu em cada uma das 3 repetições 1 ml; o grupo B recebeu 0,1 ml (100  $\mu$ l) e o grupo C recebeu 0,01 ml (10  $\mu$ l). Foram incubadas a 37°C por 3 dias. Meios que formaram precipitado preto (FeS) para BRS e turvas para bactérias aeróbias foram considerados resultados positivos. Em função do número de resultados positivos dos 3 grupos (A, B, C) recorre-se a uma tabela onde se encontra o fator pelo qual se deve multiplicar a diluição na qual se obteve turbidez como estimativa do número mais provável de organismos por ml.

Foram preparadas 3 diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) para ser avaliado o comportamento dispersante dos detergentes utilizados, TWEEN 80 (0,5%) e o TRITON-X-100 (0,5%), bem como a faixa de diluição em que se pode encontrar organismos aeróbios e anaeróbios viáveis no sedimento.

Este procedimento foi realizado com os sedimentos dos 3 tipos de óleo diesel estudados (diesel naval, comum e urbano).

### **3.7. Avaliação da produção de surfactante**

#### **3.7.1. Preparação do inóculo**

Estoques de bactérias isoladas mantidos em geladeira foram repassadas com auxílio de uma alça de platina para placas com ágar-nutritivo, seguindo a técnica de esgotamento de placa. Após o crescimento, colônias isoladas com o auxílio

de uma alça de platina foram colocadas em tubos contendo 10 ml de caldo nutritivo por 12 horas em agitador orbital TECNAL (mod TE 140) à 180 rpm num ângulo de inclinação de aproximadamente 30°C e incubados à 26-28°C.

A contagem de células viáveis por ml foi calculada através do plaqueamento pelo sistema spiral-plater (Spiral Systems mod D). Este sistema permite a distribuição de um volume fixo (50  $\mu$ l) da amostra sobre uma placa, de forma a depositar diferentes volumes do centro a lateral, formando uma espiral.

Após a incubação, as colônias foram contadas sobre uma grade que relaciona a área da placa com seu volume correspondente, estimando-se o número de microrganismos presentes.

### 3.7.2. Esterilização do óleo diesel

O óleo diesel utilizado foi submetido a dois sistemas de esterilização. Primeiramente, foi filtrado através de membranas milipore de 0,45  $\mu$ m. Uma amostra de óleo filtrado com aproximadamente 0,1 ml foi espalhada em meio com ágar nutritivo para a verificação da presença de algum microrganismo. Após 48 horas, confirmou-se a contaminação do óleo com base no crescimento de bactérias.

A esterilização foi considerada eficiente quando o óleo diesel foi novamente filtrado através de membrana de 0,22  $\mu$ m e não houve crescimento bacteriano a aplicar-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

### 3.7.3. Seleção prévia dos isolados bacterianos

Inicialmente, foi realizado uma seleção prévia da habilidade de produção de biossurfactante, detectada pelo método de emulsão do xileno, proposto por BANAT et al. (1991).

#### 3.7.3.1. Condições de cultivo

A preparação do inóculo seguiu a metodologia descrita na seção 3.7.1 com suspensões bacterianas de  $2,1 \times 10^{10}$  cel/ml,  $2,4 \times 10^{12}$  cel/ml,  $2,6 \times 10^{10}$  cel/ml e  $1,5 \times 10^{10}$  cel/ml para os isolados bacterianos DU, DN, DC<sub>II</sub>, DC<sub>I</sub>, respectivamente. Foram utilizados 1 ml da cultura de cada isolado e transferidos para erlenmeyers de 1000 ml, contendo 99 ml de meio mineral Bushnell-Haas, suplementado com 1% de glicose. A incubação foi realizada em agitador orbital a 180 rpm, a 26-28°C. Após 48 horas, foi adicionado 1% de óleo diesel esterilizado (seção 3.7.2).

A detecção de biossurfactante pelo método de emulsão do xileno foi realizada em fotocolorímetro (VARIAN, serie 635) a 660 nm, 48 horas após a adição do óleo diesel esterilizado.

#### 3.7.3.2. Detecção do biossurfactante

Utilizou-se 35 µl da cultura, 35 µl de xileno e 5 ml de tampão TRIS 20 mM pH 8,0 (TEDESCO et al., 1985) em tubos de ensaio, previamente limpos e secos. A agitação da mistura foi feita em VORTEX por 45 segundos. A mistura foi colocada

à temperatura ambiente, por 20 minutos antes da leitura colorimétrica à 660 nm.

A leitura com alta absorbância indica alto nível de dispersão do óleo no tampão, caracterizando a presença de agentes emulsificantes, enquanto que a baixa absorbância indica pouca ou nenhuma atividade emulsificante no óleo xileno.

#### **3.7.4. Isolado DU**

Após a seleção prévia dos isolados bacterianos testados, procurou-se avaliar o comportamento exibido pelo isolado, com maior detecção de biossurfactante pelo método do xileno.

Foram utilizadas as mesmas condições de cultivos descritas anteriormente. O inóculo de DU utilizado foi de  $1,2 \times 10^{10}$  cel/ml. Neste experimento, foi conduzido o acompanhamento do consumo de glicose, pela técnica colorimétrica para açúcar redutor com DNS (MILLER, 1959) e modificado por SANDOZ CHEMICALS (Apêndice 6). Tomaram-se amostras, inicialmente a cada 4 horas, para análise de emulsificação, detectada pelo método de emulsão do xileno e para determinação do consumo de glicose.

##### **3.7.4.1. Condições analíticas**

A determinação colorimétrica de açúcar redutor com ácido dinitrosalicílico (DNS) foi realizada a partir de uma solução padrão de glicose (1 mg/ml) para preparação da curva

padrão. Adicionou-se em tubo de ensaio, 3 ml de cada concentração a 3 ml de DNS, e foram levados ao banho-maria fervente (100°C) por 5 minutos. Após deixar esfriar, foi realizada a leitura em fotocolorímetro a 575 nm.

A curva padrão foi determinada com concentrações conhecidas de glicose (0 - 1,0 mg/ml), obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,99.

#### **3.7.4.2. Determinação quantitativa do açúcar**

Foram retiradas aliquotas de 2 ml da amostra, em diferentes intervalos de tempo e submetido a centrifugação por 1 min. a 10.000 rpm. A partir de 1 ml do sobrenadante coletado dilui-se 15 vezes (primeiras horas de avaliação). Após a diluição, foi determinada a concentração de glicose pela técnica colorimétrica, com DNS, conforme descrito acima.

### **3.8. Avaliação dos biocidas**

Neste estudo foram testadas 4 agentes antimicrobianos de diferente composição química (Tabela 4).

#### **3.8.1. Concentração mínima inibitória**

A avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) serve apenas como orientação, pois informa o espectro de ação do produto. A CMI é a menor concentração necessária para controlar o crescimento de um microrganismo em meio de cultura e condições específicas (SONDOSSI et al., 1993).

TABELA 4. Composição química, ingredientes ativos e fonte dos quatro biocidas avaliados.

Designação comercial do biocida	Ingrediente Ativo		Fonte
	Composição	%	
ADESOL	cloro didecildimetil de amônio (QUAT)	50	COALITE CHEMICALS
PHYLATOL	di (2-hidrosietoxi) - metano	100	COALITE CHEMICALS
KATHON	5 cloro-2-metil-4 isotiazolona - 3 ona e 2 metil-4-isotiazolona - 3 ona	1,5	ROHM and HAAS
UCARCIDE	gluteraldeído	50	UNION CARBIDE DO BRASIL

### 3.8.1.1. Preparação do inóculo

Para a avaliação dos isolados bacterianos aeróbios, foi utilizada a preparação do inóculo conforme descrito na seção 3.7.1, com suspensões bacterianas de  $10^5$  -  $10^7$  cel/ml.

No caso de fungos, foi realizada suspensão da cultura em tubos inclinados de meio ágar-malte com água destilada esterilizada. A filtração da suspensão foi realizada em lã de vidro para a remoção de micélio ou de fragmentos de hifas. A contagem de esporos foi feita em câmara de Petroff-Hauser, com  $10^8$  propágulos/ml.

Para as bactérias, realizou-se a diluição de uma cultura em meio Postgate-B, a fim de se obter um número de  $10^7$  cel/ml. A contagem das células foi realizada em câmara de Petroff-Hauser.

### 3.8.1.2. Determinação da concentração mínima inibitória

Diferentes concentrações de biocidas em teste foram obtidas, sendo adicionadas em meio de cultura líquido, específico, ao crescimento de bactérias aeróbias, fungos e bactérias redutoras de sulfato.

Dessa forma, utilizou-se caldo nutritivo para bactérias aeróbias, caldo de malte para fungos e meio Postgate B para bactérias redutoras de sulfato.

Uma série de tubos foi preparada, com 3 repetições para cada concentração obtida.

- todos com 2 ml do meio específico

- 2 ml da solução de biocida, a partir de uma concentração preparada de 1000 ppm, com H<sub>2</sub>O destilada, esterilizada.

- 100 µl de inóculo.

Foram obtidas 10 concentrações, a partir das diluições sucessivas, da solução original de 1000 ppm. Como controle, sem adição de biocida, e somente com meio específico, foi considerada a 11ª concentração.

Os tubos, após a homogeneização e inoculação, foram incubados a 28°C por 24 horas para bactérias aeróbias e 72 horas para fungos e bactérias redutoras de sulfato. Avaliou-se o crescimento bacteriano pelo aumento de turbidez do meio, enquanto que para fungos, o crescimento foi detectado pela formação inicial de micélio. O crescimento de bactérias redutoras de sulfato foi avaliado pelo escurecimento do meio e formação de precipitado preto.

### **3.9. Avaliação dos biocidas para *Amorphotheca resinae***

Para a avaliação da eficiência dos biocidas utilizou-se os métodos descrito por HETTIGE & SHERIDAN (1989b).

#### **3.9.1. Teste em placas**

Os biocidas foram incorporados em ágar-extrato de malte. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram de 1000 e 2000 ppm.

Discos de 1,6 cm de diâmetro foram obtidos de crescimento fúngico por 5 dias em placas com ágar-malte de

*Amorphoteca resinae*. Retirou-se os discos localizados na periferia da placa com o objetivo de obter crescimento da mesma idade. Com o auxílio de uma pinça estéril foram colocados centralmente em cada placa. As medidas do diâmetro foram tomadas diariamente, durante 4 dias com a marcação na placa e identificação por letras das quatro repetições utilizadas para cada concentração.

### 3.9.2. Cultura líquida

A partir do conhecimento da concentração mínima inibitória observada para cada microrganismo em resposta aos quatro biocidas utilizados, procurou-se testar a efetividade em meio mineral (Bushnell-Haas) e óleo diesel esterilizado. Foram avaliadas 2 concentrações de cada biocida (1000 e 2000 ppm). A preparação do inóculo fúngico segue a metodologia descrita na seção 3.8.1, sendo utilizados 100 µl da suspensão. Após a homogeneização e inoculação, os frascos foram incubados a 28°C. A inspeção visual foi realizada diariamente durante sete dias, e a estimativa do crescimento fúngico foi avaliada através de uma taxa numérica.

0 - sem crescimento

+ - pouco crescimento (1,6 - 1,8 cm)

++ - crescimento moderado (1,8 - 2,5 cm)

+++ - crescimento abundante (2,5 - 3,5 cm)

No final do período de observação, realizou-se a filtração das amostras e secagem dos filtros por 48 horas em estufa a 80°C. Foram realizadas pesagens em balança

eletrônica para a obtenção de matéria seca formada.

### 3.10. Avaliação dos biocidas para bactérias anaeróbias

Foram preparadas as seguintes concentrações finais para os 4 biocidas em meio Postgate B. As concentrações testadas foram 5, 10 e 50 ppm para Adesol, Ucarcide e Phylatol. O controle foi considerado o frasco com Postgate B, sem biocida. O inóculo foi preparado conforme descrito na seção 3.8.1.1.

Os frascos foram inoculados e incubados a 28°C, sendo retiradas amostras nos seguintes intervalos de tempo: 3, 6, 9 e 24 horas.

A estimativa da população foi realizada através do método do NMP descrito na seção 3.6.3.

### 3.11. Avaliação dos biocidas para bactérias aeróbias

Para a determinação do efeito de 4 biocidas para bactérias aeróbias, utilizou-se a seguinte metodologia. O inóculo foi preparado conforme descrito na seção 3.7.1. Os biocidas foram adicionados nas concentrações pré-determinadas, conforme os resultados obtidos pela CMI, em frascos com 19 ml de meio mineral BH e 1 ml de óleo diesel esterilizado. Após a inoculação de 100 µl de cada isolado, os frascos foram incubados a temperatura ambiente. Foram retiradas amostras da fase aquosa nos seguintes intervalos de tempo: 3, 6, 9, 12 e 24 horas. A contagem das células viáveis foi realizada pelo

sistema spiral-plater (Spiral Systems mod D).

As placas foram incubadas a 28-30°C por 24 horas, sendo preparadas 4 placas para cada concentração utilizada.

### 3.12. Análise estatística

A análise estatística dos resultados de redução de células viáveis dos isolados bacterianos foi feita com base no método de análise de variância, de um modelo completamente casualizado, de experimentos em esquemas fatoriais (concentração de biocidas x tempo de amostragem). Foi utilizado o teste F para a variação global dos efeitos dos fatores e de suas interações. Os resultados foram expressos em função do desvio médio significativo (DMS) ao nível de 1%.

Os dados de redução populacional em função do tempo de incubação foram representados graficamente através do logaritmo do número de bactérias.

A percentagem de redução do logaritmo das células viáveis foi calculada pela média das 4 repetições, através da seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{\log n^{\circ} \text{ de célula controle} - \log n^{\circ} \text{ de célula teste}}{\log n^{\circ} \text{ de célula controle}} \times 100$$

A análise estatística para os resultados de inibição do crescimento de fungos por biocidas foi feita pelo teste t modificado (variâncias diferentes) e pelos testes não paramétricos de WILCOXON e MANN-WHITNEY (P = 0,05).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação da comunidade microbiana presente no óleo diesel e no sedimento formado na interface óleo-água

#### 4.1.1. Fungos

No decorrer da análise da população microbiana do óleo diesel (naval, comum e urbano) foram realizados o isolamento e a identificação de fungos ao nível de espécie (Tabela 5). A identificação foi feita com base em estruturas reprodutivas dos fungos filamentosos com o auxílio de chaves sistemáticas (ONIONS et al., 1981; ATTILI et al., 1993), sendo a espécie *Amorphoteca resinæ* determinada pelo Instituto Internacional de Micologia, Londres, Inglaterra.

Os 3 tipos de óleo diesel avaliados apresentaram diferenças na composição da população fúngica (Tabela 5). A variação da população microbiana de um tanque para outro, tem sido observada por vários pesquisadores. Essas diferenças foram atribuídas às condições de crescimento existentes nos diferentes tanques em estudo (BRUCE, 1982; NEIHOF & MAY, 1983; HAGGETT & MORCHAT, 1992).

Dentre os fungos filamentosos isolados, houve a predominância do gênero *Aspergillus*, com as espécies

TABELA 5. Fungos filamentosos isolados de membrana filtrante de amostras de óleo diesel naval, comum e urbano.

Fungos	Óleo Diesel		
	Naval	Comum	Urbano
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	+
<i>Amorphoteca resiniae</i>	+	-	-

+ presente nas amostras

- ausente nas amostras

*Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, isoladas em todas as amostras de óleo diesel (naval, comum e urbano), avaliados pelo método da membrana filtrante.

O fungo *Amorphoteca resiniae* é considerado um dos principais contaminantes envolvidos na deterioração de hidrocarbonetos (n-alcanos) como o querosene de aviação (VIDELA, 1981; COONEY & SMUCKER, 1983; SMITH, 1988; SMITH, 1991) e em diesel utilizado em embarcações (BRUCE, 1982; MAY & NEIHOF, 1983; ANDRYKOVITCH & NEIHOF, 1987; HETTIGE & SHERIDAN, 1989a,b; HAGGETT & MORCHAT, 1992).

Apesar da constatação na literatura, neste trabalho o fungo *Amorphoteca resiniae* foi isolado somente em amostras de óleo diesel naval de tanques armazenadores. O crescimento em laboratório de *Amorphoteca resiniae* e *Aspergillus niger* em meio mineral Bushnell-Haas e óleo diesel urbano foi avaliado por SOLANA (1994). O comportamento de *Amorphoteca resiniae*

foi semelhante ao encontrado por outros pesquisadores (ELPHICK & HUNTER, 1968; COONEY & SMUCKER, 1983) para outros sistemas com combustível (querosene e diesel de embarcações). A fase inicial de crescimento foi caracterizada pelo surgimento de uma película na interface combustível/meio mineral, de cor esbranquiçada que ao longo do período experimental foi escurecendo e aumentando. Ao término do período de incubação (30 dias), a biomassa formada na interface óleo/meio mineral tornou-se tão densa que dificultou a determinação da fase oleosa. Portanto, *Amorphotheca resinæ* e *Aspergillus niger* apresentam habilidade de crescer em diesel urbano. No entanto, apesar da habilidade de crescimento, esses fungos não foram encontrados nas amostras de diesel urbano estudadas na presente pesquisa (Tabela 5).

#### 4.1.2. Bactérias aeróbias

O critério utilizado para a seleção dos isolados bacterianos foi a frequência de ocorrência nas amostras, que possibilitou a obtenção de 4 isolados bacterianos das amostras de óleo diesel. Dois isolados foram obtidos da filtração em membrana milipore do óleo diesel comum e óleo diesel naval, denominadas DC<sub>I</sub> e DN respectivamente. A inoculação do sedimento em placas permitiu selecionar os outros 2 isolados, denominados DU do diesel urbano e DC<sub>II</sub> do diesel comum.

Os resultados da morfologia colonial, celular e de

alguns testes bioquímicos estão apresentados na Tabela 6. Os isolados DC<sub>I</sub> e DC<sub>II</sub> foram identificados como prováveis pertencentes ao gênero *Bacillus* e os isolados DN e DU como *Pseudomonas*.

#### 4.1.3. Bactérias anaeróbias

O isolamento de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato foi possível mediante a inoculação do sedimento biológico formado na interface óleo-água em meio específico para esse grupo de organismos. Em todas as amostras analisadas de sedimentos de óleo diesel naval, comum e urbano foram encontrados organismos viáveis. Estes resultados corroboram com os encontrados por FRANÇA et al. (1992) ao examinarem a presença de microrganismos redutores de sulfato em sedimento formado no fundo de tanques de estocagem de óleo diesel.

Como as bactérias redutoras de sulfato são anaeróbias obrigatórias, depende-se que ocorrem regiões desprovidas de oxigênio dentro do sedimento.

#### 4.2. Estimativa da população aeróbia e anaeróbia do sedimento biológico de óleo diesel naval, urbano e comum

##### 4.2.1. Centrifugação

A centrifugação do sedimento biológico formado na interface óleo-água permitiu a análise das frações que se formaram. Este tipo de avaliação demonstrou que o sedimento

TABELA 6. Caracterização morfológica celular e bioquímica dos isolados bacterianos aeróbios de óleo diesel (naval, comum e urbano).

Caracterização	DC <sub>I</sub>	DN	DU	DC <sub>II</sub>
COLONIAL				
Forma	irregular	circular	circular	irregular
Densidade Óptica	opaca	opaca	opaca	opaca
Bordos	arborescente	lisos	lisos	arborescente
Elevação	plana	convexa	convexa	convexa
Consistência	coriácea	butirosa	gomosa	butirosa
Cor	branca	creme	amarela	creme
CELULAR				
Forma	bastonetes	bastonetes	bastonetes	bastonetes
Coloração de Gram	+	-	-	+
Endosporos	+	-	-	+
Motilidade	+	+	+	+
Crescimento sem O <sub>2</sub>	+	-	-	+
BIOQUÍMICA				
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Sacarose (Fermentação)	+	-	-	+
Glicose (Fermentação)	+	-	-	+
Lactose (Fermentação)	+	-	-	+
Cetrimida	-	+	+	-
Identificação provável	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>

apresenta grande quantidade de água, material particulado de alta densidade e óleo (Figura 7).

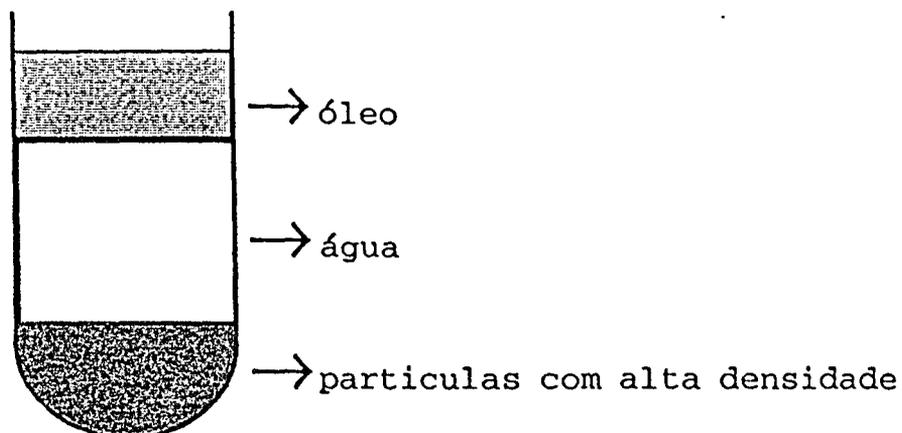


FIGURA 7. Frações formadas após a centrifugação do sedimento biológico.

#### 4.2.2. Diluição do sedimento biológico

A sequência metodológica proposta por FRANÇA et al. (1992) não pode ser utilizada de forma consistente porque as diluições em água destilada esterilizada não permitiram a perfeita homogeneização da amostra.

A utilização de um diluente eficiente torna-se um fator importante na estimativa da população microbiana em sistemas com combustível, devido ao caráter hidrófobo apresentado pelos hidrocarbonetos. Uma homogeneização ineficiente poderia levar a uma subestimativa das populações aeróbia e anaeróbia presentes no lodo biológico analisado.

Dentre os dois detergentes, o TRITON X-100 foi considerado o melhor emulsificador por produzir uma suspensão mais homogênea. A análise dos resultados obtidos da

homogeneização com TRITON X-100 demonstraram uma estimativa mais aproximada de microrganismos presentes nas amostras, quando comparados com os resultados obtidos com o outro detergente utilizado, o TWEEN 80 (Figura 8).

A estimativa da população aeróbia obtida através da homogeneização com TRITON X-100 em sedimento de óleo diesel naval e urbano foi de  $1,0 \times 10^7$  cel/ml, enquanto que para o sedimento de óleo diesel comum foi detectado  $2,3 \times 10^5$  cel/ml. A população de bactérias redutoras de sulfato foi estimada em  $2,4 \times 10^6$  cel/ml para o sedimento de óleo diesel comum,  $2,3 \times 10^5$  cel/ml para sedimento de óleo diesel naval e  $4,3 \times 10^5$  cel/ml para sedimento de óleo diesel urbano.

Na avaliação do sedimento do óleo diesel urbano com TWEEN 80, não foram detectadas bactérias redutoras de sulfato em nenhuma das amostras avaliadas. Este fato sugere que possa ter ocorrido uma homogeneização ineficiente das amostras, pois os resultados obtidos com TRITON X-100 demonstraram altas concentrações de células de bactérias redutoras de sulfato no sedimento de óleo diesel urbano.

O TRITON X-100 é um detergente não iônico com atividade antimicrobiana menor que o TWEEN 80.

A estimativa de bactérias aeróbias e redutoras de sulfato foi aproximadamente de  $10^5 - 10^7$  cel/ml, indicando que as condições ambientais e nutricionais nos sedimentos de tanques armazenadores de óleo diesel foram apropriadas para os grupos avaliados.

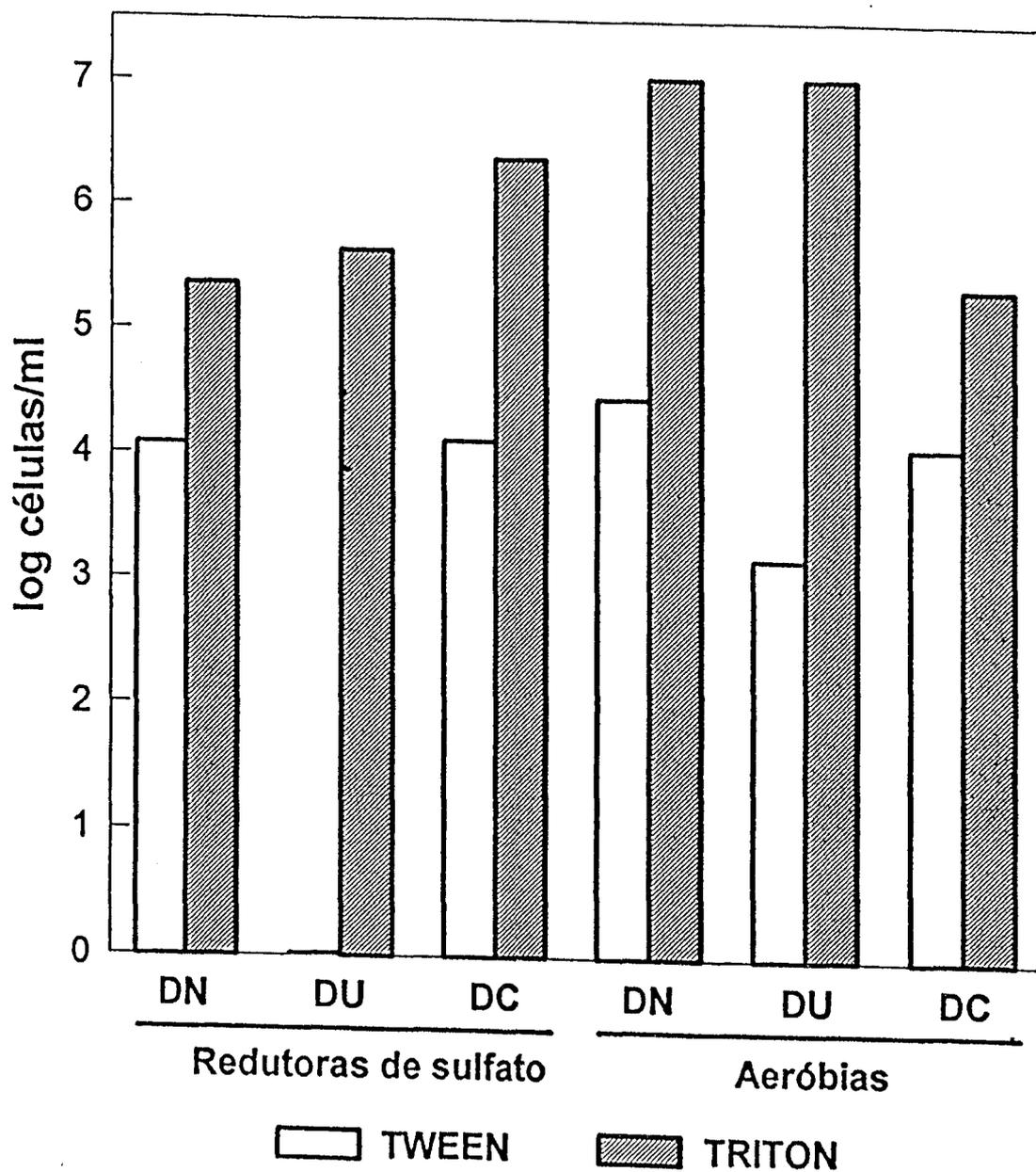


FIGURA 8. Estimativa da população de microrganismos aeróbios e redutoras de sulfato do lodo biológico do óleo diesel (Média de 3 repetições).  
 DN → óleo diesel naval  
 DU → óleo diesel urbano  
 DC → óleo diesel comum

A análise da estimativa de microrganismos presentes pelos métodos avaliados ( $10^5$ - $10^7$  cel/ml) revelou tratar-se de um sistema altamente infectado (HILL & HILL, 1993).

Não existem métodos microbiológicos padrões que possam estimar a população microbiana presente em sistemas com combustível (HILL, 1987; HILL & HILL, 1993), embora estejam disponíveis comercialmente vários "kits" para monitoramento da contaminação microbiana, sendo alguns especialmente confeccionados para o uso em tanques com combustíveis (BAYLEY & MAY, 1979). A limitação desses testes está em não estabelecer diferenças entre os organismos responsáveis pela deterioração de combustíveis e outras bactérias (SMITH, 1991).

#### 4.3. Detecção do biossurfactante

Os resultados obtidos na seleção prévia permitiram considerar o isolado DU como o de maior produção relativa de biossurfactante (Tabela 7).

O critério utilizado no método de avaliação da produção de biossurfactante foi o de dispersar o óleo xileno pela presença de agentes emulsificantes produzidos pelos microrganismos testados. Maior atividade emulsificante foi estimada pelo aumento da absorbância detectada, enquanto que pouca ou nenhuma atividade foi relacionada a valores baixos de absorbância (BANAT et al., 1991; ROCHA et al., 1992).

Na seleção prévia dos isolados bacterianos, como não foi realizado o acompanhamento da concentração de glicose, é

TABELA 7. Produção relativa de biossurfactantes determinada pelo método da emulsão do óleo (xileno) por isolados bacterianos após 48 horas de incubação com 1% de óleo diesel esterilizado (Média de 3 repetições).

Isolados Bacterianos	Detecção de biossurfactante		Absorbância 660 nm
	% (1)	(2)*	
DU-diesel urbano	100,0	+++	1,075
DN-diesel naval	2,1	+	0,023
DC <sub>I</sub> -diesel comum	31,9	++	0,343
DC <sub>II</sub> -diesel comum	80,9	+++	0,87

(1) Produção relativa de biossurfactante, sendo 100% considerada para máxima absorbância encontrada.

(2) + Detecção mínima de biossurfactante

++ Detecção média de biossurfactante

+++ Detecção máxima de biossurfactante

\* Classificação segundo BANAT et al. (1991)

possível que a detecção de biossurfactante possa ter sido devido a presença de glicose residual no meio (GUERRA-SANTOS et al., 1984; WASKO & BRATT, 1990; BANAT et al., 1991; ROCHA et al., 1992).

Para isolar o efeito da glicose sobre a produção de agentes emulsificantes, conduziu-se o experimento complementar com o isolado DU (Figura 9). Pode-se constatar a partir do monitoramento do consumo total de glicose a ocorrência de um aumento na detecção de agentes emulsificantes, pelo método de emulsão do xileno após adição de óleo diesel esterilizado.

A adição de óleo diesel estéril como fonte única de carbono pode ter induzido a produção de uma molécula surfactante com maior atividade emulsificante (ou uma maior produção) do que aquela produzida com glicose. A nova fonte de carbono disponível, imiscível em meio aquoso, precisou ser dispersada para facilitar a captação pelos microrganismos (REISFELD et al., 1972; CANE et al., 1983; BANAT et al., 1991; ROCHA et al., 1992). Este fato foi observado pelo óleo diesel visivelmente emulsificado quando comparada ao tratamento controle sem inoculação do DU.

#### **4.4. Avaliação dos biocidas**

##### **4.4.1. Concentração mínima inibitória**

O espectro de ação dos três biocidas avaliados para os fungos isolados é mostrado na Tabela 8. O biocida Adesol apresentou atividade inibitória na faixa de 15 - 3,9 ppm,

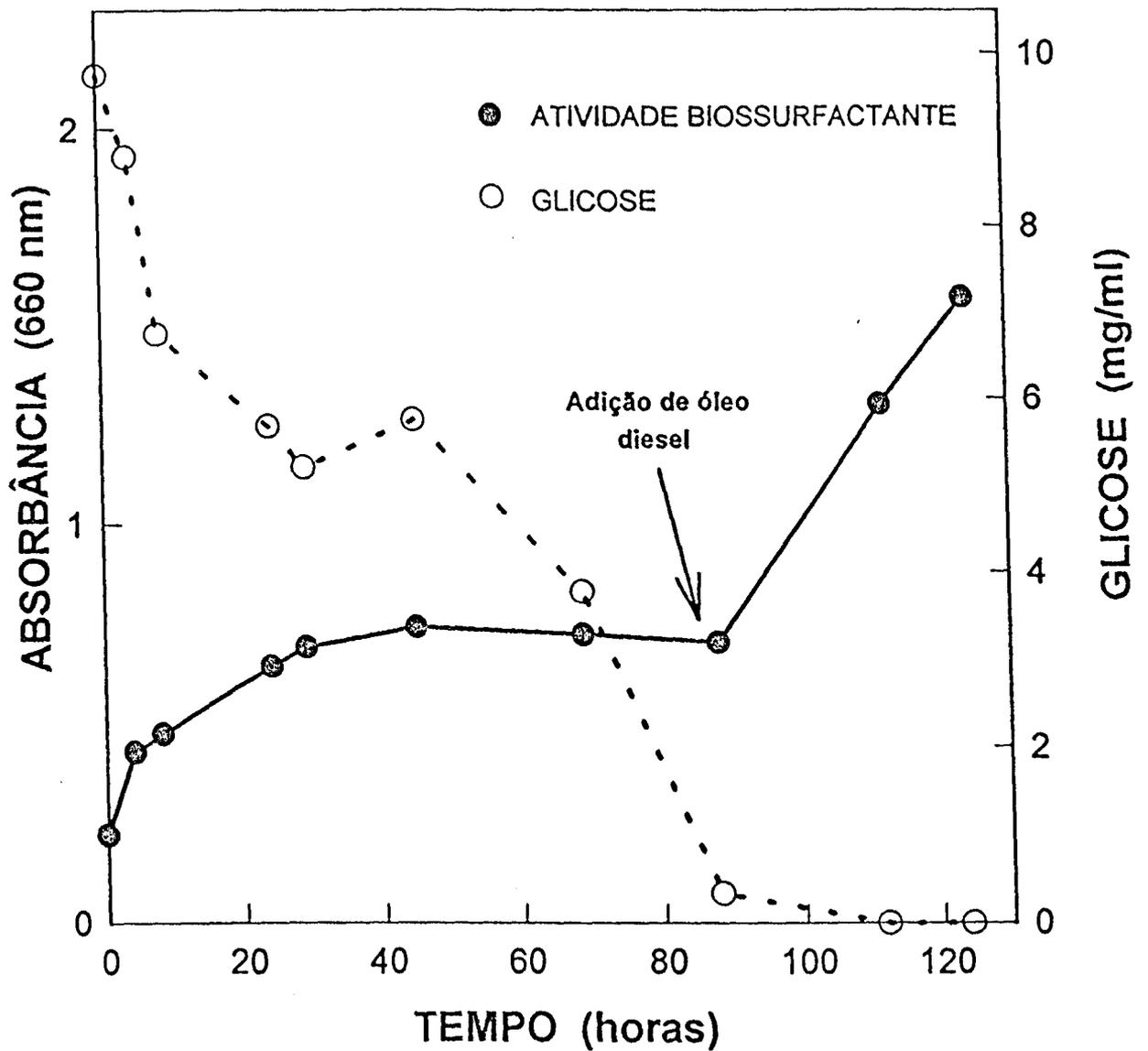


FIGURA 9. Atividade biossurfactante pelo isolado DU detectada pelo método de emulsão do xileno e avaliação do consumo de glicose, em diferentes intervalos de tempo. (Média de 3 repetições)

TABELA 8. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de 3 biocidas para fungos em caldo de extrato de malte, pH 5,4.

Fungos	Biocidas	CMI (ppm)		
		ADESOL	PHYLATOL	UCARCIDE
<i>Aspergillus fumigatus</i>		< 3,9	250 - 125	1000 - 500
<i>Aspergillus flavus</i>		15,1 - 7,8	500 - 250	500 - 250
<i>Aspergillus niger</i>		15,1 - 7,8	1000 - 500	1000 - 500
<i>Amorphoteca resinae</i>		7,8 - 3,9	> 1000	1000 - 500

TABELA 9. Determinação da concentração mínima inibitória de 4 biocidas para bactérias aeróbias e redutoras de sulfato em caldo nutritivo, pH 7,4.

Bactérias	Biocidas	CMI (ppm)			
		ADESOL	PHYLATOL	UCARCIDE	KATHON
DC <sub>I</sub>		7,8 - 3,9	250 - 125	250 - 125	< 3,9
DN		125 - 62,5	1000 - 500	500 - 250	< 3,9
DU		< 3,9	31,5 - 15,1	31,5 - 15,1	< 3,9
DC <sub>II</sub>		< 3,9	62,5 - 31,5	500 - 250	< 3,9
BSR*		7,8 - 3,9	500 - 250	31,5 - 15,1	< 3,9

\* Bactérias anaeróbias redutoras de sulfato, meio Postgate B, pH 7,5.

enquanto que os biocidas Phylatol e Ucarcide foram considerados com baixa eficiência na concentração de 15 ppm, sendo necessárias concentrações superiores a 150 ppm para o controle do crescimento fúngico.

Os agentes antimicrobianos variam sua resposta em função do pH. O biocida Ucarcide que é a base de gluteraldeído tem sua atividade ótima em pH alcalino (pH 8,0 e 9,0) (SANDIN, 1993). Como o meio de cultura em teste específico é para fungos, com pH 5,4, é provável que o meio ácido tenha inativado o biocida.

A avaliação inibitória dos 4 biocidas no crescimento de 4 isolados bacterianos aeróbios e bactérias redutoras de sulfato é mostrado na Tabela 9. O biocida Adesol apresentou atividade inibitória para DC<sub>I</sub>, DU e DC<sub>II</sub> na concentração inferior a 3,9 ppm. Apenas o isolado DN foi inibido na faixa de 125 - 62,5 ppm. Para as bactérias redutoras de sulfato, a concentração mínima inibitória foi inferior a 7,8 ppm.

O biocida Kathon representou amplo espectro de ação inibitória na concentração de 3,9 ppm para os isolados bacterianos aeróbios e redutores de sulfato. A concentração mínima inibitória apresentada pelo biocida Phylatol variou de 500 - 15,1 ppm para os isolados bacterianos avaliados, enquanto que a variação para o biocida Ucarcide foi de 250 - 15,1 ppm.

Os resultados da concentração mínima inibitória indicam que os biocidas Adesol e Kathon foram os mais efetivos a baixas concentrações, enquanto que os biocidas

Phylatol e Ucarcide foram de baixa eficiência, pois em alguns casos são necessárias concentrações de 500 ppm para eliminar o crescimento dos isolados bacterianos testados em meio de cultura específico.

#### 4.5. Avaliação de biocidas para *Amorphotheca resinae*

O fungo *Amorphotheca resinae* foi usado neste estudo por se tratar de um contaminante típico, reconhecido pela participação significativa na biomassa formada em sistemas com combustíveis.

O teste em placas permitiu visualizar e medir o efeito tóxico inibidor de cada biocida testado nos tratamentos de 1000 a 2000 ppm sobre os discos com micélio colocados centralmente na placa de Petri (Tabela 10).

Na avaliação da atividade inibitória do biocida Adesol, observou-se a formação de um halo amarelo em torno do disco, ao final das 48 horas. Não houve crescimento durante as 96 horas avaliadas e, a partir das 48 horas, o disco, além de não apresentar crescimento, possuía um aspecto esbranquiçado.

O biocida Phylatol não apresentou atividade inibitória em nenhum dos tratamentos de 1000 e 2000 ppm testados. O disco com micélio apresentou crescimento semelhante ao tratamento controle durante as 96 horas avaliadas.

Nas 24 primeiras horas de avaliação do biocida Ucarcide, não houve atividade inibitória nos tratamentos 1000 e 2000 ppm. No entanto, a partir das 48 horas e até o final

TABELA 10. Atividade dos biocidas no crescimento de *Amorphoteca resiniae* em placas e cultura líquida.

Concentração do biocida (ppm)	Crescimento do <i>Amorphoteca resiniae</i>		
	Teste em placas (96 horas)	Cultura líquida (30 dias)	
ADESOL	0	+++	0
	1000	0	0 (*)
	2000	0	0 (*)
PHYLATOL	0	+++	0
	1000	+++	0
	2000	+++	0
UCARCIDE	0	+++	0
	1000	+++	++ (*)
	2000	+++	+++ (*)
KATHON	0	+++	0
	1000	0	0
	2000	0	0
		0 - sem crescimento	0 - sem crescimento
		+ - pouco crescimento (1,6-1,8 cm)	+ - pouco crescimento
		++ - crescimento moderado (1,8-2,5 cm)	++ - crescimento moderado, fina película de micélio
		+++ - crescimento abundante (2,5-3,5 cm)	+++ - crescimento abundante, densa película de micélio
			* - emulsificação

das 96 horas avaliadas, não variou o crescimento no disco desde a 1ª medida (tomada às 24 horas). Observou-se um encurvamento do disco, sugerindo a presença de substâncias tóxicas e inibitórias ao crescimento do disco micelial.

O biocida Kathon apresentou atividade inibitória nos tratamentos 1000 e 2000 ppm durante as 96 horas avaliadas.

O método de cultura líquida permitiu uma avaliação, com relação ao tempo em que os componentes dos biocidas podem se manter ativos. Segundo ANDRYKOVITCH & NEIHOF (1987), muitos biocidas estão sujeitos à hidrólise ou oxidação, tornando-se inativos com o tempo. Outro fator a considerar é quanto ao coeficiente de partição do biocida no sistema óleo/água (meio mineral), podendo-se encontrar taxas diferentes entre os agentes antimicrobianos.

Na avaliação da cultura líquida com o biocida Adesol, durante a inspeção visual realizada diariamente, não foi observado nenhum crescimento na interface óleo/meio mineral nos tratamentos 1000 e 2000 ppm, apesar de constatar-se a emulsificação da camada de óleo diesel que proporcionou uma completa mistura entre óleo e meio mineral. Essa emulsificação pode ser explicada pela presença do biocida em solução, pois o Adesol é um sal quaternário de amônio, que é um agente surfactante, logo com atividade solubilizadora. Os resultados da pesagem não apresentaram diferenças significativas.

Durante o período de avaliação com o biocida Phylatol, não foi observado nenhum crescimento na interface óleo-meio mineral, nem a emulsificação nos tratamentos 1000

e 2000 ppm. Não foi detectada diferença significativa nos resultados da pesagem de matéria seca formada.

Na avaliação do biocida Ucarbide, observou-se crescimento e emulsificação do óleo ao longo do período de 30 dias nos tratamentos 1000 e 2000 ppm (Tabela 10). Inicialmente, por volta de 10 dias, desenvolveu-se uma fina película esbranquiçada, que no tratamento 1000 ppm manteve-se até o final do período de avaliação. No tratamento 2000 ppm a fina película que também se formara inicialmente deu lugar a uma densa película de micélio no final do período. No tratamento 1000 ppm, o crescimento foi classificado como moderado, enquanto que no tratamento 2000 ppm foi classificado como abundante, dentro da escala considerada.

O crescimento observado nesta avaliação está de acordo com o apresentado na literatura para *Amorphoteca resinae* (ELPHICK & HUNTER, 1968; SMITH & CROOK, 1983; SOLANA, 1994). A presença do fungo foi confirmada pela inoculação de 100 µl dos tratamentos 1000 e 2000 ppm em placas com ágar-malte (3 repetições). Descartou-se a possibilidade do crescimento observado estar relacionada a algum contaminante. Este procedimento foi realizado com todos os biocidas testados (Adesol, Ucarbide e Kathon) nas concentrações de 1000 e 2000 ppm, além do tratamento controle.

Os resultados de matéria seca formada demonstraram diferenças significativas estatisticamente (Apêndice 17). Estes resultados sugerem que o biocida Ucarbide, além de não ter apresentado efeito inibitório, proporcionou o crescimento

do fungo. Como foi utilizado o mesmo inóculo em todos os tratamentos, este crescimento pode ter ocorrido, provavelmente, pela disponibilidade de outros nutrientes fornecidos pelo biocida. No tratamento controle, não foi constatado crescimento significativo.

Na avaliação com o biocida Kathon, não foi constatado crescimento nas concentrações de 1000 e 2000 ppm. Não foi observada emulsificação, e os valores de matéria seca formada não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados de inibição do crescimento fúngico com Kathon estão de acordo com os apresentados pela literatura. ANDRYKOVITCH & NEIHOF (1987), ao compararem a atividade de 5 biocidas no controle de *Amorphotheca resinae*, encontraram que a mistura metilcloro/metilisotiazolona inibiu o crescimento desse fungo, ao contrário dos demais testados na concentração de 1 ppm.

HETTIGE & SHERIDAN (1989b) avaliaram a eficiência de 6 biocidas, entre os quais o Kathon 886 (mesmo ingrediente ativo, mas diferentes proporções) e constataram controle total de crescimento para 3 fungos avaliados, entre eles *Amorphotheca resinae*, na concentração de 50 ppm.

#### **4.6. Avaliação dos biocidas para bactérias redutoras de sulfato**

Os biocidas apresentaram atividade inibitória total em todas as concentrações utilizadas, quando comparadas ao tratamento controle. Não foi detectado crescimento de

bactérias redutoras de sulfato, pelo método NMP, desde as 3 primeiras horas de avaliação. Neste caso, o meio utilizado para avaliação foi o mesmo da CMI - concentração mínima inibitória (Posgate B), estando os resultados concordantes com os indicados pela CMI.

#### **4.7. Avaliação da atividade antibacteriana dos biocidas em meio mineral e óleo diesel esterilizado**

De maneira geral, foi observado em todas as avaliações uma queda no número de células viáveis do tratamento controle nas 3 primeiras horas. Esse declínio deveu-se, provavelmente, a adaptações frente às diferenças na composição do meio de cultura do inóculo (caldo nutritivo, Apêndice 3) e do meio mineral (Bushnell-Haas, Apêndice 4), bem como do óleo diesel utilizado na avaliação.

##### **4.7.1. Isolado bacteriano DN**

Na avaliação com o biocida Phylatol a 100 ppm, não houve diferença estatística no número de células viáveis do isolado bacteriano DN (Figura 10). Somente ocorreu manifestação do efeito, a partir do aumento da concentração para 500 ppm, com um declínio de 4,2% e 35% a partir da sexta e nona hora de avaliação, respectivamente. O efeito mais pronunciado ocorreu com a aplicação de 1000 ppm, não sendo detectadas células viáveis a partir das 6 primeiras horas.

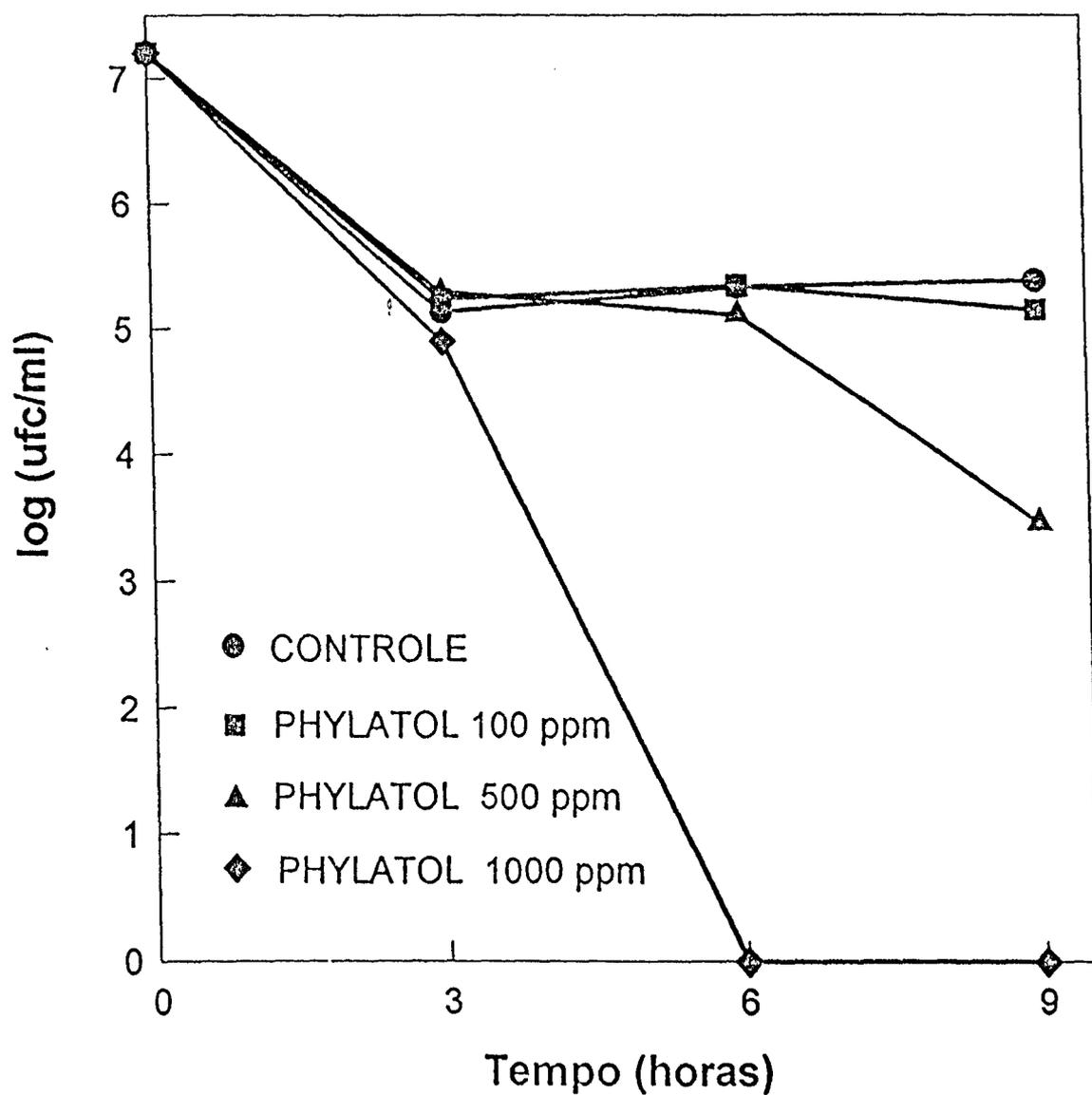


FIGURA 10. Comportamento do isolado bacteriano (DN) em resposta à adição do biocida Phylatol, durante um período de incubação de 9 horas, em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
DMS Tratamento = 0,102  
DMS Tempo = 0,053

O percentual de redução de células viáveis observado com Ucarcide foi de 100%, utilizando-se as mesmas concentrações de Phylatol (100, 500 e 1000 ppm).

A atividade bactericida total também foi observada para os biocidas Adesol e Kathon nas concentrações de 10, 50 e 100 ppm e 1, 50 e 100 ppm, respectivamente, em todos os tempos de amostragens.

#### 4.7.2. Isolado bacteriano DU

O efeito do biocida Adesol, na concentração de 1 ppm, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle nas 3 primeiras horas (Figura 11). Nas concentrações 10 ppm e 50 ppm não foram detectadas células viáveis em todo o período de avaliação. A atividade do biocida Phylatol a 10 ppm afetou significativamente o isolado bacteriano DU, apresentando 54% de redução nas 12 primeiras horas de avaliação. Ao final das 24 horas, detectou-se 100% de redução das células viáveis. Nas concentrações de 50 e 100 ppm, desde o início até o final das 24 horas, não foram detectadas células viáveis.

Os biocidas Ucarcide e Kathon, nas respectivas concentrações de 10, 50 e 100 ppm e de 1, 5 e 10 ppm apresentaram 100% de redução dos organismos ao longo das 24 horas de incubação.

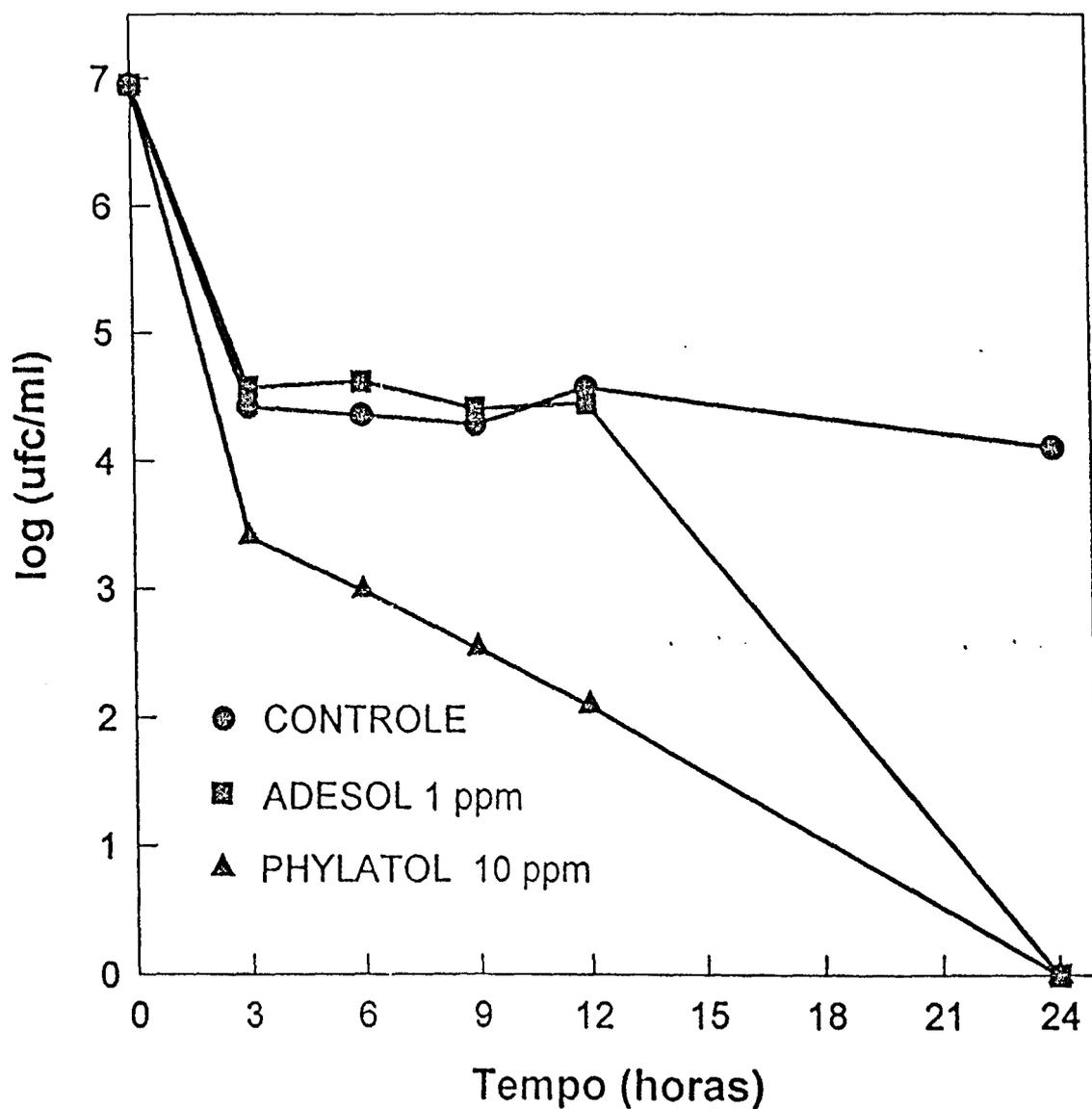


FIGURA 11. Comportamento do isolado bacteriano DU em resposta à adição dos biocidas Adesol e Phylatol, durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.

DMS Tratamento = 0,15697

DMS Tempo = 0,35099

#### 4.7.3. Isolado DC<sub>I</sub>

De uma forma geral o efeito do biocida Ucarcide apresentou diferenças significativas com relação às concentrações utilizadas e aos tempos de amostragem avaliados (Figura 12).

Como era esperado, o aumento da concentração afetou a população do isolado bacteriano DC<sub>I</sub> ao final das 24 horas de avaliação. O efeito da concentração de 500 ppm foi considerado o mais baixo, com redução de apenas 6% das células viáveis. No entanto, na concentração de 1000 ppm, o efeito foi mais pronunciado, com redução de 26% das células totais. O tratamento considerado mais efetivo foi o de 2000 ppm, não sendo detectadas células viáveis desde as 3 primeiras horas de avaliação. Aparentemente, as concentrações de 500 e 1000 ppm exibiram efeito bacteriostático nas primeiras 24 horas, pois houve uma queda significativa na população. No entanto, pode-se dizer que essas concentrações não foram suficientes para eliminar as células totalmente (efeito bactericida), como observado no tratamento de 2000 ppm.

No experimento com o biocida Kathon, os resultados demonstraram diferenças significativas entre as concentrações utilizadas e os tempos de avaliação (Figura 13). Observou-se uma redução gradativa na concentração de 50 ppm, ao longo das primeiras 12 horas de avaliação. Na terceira amostragem (9 horas), a redução observada foi de 48,2%, enquanto que a 12 horas, a redução de células viáveis foi de 100%.

O efeito bactericida (100% de redução de células

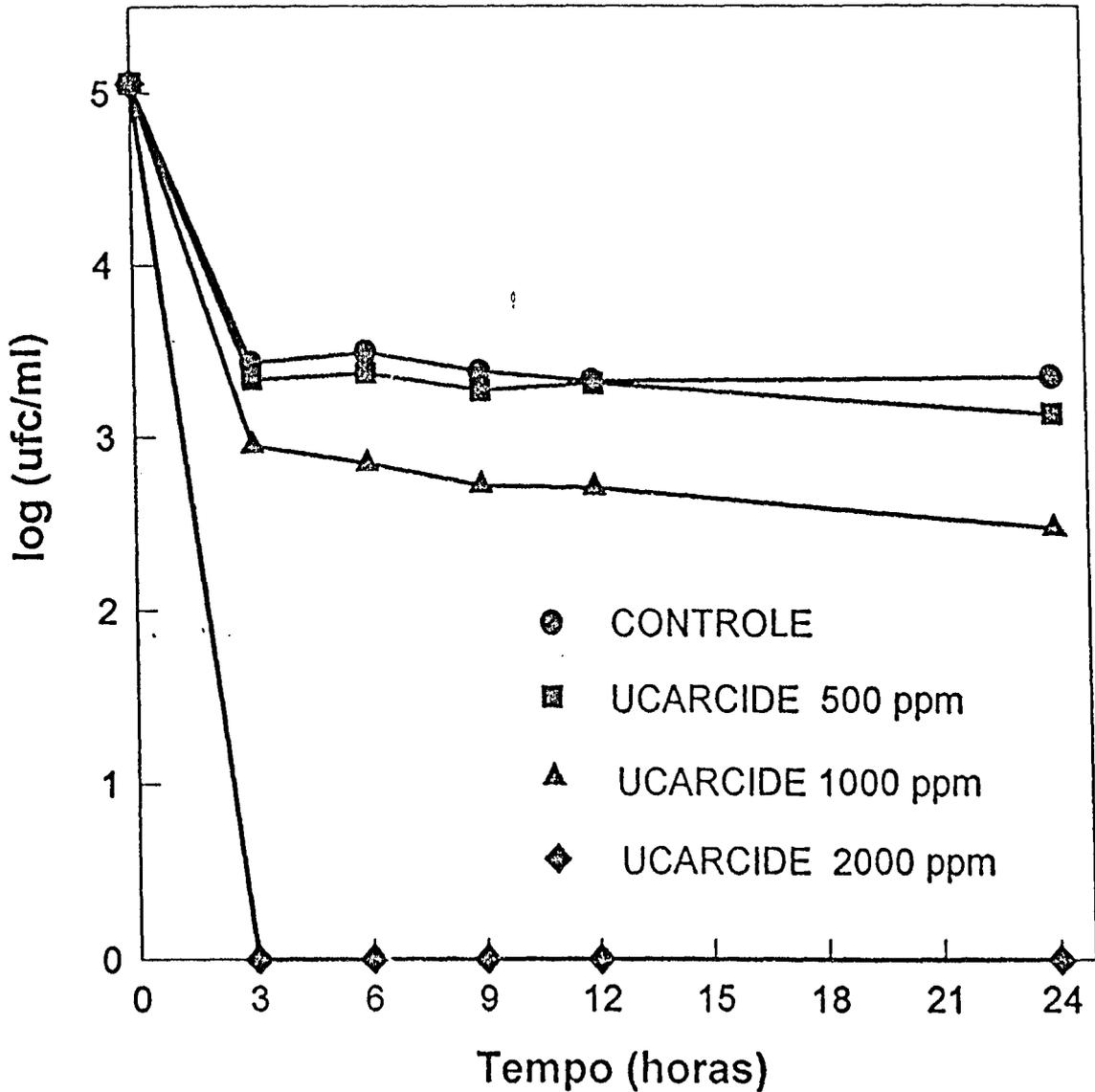


FIGURA 12. Comportamento do isolado bacteriano (DC<sub>1</sub>) em resposta a adição do biocida Ucarcide, durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
 DMS Tratamento = 0,08685  
 DMS Tempo = 0,09710

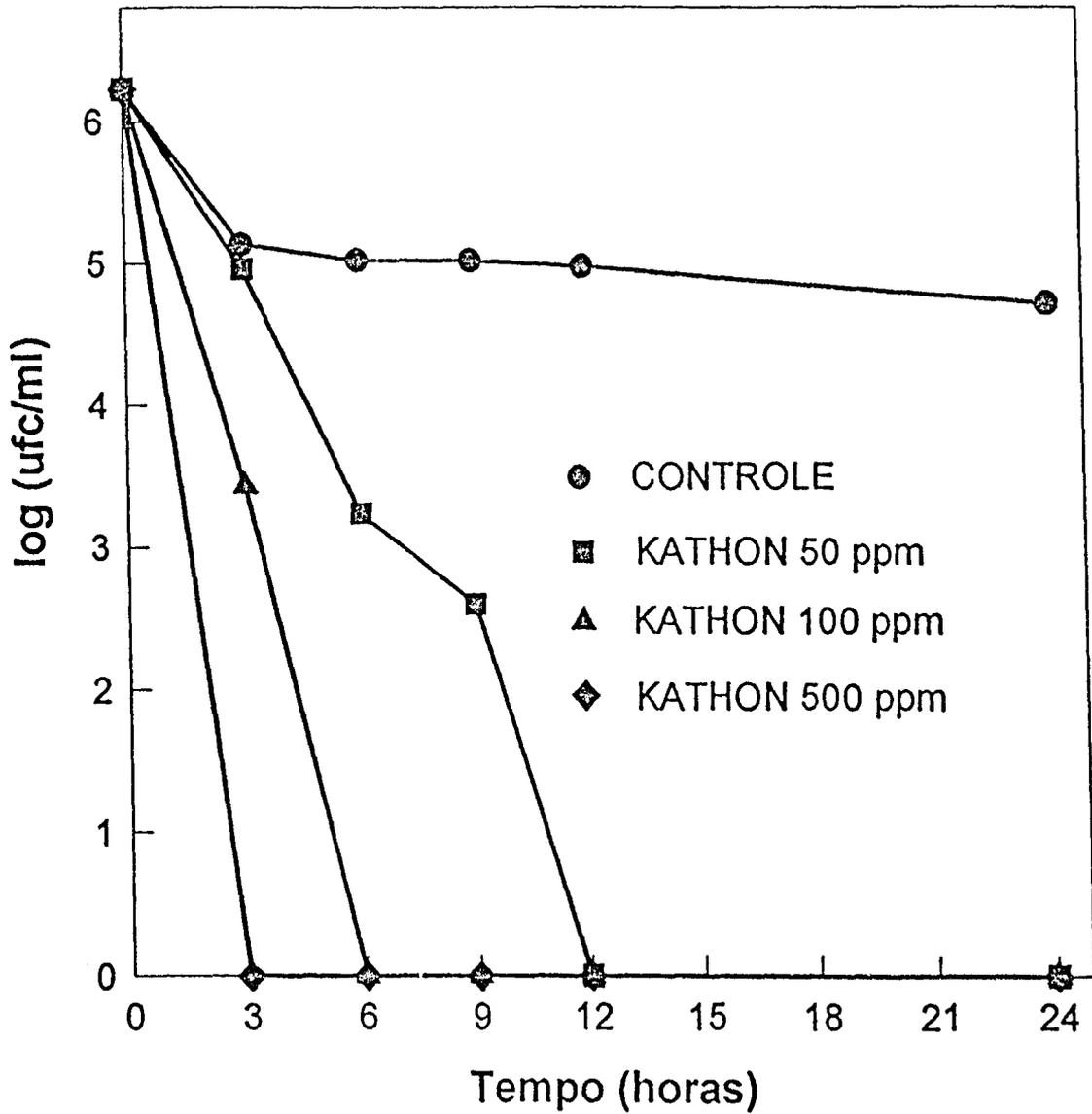


FIGURA 13. Comportamento do isolado bacteriano (DC<sub>I</sub>) em resposta à adição do biocida Kathon, durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
 DMS Tratamento = 0,02544  
 DMS Tempo = 0,02845

viáveis) das concentrações 100 e 500 ppm pode ser observado às 6 e 3 horas de avaliação, respectivamente.

Na avaliação do biocida Phylatol, os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas com relação às concentrações utilizadas e aos tempos de avaliação (Figura 14). Nas 3 primeiras horas, os percentuais de redução das células totais dos tratamentos 500, 1000 e 2000 ppm foram de 45%, 49% e 56,6%, respectivamente.

Estes resultados revelam, provavelmente, que as 3 concentrações utilizadas, nas primeiras 12 horas, apresentaram efeitos bacteriostáticos similares. Nas concentrações de 500 ppm e 1000 ppm, este efeito permaneceu até o final das 24 horas de avaliação. No entanto, o efeito bactericida da concentração de 2000 ppm foi constatado a partir das 12 horas, chegando a 100% de redução das células ao final das 24 horas.

Na avaliação com o biocida Adesol, foi constatado efeito bactericida com 100% de redução das células viáveis nos tratamentos de 50, 500 e 1000 ppm.

#### **4.7.4. Isolado bacteriano DC<sub>II</sub>**

Os resultados da avaliação com o biocida Phylatol apresentaram diferenças globais significativas nas concentrações e tempos de amostragens (Figura 15). Nas 6 primeiras horas de avaliação, a concentração mínima de 50 ppm não diferiu estatisticamente de 100 ppm. A redução das células viáveis nos tempos 12 e 24 horas, na concentração de 10 ppm,

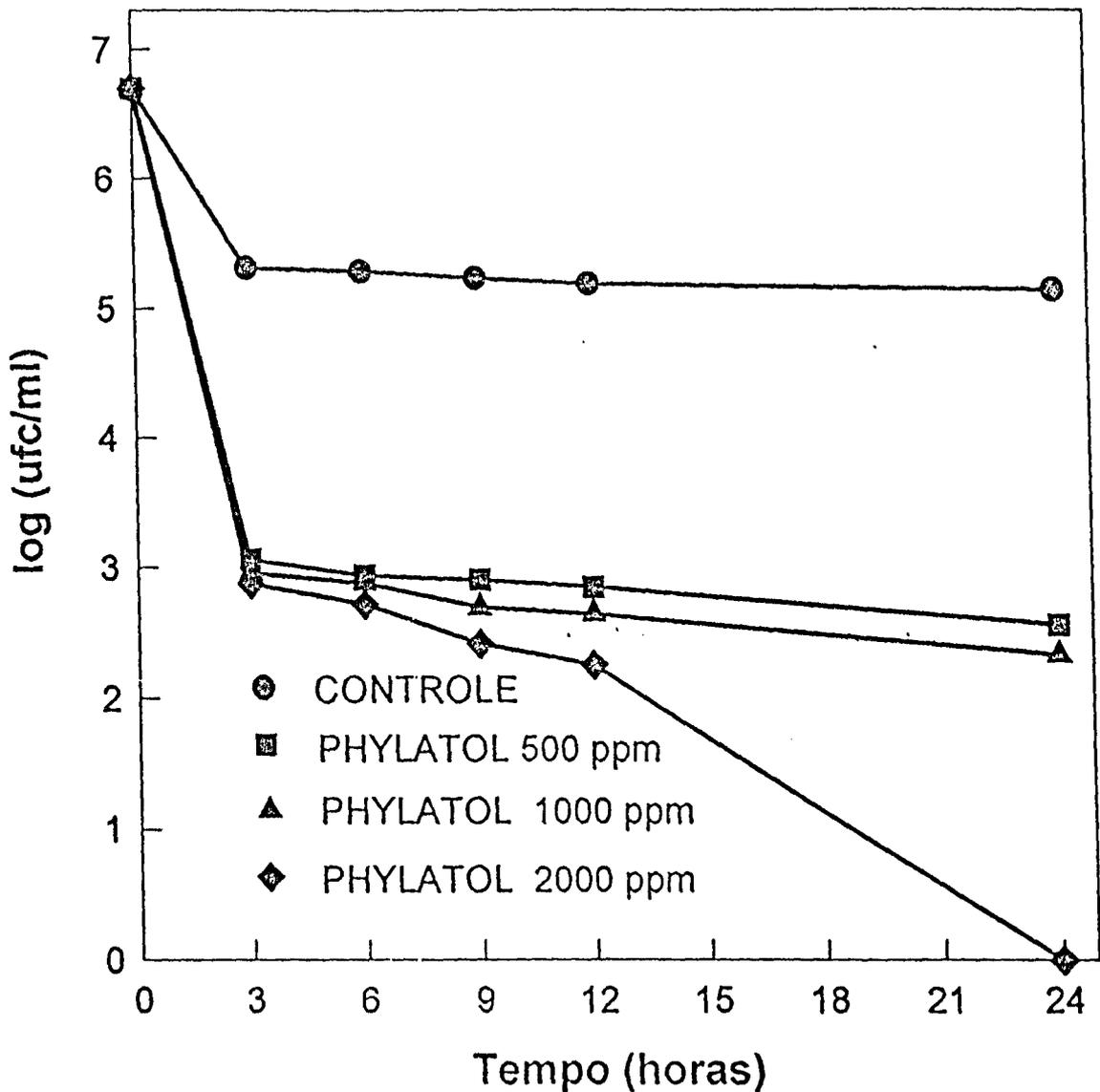


FIGURA 14. Comportamento do isolado bacteriano DC<sub>I</sub> em resposta a adição do biocida Phylatol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
 DMS Tratamento = 0,08934  
 DMS Tempo = 0,09989

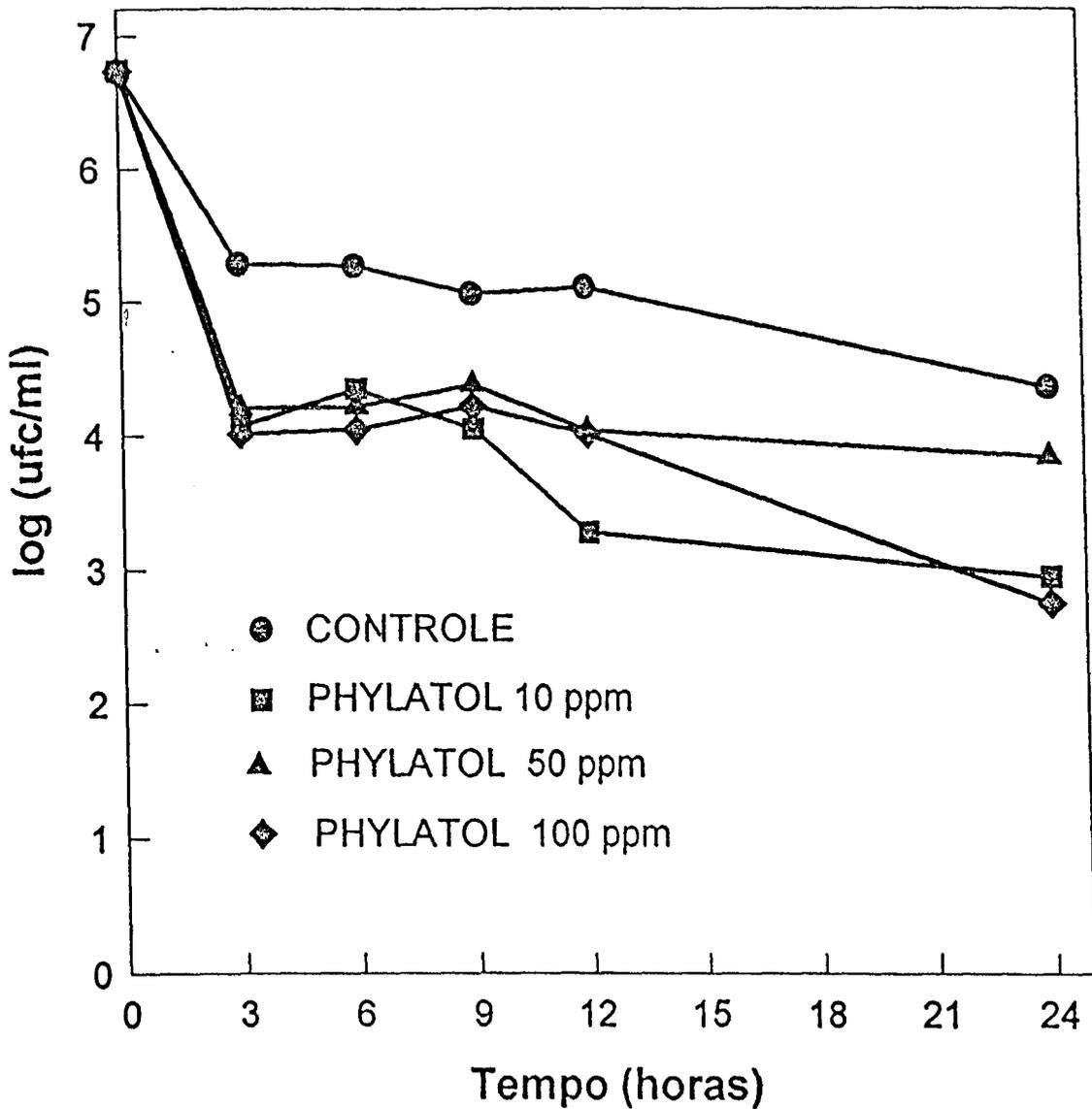


FIGURA 15. Comportamento do isolado bacteriano DC<sub>II</sub> em resposta a adição do biocida Phylatol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
 DMS Tratamento = 0,08316  
 DMS Tempo = 0,09297

foi maior que as concentrações máximas testadas (50 e 100 ppm). Este resultado sugere a ocorrência de erros experimentais na confecção da concentração de 10 ppm, pois a redução provocada por este tratamento manteve-se até o final do período de avaliação. Nas concentrações estudadas, o biocida Phylatol não exibiu efeito bactericida dentro das 24 horas de avaliação. Nesse caso é preciso concentrações superiores a 100 ppm para a redução total de células do isolado bacteriano DC<sub>II</sub>.

O biocida Adesol, nas concentrações de 1 ppm e 5 ppm, não exibiu diferenças significativas em termos de concentração e tempos avaliados (Figura 16). Estes resultados sugerem que as baixas concentrações de Adesol testadas parecem não ter afetado a população. A concentração de 50 ppm apresentou diferenças significativas em relação ao controle e aos demais tratamentos, com uma redução de 47,7% das células totais nas 12 primeiras horas. É provável que neste período tenha ocorrido efeito bacteriostático. A redução de 100% das células de DC<sub>II</sub>, observada na última avaliação (24 horas), deve-se ao efeito bactericida que se expressou a partir das 12 primeiras horas, na concentração de 50 ppm.

Os resultados da avaliação com o biocida Ucarcide com as concentrações de 50 e 200 ppm nas 12 primeiras horas não apresentaram diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos (Figura 17). Somente no período de 12 horas, as 3 concentrações (50, 200 e 500 ppm) exibiram

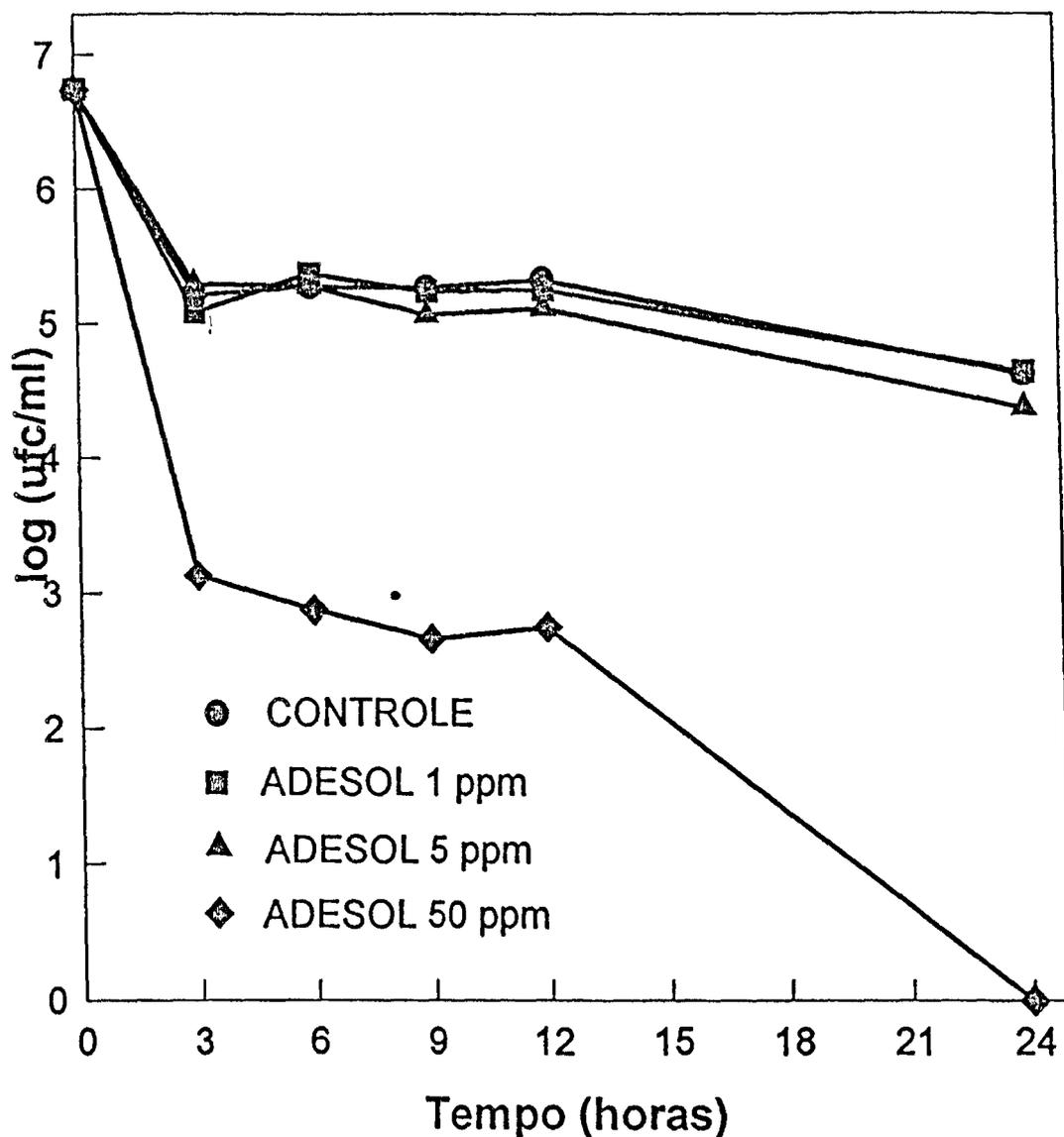


FIGURA 16. Comportamento do isolado bacteriano DC<sub>II</sub> em resposta a adição do biocida Adesol durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
DMS Tratamento = 0,08967.  
DMS Tempo = 0,10025

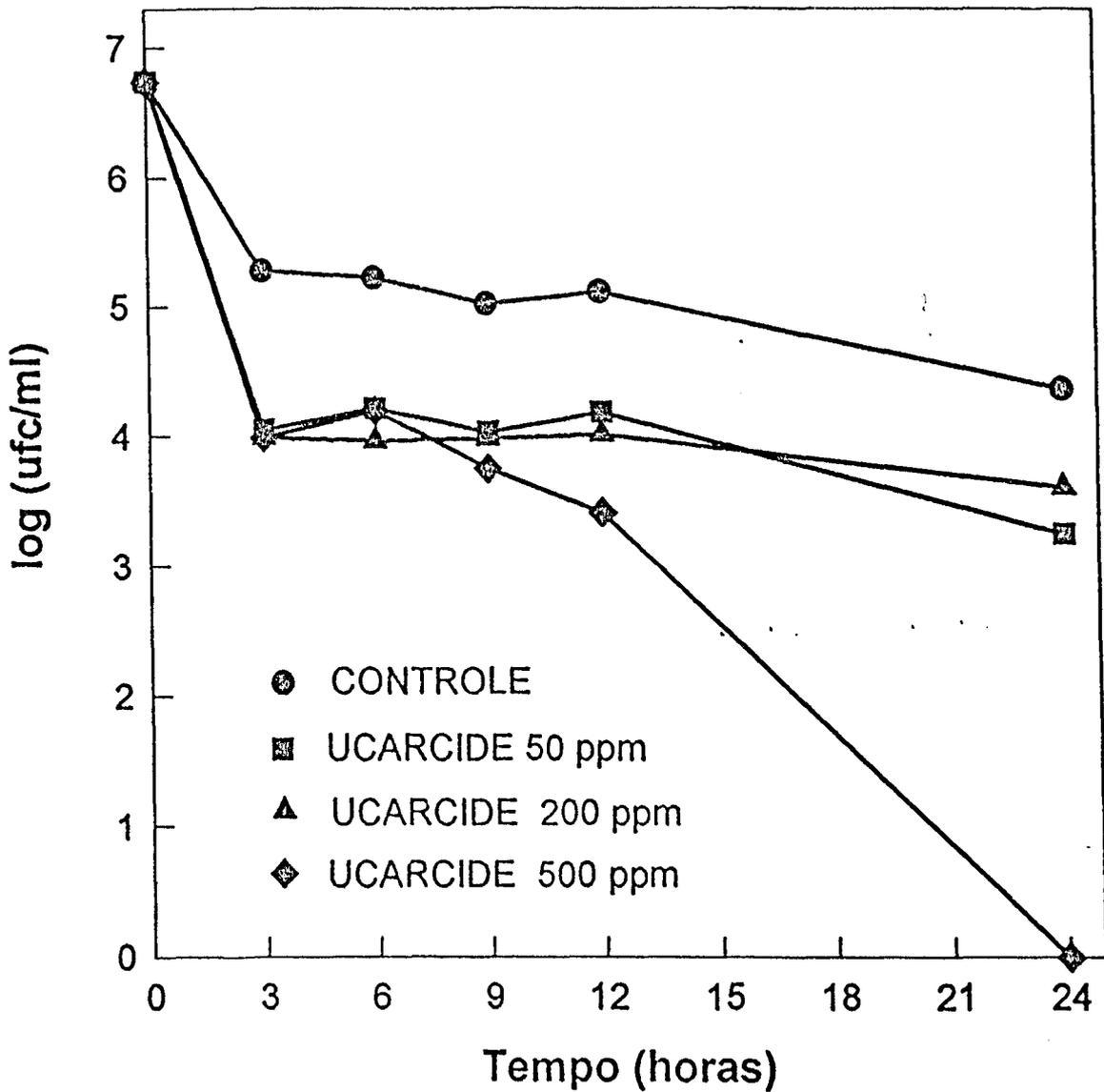


FIGURA 17. Comportamento do isolado bacteriano DC<sub>II</sub> em resposta à adição do biocida Ucarcide durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.

DMS Tratamento = 0,05271

DMS Tempo = 0,05893

diferenças significativas. O efeito bactericida foi observado para a concentração de 500 ppm a 24 horas de avaliação, enquanto que para as concentrações de 50 e 200 ppm pode ter ocorrido apenas efeito bacteriostático. Ao final das 24 horas de avaliação, encontraram-se os seguintes percentuais de redução das células totais 25,6% e 31,1% para as concentrações de 50 e 200 ppm, respectivamente.

Nas primeiras 12 horas de avaliação do efeito do biocida Kathon, as concentrações de 1 e 5 ppm não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle e entre elas (Figura 18). O efeito da concentração de 50 ppm foi mais efetivo com redução de 27% das células totais, ao final das 24 horas. Não foi observado efeito bactericida (100% de redução das células) em nenhum dos tratamentos testados com o biocida Kathon (1, 5 e 50 ppm). Provavelmente, tenha ocorrido apenas efeito bacteriostático.

O tempo de morte de cada isolado bacteriano em resposta aos efeitos dos biocidas avaliados são apresentados resumidamente na Tabela 11.

Os resultados da concentração mínima inibitória não foram correlacionados com os obtidos na avaliação dos biocidas em meio mineral Bushnell-Haas e óleo diesel esterilizado. Esta falta de correlação era esperada, uma vez que a informação da concentração mínima inibitória foi obtida a partir de condições para um meio de cultura específico, não podendo ser extrapolada para outros meios.

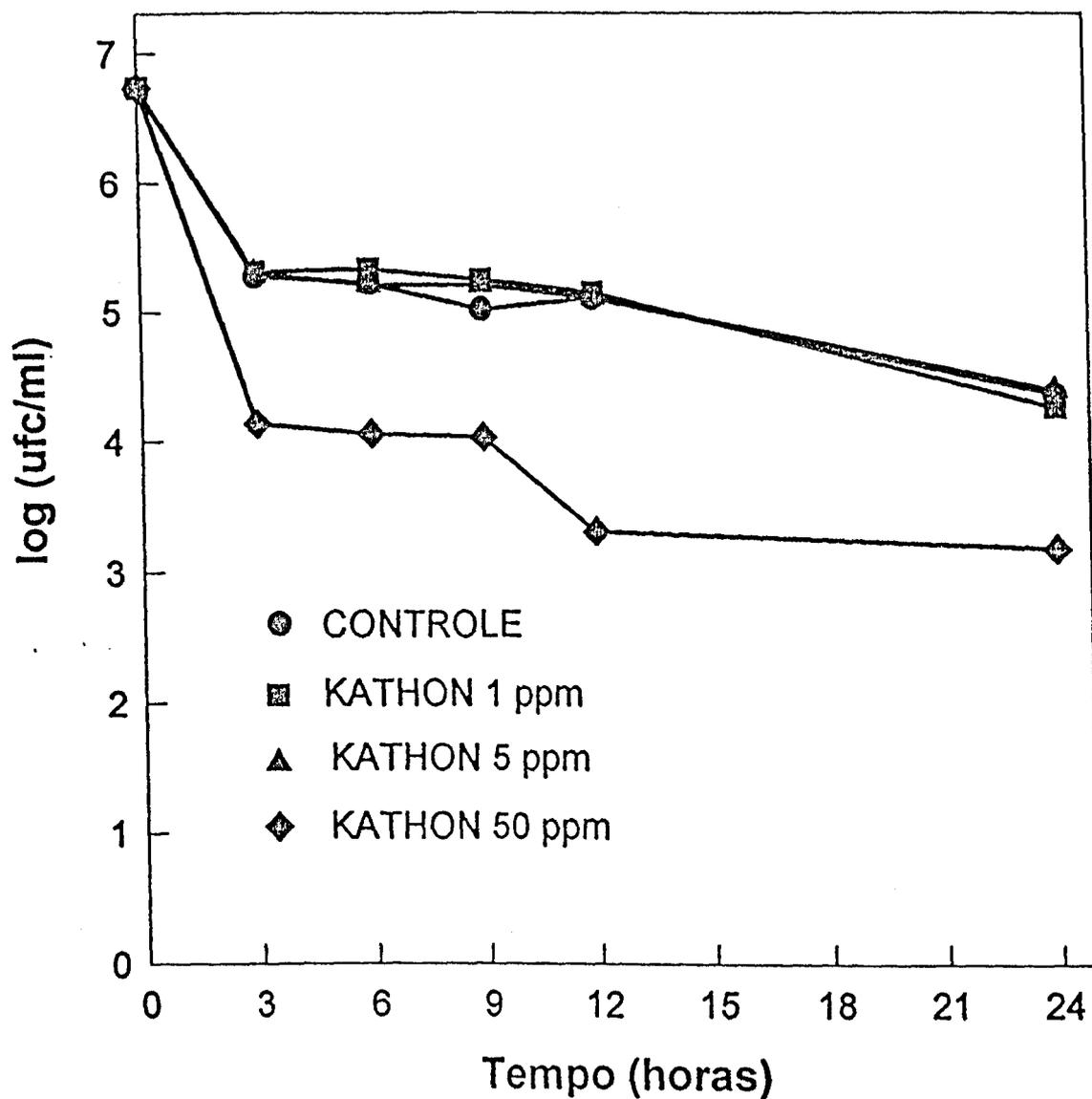


FIGURA 18. Comportamento do isolado bacteriano DC<sub>II</sub> em resposta a adição do biocida Kathon durante um período de incubação de 24 horas em meio mineral Bushnell-Haas/óleo diesel à temperatura ambiente.  
DMS Tratamento = 0,14113  
DMS Tempo = 0,15779

TABELA 11 - Tempo observado de incubação para a detecção do efeito bactericida (tempo de morte, 100% de redução das células).

Biocida	Concentração	Isolados Bacterianos aeróbios			
		DN	DU	DC <sub>I</sub>	DC <sub>II</sub>
Adesol	1	ND	24 h	ND	*
	5	ND	ND	ND	*
	10	3 h	3 h	ND	ND
	50	3 h	3 h	3 h	24 h
	100	3 h	3 h	ND	ND
	500	ND	ND	3 h	ND
	1000	ND	ND	3 h	ND
Kathon	1	3 h	3 h	ND	*
	5	ND	3 h	ND	*
	10	ND	3 h	ND	ND
	50	3 h	ND	12 h	*
	100	3 h	ND	6 h	ND
Ucarcide	10	ND	3 h	ND	ND
	50	ND	3 h	ND	*
	100	3 h	3 h	ND	ND
	200	ND	ND	ND	*
	500	3 h	ND	*	24 h
	1000	3 h	ND	*	ND
Phylatol	2000	ND	ND	3 h	ND
	10	ND	24 h	ND	*
	50	ND	3 h	ND	*
	100	*	3 h	ND	*
	500	*	ND	*	ND
	1000	6 h	ND	*	ND
2000	ND	ND	24 h	ND	

ND - não determinado

\* - não observado em 24 horas

Os organismos gram-negativos DN e DU mostraram-se mais sensíveis aos biocidas testados que os organismos gram-positivos DC<sub>I</sub> e DC<sub>II</sub>. A diferença básica estrutural entre células gram-positivas e gram-negativas, refere-se, principalmente, à estrutura do envelope celular. O envelope de procariotos pode ser definido como um complexo de membranas e macromoléculas associadas formando uma ligação entre o interior e o exterior da célula. O envelope de bactérias gram-positivas e gram-negativas são distintos, em relação à proporção de duas moléculas exclusivas de procariotos, o peptoglicano e o lipopolissacarídeo. (POXTON,1993). Além das diferenças na composição com relação a essas moléculas, as bactérias gram-negativas apresentam a membrana externa, um dos constituintes do envelope celular, cuja função é a de barreira protetora (POXTON,1993). No entanto, essa membrana é mais permeável que a membrana plasmática, permitindo a passagem de pequenas moléculas como a glicose e outros monossacarídeos. A interação específica do biocida isotiazolona com proteínas da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, foi investigada por BROZEL & CLOETE (1994). A composição de aminoácidos presentes na proteína denominada proteína T, revelaram sete grupos de cisteína por molécula. Como o modo de ação do biocida isotiazolona envolve reações específicas com grupos tiol (S-H) da cisteína, possivelmente essa proteína apresenta sítios de maior suscetibilidade à ação biocida do que outras proteínas da membrana externa, acarretando danos irreparáveis à célula.

Mudanças na conformação dessa proteína promove resistência à bactéria. A entrada na célula através de poros pode representar um outro mecanismo de ação bactericida. A presença de proteínas com um arranjo especial dentro da membrana externa, formando verdadeiros poros, garante o fluxo de substâncias meio/célula. Um biocida considerado efetivo é aquele capaz de atravessar o envelope celular e atuar em uma concentração suficientemente alta para exercer ação bactericida. Os agentes antimicrobianos hidrófilos podem penetrar através desses poros presentes na membrana externa, comprometendo as funções vitais das células, através de danos estruturais ao envelope celular, com desacoplamento e inibição de transporte ao nível de membrana e coagulação de constituintes citoplasmáticos (DENYER, 1990; BROZEL & CLOETE, 1994). Neste sentido, provavelmente, reações específicas com proteínas da membrana externa, assim como a permeabilidade facilitada pelos poros, conferiram aos organismos gram-negativos avaliados neste estudo, uma maior suscetibilidade aos biocidas testados com relação aos gram-positivos. Deve-se ainda considerar-se a presença de mecanismos de resistência apresentados pelos microrganismos, tais como: resistência inerente (por exemplo, adaptação do envelope celular), resistência conferida por plasmídios e presença de endosporos (DENYER, 1990; BRÓZEL & CLOETE, 1994; BLOOMFIELD & ARTHUR, 1994).

Os isolados bacterianos gram-positivos DC<sub>I</sub> e DC<sub>II</sub> foram caracterizados como organismos formadores de

endosporos. Em termos gerais, pode-se inferir que a baixa efetividade de alguns biocidas sobre estes isolados seja decorrente da resistência típica de formas esporuladas. Embora vários compostos químicos sejam efetivos como agentes bactericidas e esporicidas, na maioria dos casos, são necessárias concentrações elevadas e um longo tempo de contato para ação esporicida quando comparada à bactericida. Os mecanismos precisos da ação esporicida têm sido pouco estudados e podem envolver a interação de um ou mais sítios dentro da membrana (capa), o córtex ou o protoplasma do endósporo. Em geral, o mecanismo inicial de ação dos biocidas em relação ao esporo é correspondente ao das células vegetativas. Evidências experimentais indicam que a resistência a agentes químicos está associado com a capa e o córtex do esporo, que agiriam como uma barreira impermeável ao protoplasma do esporo. No entanto, segundo BLOOMFIELD & ARTHUR, (1994), no caso do biocida gluteraldeído, o mecanismo de ação esporicida pode ser diferente do bactericida. Esses autores sugerem que a interação do biocida gluteraldeído com o córtex possa ser diretamente responsável pela morte do esporo.

Os biocidas testados Ucarcide (gluteraldeído) e o Phylatol (libera formaldeído) foram considerados pouco efetivos, necessitando concentrações de 2000 ppm ( $DC_I$ ), em alguns casos, para poder haver efeito bactericida.

Os compostos quaternários de amônio apresentam alta atividade bactericida em células vegetativas, definindo-se

com efeito mais a nível esporistático do que esporicida BLOOMFIELD & ARTHUR (1994). Neste estudo, o biocida Adesol (composto quaternário de amônio) e o biocida Kathon (mistura de isotiazolonas) foram os mais efetivos, devido ao efeito bactericida exibido a baixas concentrações.

## 5. CONCLUSÕES

Para as condições experimentais, foi permitido concluir que:

1. O método da membrana filtrante mostrou-se adequado, permitindo o isolamento de 4 fungos filamentosos identificados como *Aspergillius fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Amorphoteca resinae* e de 4 isolados bacterianos caracterizados como prováveis *Bacillus* (DC<sub>I</sub> e DC<sub>II</sub>) e *Pseudomonas* (DU e DN).

2. Foram encontradas bactérias redutoras de sulfato em todas as amostras de sedimento de óleo diesel (naval, comum e urbano).

1. Entre os detergentes biológicos testados, o TRITON-X-100 mostrou-se mais efetivo que o TWEEN 80 na estimativa da população aeróbia e de redutoras de sulfato presente no sedimento biológico de óleo diesel naval, comum e urbano.

2. O isolado bacteriano DU apresentou maior atividade biossurfactante detectada pelo método do xileno.

3. Os biocidas Adesol e Kathon apresentaram 100% de atividade fungicida nas concentrações de 1000 e 2000 ppm na avaliação do teste em placas e cultura líquida com

*Amorphotheca resinae*.

4. Os biocidas Adesol e Kathon apresentaram maior atividade bactericida sobre isolados bacterianos aeróbios.

5. O isolado DC<sub>II</sub> (uma espécie de *Bacillus* sp.) mostrou-se o mais resistente aos biocidas avaliados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLSOPP, D.; SEAL, K.J. 1986. Introduction to biodeterioration. E. Arnold. London, 136p.
- ANDRYKOVITCH, G.; NEIHOF, R.A. 1987. Fuel-soluble biocides for control of *Cladosporium resinae* in hydrocarbon fuels. *Journal of Industrial Microbiology*, Amsterdam, v.2, n.1, p.35-40.
- ANTUNES, M.S.A.; GUERRA, M.T.; LATORRE, W. Perspectivas do mercado brasileiro de biocidas. In: Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, 1., 1992, São Paulo, Campos de Jordão. Anais... p.71-79.
- ATTILI, D.; PINTO, I.M.A.; GRANDI, R.A.P. 1993. Técnicas para detecção, caracterização e identificação de fungos filamentosos. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Toselo", São Paulo, Campinas, 146p.
- BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. 1991. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v.7, n.1, p.80-88.
- BAKANAUKAS, S. 1958. Bacterial activity in JP-4 fuel. Wright air development centre technical report 58,34, armed. Services Technical Information Agency Document n° 151034, p.1-15.
- BAYLEY, C.A.; MAY, M.E. 1979. Evaluation of Microbiological Test Kits for Hydrocarbon Fuel Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.37, n.5, p.871-877.
- BLOOMFIELD, S.F.; ARTHUR, M. 1984. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, Oxford, v.76, n.23, p.91-104.
- BRÖZEL, V.S.; CLOETE, T.E. 1994. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to isothiazolone. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.76, n.5, p.576-582.

- BRUCE, N. 1982. A laboratory study of microbial growth in simulated fuel tanks. *International Biodeterioration Bulletin*, Birmingham, v.18, n.3, p.87-91.
- BRYANT, F.O. 1990. Improved method for the isolation of biosurfactant glycolipids from *Rhodococcus* sp. strain H13A. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.56, n.5, p.1494-1496.
- BRYANT, R.D.; JANSEN, W.; BOIVIN, J.; LAISHLEY, E.J.; COSTERTON, W.J. 1991. Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of steel. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.57, n.10, p.2804-2809.
- BUSHNELL, C.D.; HAAS, H.F. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, v.41, p.654-673.
- CABRAL, D. 1980. Corrosion by microorganisms of jet aircraft integral fuel tanks. Part 1: Analysis of fungal contamination. *International Biodeterioration Bulletin*, Birmingham, v.16, n.1, p.23-27.
- CAMPOS, A.C.; LEMMERS, H.; BIELER, P.A. 1974a. Ensaios realizados em derivados de petróleo: significado e interpretação. *Petróleo e Petroquímica*, Rio de Janeiro, n.18/19, p.17-20.
- CANE, P.A.; FLOODGATE, G.D.; WILLIAMS, P.A. 1983. Biodegradation of beached oil. *Biodeterioration*. London, J. Wiley. v.5, p.373-381.
- CAPPUCCINO, J.G. & SHERMAN, L. 1983. *Microbiology, a laboratory manual*. New York, Addison-Wesley, 466p.
- CLOETE, E. T.; BRÖZEL, V. S. 1992. Practical aspects of biofouling control in industrial water systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Birmingham, v.29, n.3, p.299-341.
- COOPER, D.G. 1986. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*, Oxford, v.3, n.5, p.145-149.
- CONN, H.J.; JENNISON, M.W.; WEEKS, O.B. 1957. Routine tests for the identification of bacteria. In: PELCZAR, M.J. (Ed.) *Manual of Microbiological Methods by the Society of American Microbiologist*, New York, McGraw-Hill. p.140-168.
- COLLINS, C.H.; LYNE, P.M. 1985. *Microbiological methods*, London, Butterworths, p.141.

- COONEY, J.J.; SMUCKER, R.A. 1983. Cytological and physiological responses of *Cladosporium resinae* exposed to hydrocarbons. *Biodeterioration*. London, J. Wiley. v.5, p.361-372.
- DAVIS, J.B. 1967. *Petroleum Microbiology*. Amsterdam, Elsevier. 604p.
- DENYER, S.P. 1990. Mechanisms of action of biocides. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.26, p.89-100.
- DO VALLE, S.M.; VIDELA, H.A. 1992. Biocorrosão do alumínio 2024 e biodeterioração de combustível por contaminantes fúngicos. In: Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, 1., 1992, Campos de Jordão. *Anais...* p.192-199.
- ELPHICK, J.J.; HUNTER, S.K.P. 1968. Evaluating biocidal fuel additives for intermittent use in aircraft fuel systems. *Biodeterioration of Materials*. Amsterdam, Elsevier. p.364-370.
- FINNERTY, W.R.; SINGER, M.E. 1984. A microbial biosurfactant physiology, biochemistry, and applications. *Dev. Ind. Microbiol*, v.25, p.31-146.
- FRANÇA, F.P.; SÉRVULO, E.F.C.; LUTTERBACH, M.T.S.; BARBOSA, G.M. 1992. The detection of microorganisms present in deteriorated diesel oil. In: Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, 1., 1992, São Paulo, Campos de Jordão. *Anais...* p.65-68.
- FURTADO, M.A.L. 1992. Microbial adhesion influence on corrosion behaviour of 2024 aluminium alloy in fuel-water systems. In: Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, 1., 1992, Campos de Jordão. *Livro de Resumos*. (Resumos n.41)
- GARDNER, A.C.; WILLIAMS, G.R. 1982. The growth of *Pseudomonas putida* in fuel samples containing 2-methoxyethanol (2-ME). *International Biodeterioration Bulletin*, Birmingham, v.18, n.3, p.93-94.
- GAYLARDE, C.C. 1990. Advances in detection of microbiologically induced corrosion. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.26, n.1, p.11-22.
- GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.48, n.2, p.301-305.

- GUTHEIL, N.G. 1966. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Uries em Querosene de aviação no Brasil. Porto Alegre, Instituto Tecnológico do RS. 4p. (Boletim n.9)
- GIBSON, G.R. 1990. A review - physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.69, n.6, p.769-797.
- HAGGETT, R.D.; MORCHAT, R.M. 1992. Microbiological contamination biocide treatment in naval distillate fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Birmingham, v.29, n.2, p.87-99.
- HARAYAMA, S.; TIMMIS, K. 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by pseudomonas. *Genetics of Bacterial Diversity*. New York, Academic Press. cap. 8, p.151-174.
- HENDEY, N.I. 1964. Some observations on *Cladosporium resinae* as fuel contaminant and its possible role in the corrosion of aluminium alloy fuel tanks. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v.47, p.467-75.
- HETTIGE, G.E.G.; SHERIDAN, E. 1989a. Interactions of fungi contaminating diesel fuel. *International Bioteriation*, Birmingham, v.25, n.2, p.299-309.
- HETTIGE, G.E.G.; SHERIDAN, E. 1989b. Effects of biocides on microbiological growth in middle distillate fuel. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.25, n.1, p.175-189.
- HILL, E.C. 1987. Fuels. *Microbial Problems in the offshore oil industry*. New York, J. Willey. p.219-230.
- HILL, E.C.; HILL, G.C. 1993. Microbiological problems in distillate fuels. *Transactions Imare*, London, v.104, p.119-130.
- HOMEL, R.K. 1990. Formation and physiological role of biosurfactantes produced by hidrocarbon - utilizing microrganisms. *Biodeterioration*, Dordrecht, v.I, p.107-116.
- IVERSON, W.P. 1987. Microbial corrosion of metals. *Adv. Appl. Microbiol.*, San Diego, v.32, p.1-36.
- KOCH, K.A.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, v.173, n.13, p.4212-4219.

- KOSARIC, N.; GRAY, N.C.C.; CARNS, W.L. 1987. Biotechnology and the surfactant industry. In: *Biosurfactants and Biotechnology, Surfactant Science Series*. New York, M. Dekker. v.25, p.1-19.
- LANG, S.; WAGNER, F. 1987. Structure and Properties of Biosurfactant. In: *Biosurfactants and Biotechnology Surfactant Science Series*, New York. M. Dekker. v.25, p.21-45.
- MAGALHÃES, F.C.M.; ANDRADE, C.A.; WALTER, M.J.F.; SEBASTIAN, G.V.; BARRETO, P.R.C.P.; PENNA, M.; SILVA, E.D.; BARRETO, H.; GUALBERTO, O. 1992. Control of microbiologically induced corrosion (MIC) Associated with Brazilian Petroleum. In: *Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, 1., 1992, Campos de Jordão. Livro de Resumos. (Resumos 43)*.
- MCKENZIE, P.; AKBAR, S.A.; MILLER, J.D.A. 1977. Fungal corrosion of air craft fuel tank alloys (Technical Paper). Institute of Petroleum, London. p.37-50.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v.31, n.3, p.426-428.
- MILLER, R.M.; BARTHA, R. 1989. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.55, n.2, p.269-274.
- NEIHOF, R.; MAY, M. 1983. Microbial and particulate contamination in fuel tanks on naval ships. *International Biodeterioration Bulletin*, Birmingham, v.19, n.2, p.59-68.
- NELSON, M.J.K.; PRITCHARD, P.H. 1988. Trichoroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.54, n.2, p.604-606
- ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. 1981. *Smith's Introduction to Industrial Mycology*. London, Edward Arnold, p.168-209.
- ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. 1981. *Smith's Introduction to Industrial Mycology*. London, Edward Arnold, 398p.
- OKPOKWASILI, G.C.; OKORIE, B.B. 1990. Influence of physico-chemical stress on biodegradability of car engine lubricating oil. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.27, n.3, p.255-264.

- OXOID manual. 1981. Hampshire, Oxoid Ltda., p.258-260.
- PAGE, S.; GAYLARDE, C. 1990. Biocide activity against *Legionella* and *Pseudomonas*. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.26, n.2, p.139-148.
- PELCZAR, M.; RED, R.; CHAN, E.C.S. 1980. *Microbiologia*, São Paulo, McGraw Hill do Brasil, v.1, 566p.
- PITCHER, D.G. 1989. Industrial case histories of microbiological fuel contamination - cause, effect and treatment. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.25, n.2, p.207-218.
- POSTGATE, J.R. 1984. *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge, Cambridge University Press. 240p.
- POXTON, I.R. 1993. Prokaryote envelope diversity. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, Oxford, v.74, n.22, p.1-11.
- RATLEDGE, C. 1988. Hydrocarbons - Products of hydrocarbon - microorganism interaction. *Biodeterioration*. London, Elsevier Applied Science, v.7, p.219-236.
- RATLEDGE, C. 1992. Biochemistry of aliphatic hydrocarbon assimilation and degradation. In: *Simpósio Latino Americano de Biodeterioração*, 1., 1992, Campos de Jordão. *Anais...* p.236-250.
- REDDY, P.G.; SINGH, H.D.; ROY, P.K.; BARVAH, J.N. 1982. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.26, p.1241-1269.
- REILING, H.E.; THANEI-WYSS, L.H.; GUERRA-SANTOS, R.; HIRT, O.; KÄPPELI; FIECHTER, A. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.51, n.5, p.985-989.
- REISFELD, A.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. 1972. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Applied Microbiology*, Washington, v.24, n.3, p.363-368.
- RICHARDSON, J.C.; BLOOM, W.; ALFORD, G.W. 1990. Definition of biofilm consortia from a ground water source on various metal surfaces. In: *Corrosion 90*, Nace Houston, Paper n° 102.

- RIHA, V.F.; SONDOSSI, M.; ROSSMOORE, H.W. 1990. The potentiation of industrial biocide activity with  $\text{Cu}^{2+}$ . II Synergistic Effects with 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.26, n.5, p.303-313.
- ROCHA, C.; SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; VIERNA, L. 1992. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v.8, p.125-128.
- RODRIGUES, E.G.C. 1992. Microbiological contamination of fuels. In: Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, 1., 1992, Campos de Jordão. Livro de Resumos. (Resumos nº 45).
- ROSSMOORE, H.W. 1990. The Interaction of formaldehyde, isothiazolone and copper. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.26, n.2, p.223-233.
- SANDIN, M. 1993. Microbial growth and control in metal-working fluids. *Biodeterioration Abstracts*, Survey, v.7, n.3, p.255-264.
- SCHWARTZ, R.D.; LEATHEN, W.W. 1976. *Petroleum Microbiology. Industrial Microbiology*. New York, Graw-Hill. p.384-411.
- SEELEY, Jr. H.W.; VANDEMAR, P.J. 1965. *Selected exercises from microbes in action*. San Francisco, 223p.
- SHENAN, J.L. 1988. Control of microbial contamination of fuel in storage. *Biodeterioration*. London, Elsevier, v.7, p.248-254.
- SIROCKIN, G.; CULLIMORE, S. 1969. *Practical microbiology*. New York, McGraw-Hill. 157p.
- SMITH, R.N. 1988. Bacterial extra-cellular polymers a major cause of spoilage of middle distillate fuels. In: Proc. 7<sup>th</sup> International Biodeterioration Symposium, London, Elsevier, p.256-62.
- SMITH, R.N.; CROOK, B. 1980. The germination and growth of *Cladosporium resinae* in fuel oil. *Biodeterioration*. London, Elsevier, v.4. p.29-34.
- SMITH, R.N.; MAW, J.M. 1987. The bridge slide culture techniques for fungicide studies in fuel oil. In: *Industrial Microbiological Testing*. Oxford, Blackwell, p.243-245.

- SMITH, R.N. 1991. Developments in fuel microbiology. In: Proceedings of 8<sup>th</sup> International Biodeterioration and Biodegradation Symposium. London, Elsevier, p.112-124.
- SOLANA, M.J.V. 1994. Deterioração de combustíveis (gasolina, nafta, querosene de aviação, querosene de iluminação, diesel naval e diesel urbano) por fungos filamentosos. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS 120p. (Dissertação de Mestrado)
- SONDOSSI, M.L.; RIHA, V.F.; ROSSMORE, H.W.; SYLVESTRE, M. 1993. Factors involved in bactericidal activities of formaldehyde and formaldehyde condensate/isothiazolone mixtures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Birmingham, v.32, n.4, p.243-261.
- TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J. & BOHNEN, H. 1985. Análises de solo, plantas e outras materiais. Porto Alegre. Boletim Técnico de Solos nº 5, Depto. de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 188p.
- VIDELA, H. 1981. Corrosão microbiológica. São Paulo, Edgard Blücher. v.4, 65p.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (Biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, Amsterdam, v.58, n.10, p.3276-3282.
- WATKINSON, R.J.; MORGAN, P.1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, Amsterdam, v.1, p.79-92.
- WASKO, M.P.; BRATT, R.P. 1990. Properties of a biosurfactant produced by the fuel contaminant *Ochrobactrum anthropii*. *International Biodeterioration*, Birmingham, v.27, n.3, p.265-273.
- WILLIAMS, G.R.; CUMINS, E.; GARDENER, A.C.; PALMIER, M.; RUBIDGE, T. 1981. The growth of *Pseudomonas putida* in aytur - aviation turbinefuel. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.50, p.551-557.
- WILLIAMS, G. R.; LUGG, M. 1980. The Significance of bacteria in aviation turbine fuel containing anti-icing additive. *International Biodeterioration Bulletin*, Birmingham, v.16, n.4, p.103-105.

## 7. APÊNDICES

## APÊNDICE 1. DIESEL, DIESEL NAVAL E DIESEL METROPOLITANO

Ensaio	Métodos		Valores de Especificação (1)
	ASTM/IP	MB/MBR	
1. Aspecto	Visual	Visual	Límpido e isento de sólidos em suspensão
2. Água e Sedimentos, % volume	D1796	30	0,05 (max)
3. Cinzas, % peso	D483	47	0,02 (max)
4. Cor ASTM	D1500	351	3,0 (max)
5. Corrosividade ao Cobre (3h a 50GC)	D130	287	2 (máx)
6. Densidade a 20/4GC	D1298	104	0,02 - 0,00
7. Destilação: PIE, GC	D96	45	(2)
50%	-	-	260 a 310
85% GC	-	-	370 (max)
8. Enxofre Total, % peso	D1552/D2622	2902	1,0 (max) (5)
9. Índice de Cetano Calculado	D976	-	45 (mín) (2)
10. Ponto de Fulgor, GC	D93	48	(4)
11. Ponto de Nevoa, GC	D2500	585	(M) (2)
12. Resíduo de Carbono Ramsbottom, % peso	D524	290	0,25 (max) (3)
13. Vis. Cinematica a 37,8GC,cSt	D445	293	1,6 a 6,0

(1) Regulamento Técnico DNC n. 02/93

(2) Ver Recomendação DEPIN 95/92, de 18/05/92

(3) Determinado nos 10% finais de destilação

(4) DIESEL COMUM = 30 (mín), D. NAVAL = 60 (mín)

(5) DIESEL METROPOLITANO = 0,5 (max)

## APÊNDICE 2. Ágar extrato de malte.

Ingredientes	Concentração (g/L)
Peptona	05
Extrato de malte	30
Ágar	15
Água destilada	1000 ml

pH : 5,4 Autoclavar durante 15 minutos à 121°C.  
 Para ágar extrato de malte, adicionar 15 g/L de ágar à formulação.

## APÊNDICE 3. Ágar Nutritivo

Ingredientes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	2
Peptona	5
Cloreto de sódio	5
Água destilada	1000 ml

pH : 7,4 Autoclavar durante 15 minutos à 121°C.  
 Para ágar nutritivo, adicionar 15 g/L de ágar à formulação.

## APÊNDICE 4. Meio mineral Bushnell-Haas.

Ingredientes	Concentração (g/L)
MgSO <sub>4</sub>	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,00
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05

pH : 7,2 Autoclavar durante 15 minutos à 121°C

## APÊNDICE 5. Meio Postgate B.

---

Ingredientes	Concentração (g/L)
Fosfato dihidrogênio potássio	0,5
Cloreto de amônio	1,0
Sulfato de sódio	1,0
Cloreto de cálcio	0,1
Sulfato de magnésio	1,0
Lactato de sódio (60 - 70%)	5,0
Extrato de levedura	1,0
Tioglicolato de sódio	0,1
Ácido Ascórbico	0,1
Sulfato ferroso	0,5
Água destilada	1000 ml

---

pH : 7,3 Autoclavar durante 15 min à 121°C.

## APÊNDICE 6. Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (SANDOZ CHEMICALS).

Ingredientes	Concentração (g/L).
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	10,0
Tartarato de sódio e potássio (TSP)	300,00
Solução de hidróxido de sódio (10% w/v)	160,0 ml
Água destilada	1000 ml

Dissolver o TSP em uma mistura de 160 ml de NaOH e 500 ml de água destilada. Aquecer a solução resultante à 50°C, e adicionar o DNS em pequenas porções. Resfriar e adicionar água destilada para completar o volume de 1000 ml. Armazenar em frasco de vidro escuro.

APÊNDICE 7. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DN, na avaliação do efeito do biocida Phylatol.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	108,2874559	36,0958186	7463,3096	0,00001
Tempo	2	23,2047096	11,60233548	2398,9473	0,00001
Dos*Tem	6	49,3044212	8,2174035	1699,0618	0,00001
Resíduo	36	0,1741117	0,0048364		
Total	47	180,9706984			

Média Geral = 4,195646

Coeficiente Variação = 1,658%

APÊNDICE 8. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DU, na avaliação do efeito dos biocidas Adesol e Phylatol.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	2	47,6412736	23,8206368	699,5829	0,00001
Tempo	4	62,2675165	15,56687918	457,1801	0,00001
Dos*Tem	8	31,6739649	3,9592456	116,2782	0,00001
Resíduo	45	1,5322397	0,0340498		
Total	59	143,1149947			

Média Geral = 3,390333

Coeficiente de Variação = 5,443%

APÊNDICE 9. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>I</sub> na avaliação do efeito do biocida Phylatol.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	115,9664111	38,6554704	3426,3937	0,00001
Tempo	4	10,5883150	2,6470787	234,6352	0,00001
Dos*Tem	12	12,9019775	1,0751648	95,3019	0,00001
Resíduo	60	0,6769007	0,0112817		
Total	79	140,1336042			

Média Geral = 3,207675

Coefficiente Variação = 3,311%

APÊNDICE 10. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>I</sub> na avaliação do efeito do biocida Ucarcide.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	152,0202863	50,6734288	4753,7446	0,00001
Tempo	4	0,3180127	0,0795032	7,4583	0,00016
Dos*Tem	12	0,2494076	0,0207840	1,9498	0,04547
Resíduo	60	0,6395812	0,0106597		
Total	79	153,2272877			

Média Geral = 2,339713

Coefficiente de Variação = 4,413%

APÊNDICE 11. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>I</sub> na avaliação do efeito do biocida Kathon.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	291,6082571	97,2027524106228,9299		0,00001
Tempo	4	50,4832681	12,6208170	13792,7770	0,00001
Dos*Tem	12	61,6093801	5,1341150	5610,8652	0,00001
Resíduo	60	0,0549019	0,0009150		
Total	79	403,7558071			

Média Geral = 1,954237

Coefficiente Variação = 1,548%

APÊNDICE 12. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>II</sub>, na avaliação do efeito com o biocida Ucarcide.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	37,5739415	12,5246472	3189,5350	0,00001
Tempo	4	28,3708574	7,0927144	1806,2354	0,00001
Dos*Tem	12	25,3937405	2,1161450	538,8989	0,00001
Resíduo	60	0,2356076	0,0039268		
Total	79	91,5741471			

Média Geral = 3,981375

Coefficiente de Variação = 1,574%

APÊNDICE 13. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>II</sub>, na avaliação do efeito com o biocida Kathon.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	120,5280898	40,1760299	1427,1290	0,00001
Tempo	4	18,2818758	4,5704690	162,3518	0,00001
Dos*Tem	12	12,6375061	1,0531255	37,4090	0,00001
Resíduo	60	1,6890987	0,0281516		
Total	79	153,1365704			

Média Geral = 4,404375

Coefficiente Variação = 3,809%

APÊNDICE 14. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>II</sub>, na avaliação do efeito com o biocida Phylatol.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	20,2826151	6,7608717	691,7951	0,00001
Tempo	4	11,4051473	2,8512868	291,7532	0,00001
Dos*Tem	12	3,4835292	0,2902941	29,7039	0,00001
Resíduo	60	0,5863764	0,0097729		
Total	79	35,7576679			

Média Geral = 4,169375

Coefficiente de Variação = 2,371%

APÊNDICE 15. Análise de variância do experimento com o isolado bacteriano DC<sub>II</sub>, na avaliação do efeito com o biocida Adesol.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prof.>F
Doses	3	25,1720154	8,3906718	738,4068	0,00001
Tempo	4	9,8668233	2,4667058	217,0782	0,00001
Dos*Tem	12	1,1521634	0,0960136	8,4495	0,00001
Resíduo	60	0,6817926	0,0113632		
Total	79	36,8727948			

Média Geral = 4,714750

Coefficiente de Variação = 2,261%

APÊNDICE 16. Medidas de crescimento em diâmetro (cm) do teste em placas de *Amorphotheca resinae* em presença dos biocidas Phylatol e Ucarcide (1000. e 2000 ppm).

Tempo (horas)		Diâmetro (cm) e desvio padrão (médias de 4 repetições)			
Biocida (ppm)		24	48	72	96
PHYLATOL	0	1,95 ± 0,13	2,45 ± 0,17	3,15 ± 0,13	3,65 ± 0,24
	1000	1,75 ± 0,13	2,50 ± 0,08	3,63 ± 0,22*	3,95 ± 0,13
	2000	1,70 ± 0,08*	2,05 ± 0,31	2,68 ± 0,29*	3,4 ± 0,5
UCARCIDE	0	1,95 ± 0,13	2,45 ± 0,17	3,15 ± 0,13	3,65 ± 0,24
	1000	1,70 ± 0,08*	1,98 ± 0,96*	2,03 ± 0,10*	2,63 ± 0,30*
	2000	1,33 ± 0,06*	1,60 ± 0,00	-	-

\* significativo ao nível de 5%, com relação ao controle.  
- sem crescimento.

APÊNDICE 17. Medidas de crescimento avaliadas em termos de peso seco (gramas) do teste em cultura líquida de *Amorphotheca resinae* em presença de biocidas Phylatol, Ucarcide ao final do período de 30 dias (1000 e 2000 ppm).

Biocida	Peso seco (gramas) e (média de 4 repetições)	
PHYLATOL	0	0
	1000	0,05
	2000	0,08
UCARCIDE	0	0
	1000	0,18*
	2000	0,33*

\* significativo ao nível de 5%.