

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

FABIANA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E FORMAÇÃO
DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE TANQUES
ABASTECIDOS COM COMBUSTÍVEIS DE
ORIGEM FÓSSIL E BIOCOMBUSTÍVEIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
MAIO 2011**

FABIANA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E FORMAÇÃO
DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE TANQUES
ABASTECIDOS COM COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E
BIOCOMBUSTÍVEIS**

**ORIENTADORA: PROF^a. Dra. KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES
CO-ORIENTADOR: PROF^o. Dr. IVAN RAMIRES**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS
MAIO 2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

665.5
S586a Silva, Fabiana Gomes da.
Avaliação da microbiota e formação de biofilme em superfícies de tanques abastecidos com combustíveis de origem fóssil e biocombustíveis / Fabiana Gomes da Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2011.
79 f.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes.
Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Combustível fóssil. 2. Biocombustíveis. 3. Contaminação microbiana. 4. Biofilme. 5. Microbiota. I. Título.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Avaliação da microbiota e formação de biofilme em superfícies de tanques abastecidos com combustíveis de origem fóssil e biocombustíveis”**, de autoria de Fabiana Gomes da Silva, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof.^a Dr.^a Kelly Cristina da Silva Brabes (Orientadora-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Emília Maria Silva
Membro Examinador (UEMS)

Prof.^a Dr.^a Giséle Jane de Jesus
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 31 de maio de 2011

*Aos meus queridos pais Lázaro e
Nair pelo amor, carinho,
dedicação e incentivo em todas
as etapas da minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter me dado o dom da vida e por sempre ter derramado benções em meu caminho, permitindo que eu alcançasse mais essa conquista.

Aos meus pais Lazáro Gomes da Silva e Nair Oliveira Gomes pelo amor, dedicação e preocupação.

Aos meus irmãos Fernando Gomes da Silva e Francielle Gomes da Silva pelo amor, amizade e apoio.

Ao meu namorado Márcio Dantas pelo amor, dedicação, paciência e por muitas vezes ter me auxiliado no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados por ter proporcionado a realização do mestrado.

Á Prof^a. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes pela orientação, ensinamentos transmitidos ao longo do mestrado e acima de tudo pela confiança e amizade.

Ao Prof^o. Dr. Ivan Ramires pela co-orientação e confiança.

Ao Prof^o. Dr. Fábio Juliano Negrão pelos ensinamentos, dedicação e por ter proporcionado a realização da parte laboratorial da pesquisa.

Ao Prof^o. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes pela realização das análises estatísticas.

Ao Prof^o. Dr. Eriton Rodrigo Botero e Prof^o. Dr. Evaristo Alexandre Falcão por terem me auxiliado nas análises para avaliação da biocorrosão.

Ao Profº. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues, Profº. Dr. Andrelson Wellington Rinaldi e Profº. Dr. Gian Paulo Giovanni Fresch pela atenção e ensinamentos.

Á Profª. Dra. Emilia Maria Silva e Profa. Dra. Gisele Jane de Jesus por terem aceito participar como membro da banca examinadora dessa dissertação. E em especial a Profa. Gisele pela confiança e conselhos.

As minhas queridas amigas e companheiras de laboratório Suéllen Machado de Paula e Tiara Kesli Conticelli Teodósio pela amizade, paciência, auxílio na árdua jornada de laboratório e por sempre terem estado ao meu lado nas horas felizes e difíceis dessa pesquisa.

As minhas amigas do coração Ana Beatriz Rigueti Zanardo, Lucimara de Araújo Ramos, Emilly da Silva, Mary Allen de Almeida Hetzel e mais uma vez a Suéllen pela amizade de muitos anos, carinho, companheirismo e por terem participado e contribuído em todas as minhas conquistas.

As minhas amigas Ana Kelly de Souza e Rozália Azambuja pelo carinho e incentivo.

Á minha prima/irmã Ana Paula de Oliveira pela amizade, carinho e pelos momentos de descontração.

Aos demais colegas de mestrado em especial a Karine, Daniele, Fabíola, Péricles e Tiago pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do trabalho Ediane, Juliana, Tatiane, Livia, Flávia, Marcus, Emerson, Paulo, Manfredo, Eduardo, José Carlos e Flávio pela amizade e companheirismo.

As colegas de laboratório Adriana Araújo de Almeida e Quézia Moura da Silva pela amizade e momentos de descontração no laboratório.

Ao aluno de graduação Thiago Silvério Silva por ter auxiliado nas coletas dos combustíveis.

As alunas de graduação Juliana e Laís pelo auxílio e momentos de descontração no laboratório.

As técnicas da Lujan Sanabria, Alexsandra Vila Maior, Débora Brait e Mariana Bento Tatara pela confiança e auxílio no laboratório.

Á Janina Camargo pelo auxílio nas coletas de biodiesel.

Á Fundação ao Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT pelo auxílio financeiro do projeto.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa durante sete meses.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!!!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANP	Agência Nacional de Petróleo
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
cm²	Centímetro quadrado
CPP	Contagem Padrão em Placa
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NMP	Número Mais Provável
°C	Graus Celsius
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial hidrogeniônico
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparações entre os combustíveis analisados pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/mL), proposta pelo teste de médias.....	38
Tabela 2: Comparações entre os combustíveis analisados pelo método de Espectrofotometria no Leitor de Elisa (Log NMP/mL), proposta pelo teste de médias.....	40
Tabela 3: Comparações de pH entre os combustíveis analisados, proposta pelo teste de médias.....	44
Tabela 4: Comparações de turbidez entre os combustíveis analisados, proposta pelo teste de médias.....	45
Tabela 5: Comparações entre os combustíveis referente ao teste de médias do ensaio de formação de biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²).....	52
Tabela 6: Comparações entre a interação combustível/tempo dos combustíveis referente ao teste de médias do ensaio de formação de biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²).....	53
Tabela 7: Comparações entre os combustíveis referentes ao teste de médias do ensaio de formação de biofilme pelo método de Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log UFC/cm ²).....	55
Tabela 8: Análise de variância da microbiota pelo método Contagem Padrão em Placa (Log UFC/mL) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).....	77
Tabela 9: Análise de variância da microbiota pelo método do Número Mais Provável (Log NMP/mL) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).....	77
Tabela 10: Análise de variância da microbiota pelo método de Espectrofotometria no leitor de Elisa dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).....	77

Tabela 11: Análise de variância do pH dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).....	78
Tabela 12: Análise de variância da turbidez dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).....	78
Tabela 13: Análise de variância da formação de biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (etanol e biodiesel).....	78
Tabela 14: Análise de variância da formação de biofilme pelo método de Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log UFC/cm ²) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (etanol e biodiesel).....	78
Anexo	
Tabela 15: Composição dos meios de cultura utilizados para quantificação da microbiota e formação de biofilme das amostras de combustíveis.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração das principais fases da formação e desenvolvimento do biofilme.....	26
Figura 2: Quantificação média da microbiota dos combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS, pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/mL).....	37
Figura 3: Quantificação da microbiota dos combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS, pelo método do Número Mais Provável (Log NMP/mL).....	38
Figura 4: Quantificação da microbiota dos combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS, por Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log NMP/mL).....	39
Figura 5: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa, método do Número Mais Provável e Espectrofotometria para avaliação da microbiota nas amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.....	41
Figura 6: Quantificação média (Log NMP/mL) dos microrganismos presentes nas amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.....	41
Figura 7: Determinação média do pH das amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.....	44
Figura 8: Determinação média da turbidez das amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.....	45
Figura 9: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de gasolina comum em cupons de aço inoxidável provenientes de tanques de combustíveis.....	47
Figura 10: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de gasolina aditivada em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanques de combustíveis.....	48

Figura 11: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de diesel em cupons de aço inoxidável provenientes de tanques de combustíveis.....	49
Figura 12: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de etanol em cupons de aço inoxidável provenientes de tanques de combustíveis.....	50
Figura 13: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de biodiesel em cupons de aço inoxidável provenientes de tanques de combustíveis.....	51
Figura 14: Cinética da formação de biofilme da microbiota isolada das amostras de gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanques de combustíveis, pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²).....	52
Figura 15: Cinética da formação de biofilme da microbiota isolada das amostras de gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanques de combustíveis, pelo de Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log UFC/cm ²).....	54

Apêndice A

Figura 16: Correlação entre os métodos Número Mais Provável (Log NMP/mL) e Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log/mL) para avaliação da microbiota dos combustíveis.....	73
---	----

Apêndice B

Figura 17: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com gasolina comum.....	75
Figura 18: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com gasolina aditivada.....	75
Figura 19: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm ²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com diesel.....	76

Figura 20: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com etanol..... 76

Figura 21: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com biodiesel..... 76

RESUMO

Os microrganismos devido a sua alta capacidade de adaptação e reprodução em um pequeno intervalo de tempo apresentam a característica de se desenvolver em ambientes com condições aparentemente inóspitas, como os combustíveis. Uma vez no interior dos sistemas de armazenamento de combustíveis os microrganismos podem permanecer dispersos na suspensão ou aderidos na superfície sob a forma de biofilme, podendo ocasionar diversos prejuízos a indústria e ao meio ambiente. Portanto, esse estudo objetivou quantificar os contaminantes microbianos presentes em diferentes combustíveis, gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel e induzir a adesão e formação de biofilme em cupons de prova representando a superfície de tanque de combustível. Para a avaliação da microbiota foram utilizados três métodos, Contagem Padrão em Placa (CPP), Método do Número Mais Provável (NMP) e Espectrofotometria no Leitor de Elisa. Em avaliação da formação do biofilme foram testados dois métodos, CPP e Espectrofotometria. Com base nos resultados obtidos verificou-se que os métodos de CPP e Espectrofotometria apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$) para a quantificação microbiana dos combustíveis. O diesel apresentou maior concentração celular com 4,64 Log UFC/mL. Em processo de formação do biofilme pode-se perceber que os dois métodos testados foram significativos ($P < 0,05$). O teste CPP foi o que melhor evidenciou a formação de biofilme. Verificou-se que entre os combustíveis analisados a gasolina comum e o etanol caracterizaram a formação de biofilme. A gasolina comum e o etanol apresentaram concentração celular indicativa de biofilme após o período de 16 horas com 6,02 Log UFC/mL e 7,87 Log UFC/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram que os combustíveis apresentam uma concentração microbiana elevada, bem como evidenciam que em poucas horas é possível observar o processo de formação de biofilme na superfície dos tanques de combustível.

Palavras-chave: Microbiota, Combustíveis de origem fóssil, Biocombustíveis, Biofilme.

ABSTRACT

Microorganisms, due to their high capacity of adaptation and reproduction in a short time, have the feature of being able to develop in environments with seemingly inhospitable conditions, such as fuels. Once inside the fuel storage system, microorganisms may remain dispersed in suspension or adhered to the surface in the form of biofilm, which may cause several damages to the industry and to the environment. Therefore, this study aimed to quantify the microbial contaminants present in various fuels, gasoline, premium gasoline, diesel, ethanol and biodiesel, and to induce the adhesion and biofilm formation on test coupons representing the surface of the fuel tank. To evaluate the microbiota three methods were used, Standard Plate Count (SPC), Method of the Most Probable Number (MPN) and Spectrophotometry in Elisa Reader. In the evaluation of biofilm formation, two methods were tested, SPC and Spectrophotometry. Based on the obtained results, we verified that the SPC and Spectrophotometry methods showed significant effect ($P < 0.05$) for the microbial quantification of fuels. Diesel presented a higher cell concentration with 4.64 Log CFU/mL. In the process of biofilm formation it can be seen that the two tested methods were significant ($P < 0.05$). The SPC test was the one that best demonstrated the formation of biofilms. It was verified that, among the analyzed fuels, gasoline and ethanol characterized the biofilm formation. Gasoline and ethanol presented indicative cell concentration of biofilm after a period of 16 hours with 6.02 Log CFU/mL e 7.87 Log CFU/mL, respectively. These results demonstrate that the fuels present a high microbial concentration, as well as show that in a few hours it is possible to watch the process of biofilm formation on the surface of the fuel tanks.

Key-words: Microbiota, Fossil fuels, Biofuels, Biofilm.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Características dos hidrocarbonetos.....	18
3.1.1 Gasolina.....	18
3.1.2 Diesel.....	19
3.2 Características dos biocombustíveis.....	19
3.2.1 Biodiesel.....	20
3.2.2 Etanol.....	21
3.3 Contaminação microbiana dos combustíveis.....	21
3.3.1 Fatores que influenciam a contaminação microbiana.....	22
3.4 Biofilmes microbianos.....	23
3.4.1 Definição e constituição dos biofilmes.....	23
3.4.2 Formação do biofilme.....	25
3.4.3 Fatores que influenciam a formação do biofilme.....	27
3.4.3.1 Microrganismos.....	27
3.4.3.2 Características da superfície (substrato)	28
3.4.3.3 Características do meio.....	28
3.5 Biocorrosão.....	29

4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Quantificação e isolamento da microbiota dos biocombustíveis e combustíveis de origem fóssil.....	32
4.2 Avaliação do pH e turbidez dos combustíveis	33
4.3 Obtenção de uma suspensão padronizada de células vegetativas dos combustíveis.....	34
4.4 Desenvolvimento do biofilme.....	34
4.4.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável (tanque de combustível).....	34
4.4.2 Condicionamento da superfície dos cupons.....	34
4.4.3 Adesão das células vegetativas aos cupons.....	34
4.4.4 Avaliação das células vegetativas aos cupons.....	35
4.5 Análise dos dados	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Avaliação da microbiota dos biocombustíveis e combustíveis de origem fóssil.....	37
5.2 Avaliação do pH e turbidez.....	43
5.3 Avaliação da formação do biofilme nos cupons de prova.....	46
6 CONCLUSÕES	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICE A	73
APÊNDICE B	75
APÊNDICE C	77
ANEXO	79

INTRODUÇÃO

A indústria petroquímica possui um papel fundamental na comunidade mundial, pois atinge diversos segmentos, desde a indústria de cosméticos até a produção de combustíveis, sendo esse um dos setores mais importantes e influentes. Porém, o uso dessas tecnologias tem ganhado destaque nos últimos anos, uma vez que trata-se de um recurso não renovável e muitas vezes prejudicial ao meio ambiente por contribuir para o aumento do aquecimento global em virtude dos gases de dióxido de carbono agirem diretamente no efeito estufa.

Devido à escassez do petróleo e ao impacto ambiental da queima de combustíveis fósseis há um crescente interesse pela produção de biocombustíveis, em virtude desses serem provenientes de fontes renováveis além de apresentarem vantagens ambientais, econômicas e sociais.

Apesar de nos últimos anos vários trabalhos terem relatado sobre o desenvolvimento de novos combustíveis, bem como tecnologias para melhorar a eficiência dos mesmos, a preocupação com os potenciais problemas microbiológicos que esses podem vir a ter tem ganhado destaque, uma vez que os microrganismos podem causar diversos danos à indústria e ao meio ambiente (Nunes *et al.*, 2008)

A presença de microrganismos em sistemas de armazenamento de combustíveis tem sido relatada há algumas décadas. Apesar dos combustíveis aparentarem ser um ambiente inóspito para a sobrevivência dos microrganismos, vários são os fatores que contribuem para o crescimento microbiano nesses sistemas como, por exemplo: a disponibilidade de nutrientes, presença de água, presença de aditivos, e condições favoráveis de pH e temperatura.

Os microrganismos nos combustíveis podem estar dispersos na suspensão (plactônicos) ou aderidos na superfície dos tanques sob a forma de biofilme (Yemashova *et al.*, 2007). Os biofilmes constituem comunidades microbianas caracterizadas por células ligadas fortemente a um substrato por meio de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e podem levar a diversos prejuízos na indústria de combustíveis, como, por exemplo: desencadear processos de biocorrosão, contaminação dos produtos armazenados levando a perda da qualidade do produto final, formação de

borra e deterioração das tubulações e tanques de combustíveis (Lindsay e Von Holy, 2006).

A biocorrosão pode ser definida como um processo de corrosão induzida e/ou acelerada por microrganismos, sendo que o crescimento microbiano age sobre a extensão do material alterando sua resistência, seja pela interação do biofilme com o substrato ou pela ação dos metabólitos dos microrganismos (Muñoz *et al.*, 2007).

Portanto, a presença de microrganismos nos combustíveis, seja na forma de biofilme ou dispersos na suspensão pode levar a diversos prejuízos na indústria ou até mesmo a desastres ambientais, devido ao rompimento dos tanques. Por isso, se faz de extrema importância estudos relacionados ao crescimento microbiano em sistemas de armazenamento de combustíveis bem como dos processos de biocorrosão induzidos pelos microrganismos, a fim de sugerir metodologias para minimizar esses impactos no meio ambiente e na indústria.

O presente trabalho tem como objetivo quantificar a microbiota de diferentes combustíveis, além de analisar os processos de adesão e formação de biofilme em biocorrosão através da avaliação em cupons de prova sugerindo a superfície de liga metálica em tanque de combustíveis

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Quantificar os contaminantes microbianos presentes em diferentes combustíveis e induzir a formação de biofilme em cupons de prova representando a superfície de tanque de combustível.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar e isolar cepas provenientes de combustíveis fósseis: gasolina comum, gasolina aditivada e diesel;
- Quantificar e isolar cepas provenientes de amostras de biocombustíveis: biodiesel e etanol;
- Avaliar qual melhor análise para quantificação da microbiota dos combustíveis: Contagem Padrão em Placa, Método do Número Mais Provável, Espectrofotometria no leitor de Elisa;
- Induzir a formação de biofilme por cepas isoladas na etapa anterior através de ensaios *in vivo* em cupons sugerindo a superfície de um tanque de combustível;
- Comparar o melhor método para avaliar a formação de biofilme: Contagem Padrão em Placa ou Espectrofotometria no leitor de Elisa;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A indústria de combustíveis tem enfrentado problemas de contaminação microbiana, uma vez que os microrganismos podem causar diversos prejuízos, entre eles biocorrosão de equipamentos, tubulações e produção de compostos indesejáveis através do metabolismo microbiano, os quais alteram as características dos combustíveis.

3.1 Características dos hidrocarbonetos

O petróleo é uma mistura complexa e heterogênea de compostos orgânicos, constituindo cerca de 90% hidrocarbonetos diferentes e pequenas quantidades de enxofre, oxigênio e nitrogênio. O processo de refino do petróleo pode ser dividido em fases, separação, craqueamento e reações químicas, tais como polimerização ou alquilação e mistura. Esses processos podem afetar a composição do produto final, que, por sua vez, influencia a susceptibilidade à contaminação microbiana (Gaylarde *et al.*, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003).

Nas refinarias, o óleo bruto passa por uma série de processos até a obtenção dos produtos derivados, como gasolina, diesel, lubrificantes, nafta e querosene de aviação.

3.1.1 Gasolina

A gasolina é um derivado do petróleo volátil e inflamável, produzido na faixa de destilação de 30 a 220 °C. É formada por uma mistura de diversos tipos de hidrocarbonetos, variando de C4 a C12 átomos de carbono.

Desde a Primeira Guerra Mundial descobriu-se que a adição de compostos oxigenados na gasolina, como o chumbo, aumentava a octanagem, ou seja, a resistência do motor a detonação. No entanto, a utilização de chumbo na gasolina brasileira foi proibida devido a sua alta toxicidade. Hoje no Brasil é autorizada a adição de álcool etílico como o mais correto oxigenado, portanto, são comercializados dois tipos de gasolina: o tipo A e o tipo C. A gasolina do tipo A é derivada diretamente das refinarias

de petróleo e a gasolina tipo C possui a adição de 24 ± 1 (% v/v) de etanol (Wiedemann *et al.*, 2005; Gaylarde *et al.*, 1999).

Na gasolina também podem ser adicionados compostos de tolueno, xilenos, álcoois anidros e aditivos com finalidades específicas como antioxidantes, antidetonantes, anticongelantes, detergente, entre outros, os quais podem agir como fontes de nutrientes para os microrganismos, enquanto outros, como os compostos antidetonantes contendo enxofre que podem servir como inibidores do crescimento microbiano (Gaylarde *et al.*, 1999).

3.1.2 Diesel

O óleo diesel é um derivado de petróleo formado por uma mistura de hidrocarbonetos, variando de C22 a C15 átomos de carbono e produzido na faixa de destilação de aproximadamente 150 a 400 °C. O óleo diesel também possui em sua composição quantidades significativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. No Brasil esse último constituinte apresenta-se em menor nível (máximo 0,5%) em relação aos outros países o que pode favorecer a atividade metabólica microbiana (Gaylarde *et al.*, 1999).

Esse combustível também pode apresentar em sua formulação aditivos com características emulsificantes podendo promover a dispersão do material biológico aderido no tanque. Essa dispersão leva a uma maior exposição dos equipamentos metálicos, devido à maior saturação do meio tornando-os mais suscetíveis ao processo de corrosão, além de disponibilizar mais material orgânico aos microrganismos. Por outro lado, a remoção do biofilme protege o material metálico dos agentes e do processo corrosivo que é causado pela instalação desta película biológica (Bücker, 2009).

3.2 Características dos biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis derivados de fonte de energia renovável, como a biomassa vegetal, que podem substituir parcialmente ou totalmente os combustíveis de origem fóssil. No Brasil, os dois principais biocombustíveis produzidos e comercializados são o etanol, extraído principalmente da cana-de-açúcar e o biodiesel produzido de diversas fontes de oleaginosas e de gordura animal.

3.2.1 Biodiesel

A utilização de óleos vegetais como combustíveis é um fato discutido desde o final do século XIX. No entanto só ganhou importância após a primeira crise do petróleo na década de 1970. A partir de então os óleos vegetais que até agora eram utilizados apenas na indústria alimentícia, passaram cada vez mais serem testados para servir como uma alternativa em substituição ao diesel (Schleicher *et al.*, 2009).

De acordo com a Resolução da ANP 07/2008, o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos derivados de óleos vegetais ou gorduras animais, denominado de B100 (Brasil, 2008). Para a produção de biodiesel pode ser utilizado qualquer tipo de matéria-prima, desde que a mesma contenha ácidos graxos livres ou triglicéridos, tais como óleos vegetais, gorduras animais e gorduras residuais, que podem ser convertidos em biodiesel, e que os produtos finais satisfaçam as rigorosas exigências de qualidade antes de ser aceito como biodiesel (Janaun e Ellis, 2010).

Desta forma, as opções de fontes de matéria-prima para produção dos combustíveis renováveis são bem diversificadas. Dentre as oleaginosas destacam-se a soja, canola, milho, mamona, girassol, amendoim, algodão, palma, babaçu, pinhão-manso, crambe, entre outras. Como gorduras animais destacam-se o sebo bovino, óleo de peixe, óleo de mocotó, banha de porco, entre outras. Outra matéria-prima comumente utilizada na produção de biodiesel é a gordura residual resultante de processamentos domésticos, comerciais e industriais, como lanchonetes, restaurantes e cozinhas industriais, comerciais e domésticas.

Pesquisas recentes demonstram as potencialidades do biodiesel como biocombustível, bem como métodos de extração de óleos de distintas fontes para a produção do mesmo. Porém são poucos os trabalhos que enfatizam os potenciais problemas microbiológicos que esse biocombustível pode apresentar (Nunes *et al.*, 2008).

Segundo Lutterbach *et al.* (2006), o biodiesel tende a sofrer alterações nas suas propriedades ao longo do tempo, devido às reações de natureza hidrolítica, microbiológica e oxidativa com o meio ambiente. Trata-se de processos de degradação que podem ser acelerados pela exposição ao ar, umidade, metais, luz e calor ou mesmo a ambientes contaminados por microrganismos. Um dos processos a que está sujeito o

biodiesel são os processos corrosivos induzidos pela presença simultânea de água e de microrganismos, denominados de biocorrosão, que também pode ocorrer com outros combustíveis, a exemplo do que comumente se verifica em tanques de armazenamento de diesel de origem fóssil.

3.2.2 Etanol

O etanol é um biocombustível também conhecido como álcool etílico produzido principalmente pelo processo de fermentação de diversas formas de biomassa. A cana-de-açúcar é a mais utilizada no Brasil por apresentar mais vantagens energéticas e econômicas. Apesar da maior parte do etanol industrial ser produzido por meio da fermentação, o mesmo também pode ser produzido sinteticamente por meio de derivados do petróleo como o eteno. No Brasil o etanol é utilizado desde a década de 70 quando foi lançado o Programa Proálcool, o qual pode ser considerado o maior programa de combustíveis renováveis do mundo.

O etanol representa uma fonte de carbono e energia para várias populações microbianas, e é degradado por várias enzimas constitutivas das rotas metabólicas dos microrganismos (Alvarez e Hunt, 2002).

3.3 Contaminação microbiana dos combustíveis

A contaminação microbiana em combustíveis têm sido relatada há algumas décadas, sendo que os primeiros trabalhos que reconheceram os efeitos nocivos da contaminação microbiana foram realizados com combustíveis de aeronaves na década de 1930. Porém, os primeiros trabalhos só foram publicados depois de 1960 (Raikos *et al.*, 2011).

O crescimento microbiano em tanques de combustíveis é a causa de diversos problemas operacionais como qualidade dos combustíveis, aumento da utilização de aditivos que podem fornecer nutrientes para os microrganismos, e problemas relacionados à limpeza e armazenagem (Pitcher, 1989).

Os microrganismos podem entrar em contato com os combustíveis de diferentes formas durante o processo de refino, através do solo durante o período de estocagem, durante a lavagem dos dutos que veiculam os combustíveis ou transportados juntamente

com a poeira e água através das aberturas nos tanques (Yemashova *et al.*, 2007; Gaylarde *et al.* 1999). No interior dos tanques de combustíveis os microrganismos podem permanecer aderidos na superfície, formando biofilme, e/ou dispersos no fluido.

A microbiota presente em sistemas de armazenamento de combustíveis provoca um aumento na quantidade de água livre devido a degradação dos hidrocarbonetos, e a atividade metabólica dos microrganismos levando à formação de peróxido e ácido. A presença de microrganismos também provoca o aumento da viscosidade, diminuição da estabilidade térmica e volatilidade que podem levar a problemas de filtração, deterioração do equipamento e conseqüentemente perda da qualidade do produto final (Kartavtseva *et al.*, 1989; Yemashova *et al.*, 2007).

Entre as bactérias capazes de crescer em combustível, destacam-se os gêneros: *Acinetobacter* sp, *Alcaligenes* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Aeromonas* sp, *Achromobacter* sp, *Arthrobacter* sp, *Nocardia* sp, *Rhodococcus* sp e *Micrococcus* sp (Gaylarde *et al.* 1999, Emtiazi *et al.* 2005, Yemashova *et al.* 2007). Para crescer nesse ambiente, os microrganismos exigem a capacidade de metabolicamente transformar os hidrocarbonetos, a fim de empregá-los como fonte de carbono e energia.

3.3.1 Fatores que influenciam a contaminação microbiana

O crescimento microbiano em combustíveis sofre interferência do pH (do combustível), temperatura, oxigênio dissolvido, presença de água, disponibilidade de nutrientes e presença de aditivos. Em condições favoráveis, os microrganismos se desenvolvem e conseqüentemente provocam alguns prejuízos no setor petrolífero.

Os microrganismos ao encontrarem condições ideais para o seu crescimento podem se desenvolver em uma ampla faixa de pH e temperatura, como: pH 4 a 9 e de 4°C a 60°C (Yemashova *et al.*, 2007). Os produtos do metabolismo microbiano podem reduzir o pH do meio acelerando assim o processo de corrosão do tanque de combustível (Videla e Herrera, 2005).

A presença de água é um fator limitante para o crescimento microbiano. Segundo Gaylarde *et al.* (1999) 1% de água é o suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos através da ativação do metabolismo celular e posteriormente gerando a produção de mais água, seqüenciando um ciclo metabólico contínuo.

A água livre é responsável pelo estabelecimento de um conjunto de processos que associados as atividades metabólicas dos microrganismos fornecem condições para a biocorrosão de componentes automotivos, tanques de armazenamento e a formação de sedimentos de origem biológica, denominados de biodepósitos ou conhecidos popularmente como borra (Alves *et al.*, 2006).

Acredita-se que além dos teores de água (máximo de 500 ppm) aceitáveis, pela Agência Nacional de petróleo (ANP), tanto para o diesel, quanto para o biodiesel, um maior teor de água pode ser proveniente pelas adulterações nos tanques de armazenamento do diesel ou durante o transporte facilitando a degradação do biocombustível nas misturas com o diesel ou nas próprias misturas de diferentes fontes de oleaginosas (Nogueira *et al.*, 2009).

Além da presença de água, outro fator limitante para o crescimento microbiano é a disponibilidade de nutrientes como, fósforo, magnésio, potássio e outros microelementos (Gaylarde *et al.*, 1999).

3.4 Biofilmes microbianos

Os microrganismos são considerados extraordinárias formas de vida, seja pela sua capacidade de adaptação ou pela sua facilidade de se reproduzir amplamente em um curto período de tempo. Esses aspectos contribuem para que se distribuam na maioria dos habitats podendo apresentar-se aderidos a uma superfície sob a forma de biofilme ou dispersos (Viana, 2009).

3.4.1 Definição e constituição dos biofilmes

As pesquisas sobre adesão bacteriana tiveram início há algumas décadas, quando observou-se que a colonização bacteriana em superfícies constituía influência positiva na atividade das células em relação à sua forma isolada e não aderida e que esses microrganismos aderidos ou em biofilmes eram responsáveis por processos corrosivos em superfícies imersas em sistemas marinhos aquáticos (Zobell e Allen, 1935; Zobell, 1943; Fletcher, 1987; Zottola, 1997). Empregando técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas, Costerton *et al.* (1978) verificaram que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava fixa (sésseis) a suportes, e não

dispersos em suspensão (planctônicos). Portanto, foi atribuída a definição de biofilme a esse complexo ecossistema de células microbianas com mecanismos fisiológicos diferenciados. Os microrganismos planctônicos são mais susceptíveis as agressões ambientais em relação aos microrganismos que se encontram fixos (Capelletti, 2006).

Na natureza, as bactérias ocorrem predominantemente na forma de biofilmes (Veening *et al.*, 2006), os quais podem ser definidos como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídeos, conhecidos por glicocálix ou exopolissacarídeo (Lindsay e Von Holy, 2006).

Os biofilmes são constituídos por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que representam cerca de 70 a 90% do seu total, além de partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos (Flemming, 1993, Parizzi, 1998; Lindsay e Von Holy, 2006). A matriz polimérica possui papel fundamental na estrutura do biofilme, pois sua composição determina algumas propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes, destacando-se a capacidade de tornar-se impermeável a determinados agentes antimicrobianos, impedindo assim a sua ação (Rohde *et al.*, 2009). Quando em biofilmes, os microrganismos apresentam maior resistência à ação de agentes químicos e físicos, comumente usados em procedimentos de higienização (Mosteler e Bishop, 1993).

A diferenciação entre adesão e biofilme tem sido proposta em função da quantidade de células aderidas por cm^2 . Segundo Andrade *et al.* (1998), é necessário um número mínimo de 10^6 células aderidas por cm^2 , enquanto Ronner e Wong (1993) e Wirtanen *et al.* (1996) consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 e 10^6 células por cm^2 .

O biofilme pode ser formado por vários microrganismos, como microalgas, fungos, protozoários, vírus e bactérias, que podem formar um cultivo puro ou uma associação com diversos microrganismos metabolicamente distintos (Pérez *et al.*, 2007).

As bactérias são os microrganismos mais adaptados em colonizações na forma de biofilmes, devido possuírem características peculiares, tais como: reduzido tamanho, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares. Cerca de 99% das populações de bactérias em

ambientes naturais são encontradas na forma de biofilmes em diferentes estágios de crescimento, destacando-se as *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Flavobacterium* sp, *Alcaligenes* sp, *Staphylococcus* sp e *Bacillus* sp. Biofilmes podem ser formados em uma grande variedade de superfícies, bióticas e abióticas, nos quais os nutrientes os estão disponíveis (Lindsay e Von Holy, 2006).

De modo geral, os biofilmes podem causar danos permanentes e redução da viabilidade de equipamentos, o que traz prejuízo econômico aos mesmos. Além disso, podem diminuir a transferência de calor em trocadores, reduzir o fluxo em tubulações e desencadear processos corrosivos nas superfícies dos equipamentos e dos utensílios (Mafu *et al.*, 1990; Spurlock e Zottola, 1991; Abrishami *et al.*, 1994; Kim e Franck, 1994; Restaino *et al.*, 1994a e 1994b).

O maior problema de contaminação microbiana na indústria de refino de petróleo é a contaminação de produtos armazenados, que pode levar à perda da qualidade, à formação de borra e à deterioração de tubulações e tanques de estocagem, na refinaria e no usuário final do produto (Liu e Li, 2007; Muñoz *et al.*, 2007).

3.4.2 Formação do biofilme

Várias são as teorias sobre a formação do biofilme. A primeira foi proposta por Marshall *et al.*, em 1971, enfocando que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. A primeira fase é considerada ainda um processo reversível, em função da adesão dos microrganismos na superfície que ocorrerem por forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e atração eletrostática. Durante este estágio as bactérias apresentam movimentos browniano, podendo ser removidas por rinsagem. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica (EPS) produzido pela bactéria. Nesta fase, as fímbrias poliméricas ligam a célula bacteriana ao substrato, tornando difícil a remoção do biofilme, tornando necessário utilizar métodos mecânicos, como lavagem ou raspagens físicas mais agressivas.

Dentre as diversas teorias a mais aceita foi a defendida por Bott (1993), que considera a formação do biofilme como resultado da agregação de substâncias orgânicas, microrganismos e produtos derivados do metabolismo dos organismos. Segundo essa teoria o desenvolvimento do biofilme é separado em cinco fases (Figura

1). Primeiro ocorre à adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas a uma superfície sólida em contato com o meio aquoso, constituindo-se um filme condicionador. Após a formação desse filme condicionador ocorre o transporte dos microrganismos e outras partículas do meio aquoso para a superfície sólida acondicionada e conseqüentemente a adesão firme dos microrganismos à superfície. Em seguida, inicia-se o transporte de nutrientes da fase líquida para a interfase líquido-biofilme, bem como no interior do filme microbiano, assim, o biofilme se estabelece, devido o consumo de nutrientes, crescimento e reprodução dos microrganismos aderidos e síntese de polímeros extracelulares. Uma vez o biofilme formado procede-se o transporte de subprodutos do biofilme para o exterior e desprendimento de porções do biofilme devido a fenômenos de erosão superficial ou deslocamento súbito (Viana, 2009).

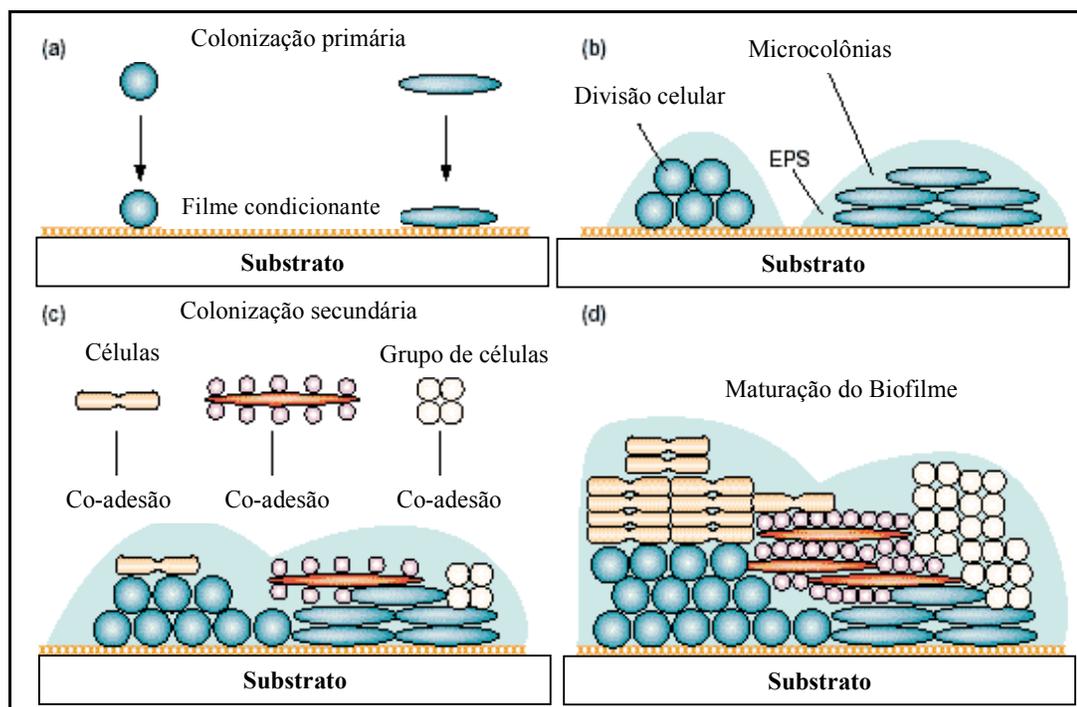


Figura 1: Ilustração das principais fases da formação e desenvolvimento do biofilme (Adaptado de Rickard *et al.*, 2003).

Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a síntese de fibras, que podem ser observadas por microscopia eletrônica. Essas fibras tornam-se mais espessas com o decorrer do tempo, levando também à formação da matriz do

biofilme, dentro da qual outras substâncias orgânicas, inorgânicas e materiais particulados podem existir juntamente com os microrganismos. A produção de exopolissacarídeos permite o aumento da adesão da bactéria à superfície. Caso as células do biofilme sejam reinoculadas em meio de cultura como células planctônicas, haverá redução na produção de exopolissacarídeos (Schwach e Zottola, 1982).

3.4.3 Fatores que influenciam a formação do biofilme

A formação do biofilme está associada a diversos fatores, tais como: microrganismos envolvidos, superfície de adesão e características do meio como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, disponibilidade de água, matéria orgânica, entre outros.

3.4.3.1 Microrganismos

No que diz respeito às características dos microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação do biofilme as estruturas de membrana, como flagelos, pili e cápsula são importantes nesse processo.

Os flagelos são organelas de locomoção, constituídas principalmente de flagelina que confere às bactérias a capacidade de adesão ao substrato na fase inicial, mesmo com o fluxo de corrente em alta velocidade (Liu e Tay, 2002).

Em relação às projeções de fimbria e pili essas estruturas auxiliam a célula tanto na adesão quanto na busca por regiões de maior estabilidade, na qual a colônia pode se fixar e iniciar o desenvolvimento do biofilme.

Os pili são classificados segundo sua função em quatro tipos, numerados em algarismos romanos, sendo que o Pili tipo IV, confere mobilidade ao microrganismo permitindo o mesmo se mover em superfícies semi sólidas, como ágares e sólidas, como o aço inoxidável. Seu movimento permite a uma micro colônia a expansão radial média de, aproximadamente, 1 milímetro por hora, considerando-se as taxas médias de contração e extensão de $0,5\mu$ /segundo (Skerker e Berg, 2001; Mattick, 2006).

3.4.3.2 Características da superfície (substrato)

As características referentes à interação célula-substrato são importantes, uma vez que podem favorecer ou não o desenvolvimento do biofilme. A adesão bacteriana corresponde ao contato entre a superfície microbiana e o substrato influenciado por interações físico-químicas, que incluem pontes de hidrogênio, hidrofobicidade, à carga de superfície, à composição do material bem como à topografia do material, como a rugosidade (Krepsky *et al.*, 2003; Demilly *et al.*, 2006).

A discussão sobre a influência do substrato na formação do biofilme é fato conhecido desde 1984, quando Characklis observou que a extensão da colonização microbiana parece aumentar com o aumento da rugosidade da superfície, devido à superfície do biofilme aumentar a interação com a superfície rugosa do substrato (Viana, 2009).

A condição topográfica da superfície também é um fator importante na formação de biofilmes, pois a deposição de microrganismos ocorre geralmente em áreas com maiores irregularidades (Hilbert *et al.*, 2003). A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de microrganismos, pois representam locais de abrigo menos influenciados pelas forças do fluido (Bott, 1993; Flint *et al.*, 1997).

Em relação à composição do substrato, o biofilme pode ser aderido a vários tipos de substrato. O aço inoxidável, material dos tanques de combustíveis, possui algumas características que auxiliam na adesão dos microrganismos. Segundo informações disponíveis no sítio do American Iron and Steel Institute e da British Stainless Steel Association, o aço inoxidável, descoberto por Harry Brearley, Inglaterra, 1912, corresponde a uma liga composta por ferro e cromo. O aço inoxidável é uma superfície hidrofóbica e, portanto, quanto maior a hidrofobicidade da célula, maior a facilidade de adesão ao substrato.

3.4.3.3 Características do meio

No que diz respeito à fase aquosa algumas características são de extrema importância na adesão bacteriana e no processo de maturação do biofilme. Dentre as características podemos destacar: temperatura, viscosidade, pH, disponibilidade de nutrientes e potencial osmótico (Mansfeld, 2007). Essas características funcionam como sinais podendo estimular ou não a adesão microbiana, uma vez que também podem

influenciar na formação do filme condicionador, que consiste uma das primeiras etapas da formação do biofilme.

Os valores de pH abaixo ou muito acima da neutralidade afetam diretamente o desenvolvimento do biofilme por interferir na força próton motora, que é a força utilizada pela bactéria para gerar o seu gradiente eletroquímico (Pereira, 2001).

Em relação a influência da concentração de nutrientes, verificou-se que quando se aumenta a concentração de nutrientes livres no meio, proporcionalmente há o respectivo aumento no número de microrganismos presentes no biofilme formado, além desse fator ser determinante para a adsorção da camada de moléculas presente no biofilme que antecede a adsorção de bactérias (Rubio *et al.*, 2006).

3.5 Biocorrosão

A corrosão é a transformação de um material pela sua interação química ou eletroquímica em um determinado meio. Segundo Silva e Pontes Filho (2008), vários são os fatores que afetam o processo de corrosão, entre eles, a temperatura, a umidade, os compostos presentes no meio e os microrganismos (bactérias, fungos e/ou vírus).

Portanto, pode-se definir corrosão microbiológica ou biocorrosão como um processo eletroquímico de dissolução metálica facilitado, induzido e/ou acelerado por microrganismos e pelos produtos da sua atividade metabólica (Miranda *et al.*, 2006; Silva e Pontes Filho, 2008), uma vez que os microrganismos influenciam a corrosão ao favorecer reações eletroquímicas que não são comuns em condições livres de microrganismos e pela alteração da superfície de contato com o meio, pela fixação, ou pela liberação de metabólitos no meio (Videla e Herrera, 2005).

Pode-se dizer que o processo de biocorrosão é um sistema formado pela interação de três componentes: metal, solução (fase aquosa) e microrganismos. Sendo assim, esse processo só pode ser iniciado na presença de uma fonte de energia, carbono, um elétron doador, um receptor e na presença de água. Portanto, os microrganismos acabam agindo sobre a extensão e a resistência do material, seja pela sua interação direta (formação de biofilme) e/ou como resultado da ação dos seus produtos metabólicos.

A corrosão induzida por microrganismos está diretamente associada com a eletroquímica na qual, em ambos os casos, tem-se uma região anódica desenvolvendo

um processo de oxidação que leva a dissolução do metal (corrosão) e simultaneamente a redução de algum componente do meio através da reação catódica. Os microrganismos participam deste processo de forma ativa sem alterar a natureza eletroquímica do fenômeno, apenas acelerando o processo de corrosão (Videla, 1991; Muñoz *et al.*, 2007).

O fluxo aquoso é de extrema importância no processo de biocorrosão, pois influencia na formação e maturação do biofilme, além de modificar os parâmetros eletroquímicos do meio (França e Cravo Jr, 2000; Liu e Li, 2007). Outro parâmetro que influencia diretamente na adesão dos microrganismos em superfícies metálicas é a concentração de oxigênio dissolvido na fase aquosa, pois alguns grupos microbianos não toleram baixas concentrações de oxigênio e paralelamente outros grupos como as bactérias redutoras de sulfato (BRS), se desenvolvem através de metabolismo anaeróbio utilizando o sulfato comoceptor final de elétrons (Beech *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2007). Em virtude dessas características as BRS têm sido caracterizadas como as principais responsáveis pelos fenômenos de biocorrosão.

Vários são os microrganismos envolvidos na biocorrosão. Esse envolvimento é correlacionado à formação do biofilme que permite a interação entre os diversos tipos de microrganismos, como bactérias aeróbicas e anaeróbicas, além de fungos, alguns tipos de algas e protozoários.

A formação e o desenvolvimento do biofilme é o principal fator para acelerar/induzir o processo de corrosão, principalmente pela produção do EPS, que funciona como uma interface entre a célula e à superfície do material. Sendo assim, atua modificando as características eletroquímicas da superfície do metal (Beech, 2004; Antony *et al.*, 2008).

Pode-se dizer que a corrosão microbiana, é um dos principais problemas encontrados nos dutos que veiculam água, óleo, gás ou minério, sendo responsável por vários prejuízos nesses setores. Esse processo corrosivo induzido por microrganismos pode deteriorar o produto transportado, causar seu vazamento e provocar paradas não programadas, além de troca de peças e limpeza constante. Outro problema enfrentado pelas indústrias de combustíveis é a contaminação dos produtos armazenados, que podem levar à perda da qualidade, à formação de borra e à deterioração de tubulações e tanques de estocagem, na refinaria e no usuário final (Liu e Li, 2007; Muñoz *et al.*, 2007).

Segundo dados da Petrobrás, o processo de corrosão é particularmente preocupante no setor petrolífero, pois podem provocar falhas de equipamentos ou componentes quando em serviço, causando acidentes catastróficos para o ecossistema. Como consequência, a partir da década de 80, houve um aumento na utilização de ligas resistentes à corrosão. O uso de técnicas adequadas de amostragem e acompanhamento, complementadas por metodologias microbiológicas, microscópicas e eletroquímicas são necessárias para entender os efeitos resultantes da atividade microbiana e o papel dos biofilmes no processo de corrosão com o intuito de implementar medidas adequadas de prevenção (Videla, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados.

Para efetuar a quantificação, o isolamento e a formação do biofilme foram analisadas amostras de combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, aditivada e diesel) e de biocombustíveis (etanol e biodiesel).

As amostras de gasolina comum, gasolina aditivada, diesel e etanol foram provenientes de três postos de combustíveis localizados na cidade de Dourados, MS. Foram analisadas três coletas em cada posto, totalizando nove amostras de cada tipo de combustível. Também foram analisadas dez amostras de biodiesel de extração de conversão industrial, provenientes de uma planta produtora de biodiesel, localizada na cidade de Dourados, MS.

Os meios de cultura utilizados nessas etapas foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e esterilizados a 121°C por 20 minutos e resfriados a 40°C, antes do uso, sendo que a composição dos meios é apresentada no Anexo 1.

A metodologia utilizada nos ensaios de quantificação microbiana e formação de biofilme foi adaptada de Rossi (2008) e Rodríguez-Rodríguez (2009).

4.1 Quantificação e isolamento da microbiota dos biocombustíveis e combustíveis de origem fóssil

A população microbiana foi mensurada na amostra através da Contagem Padrão em Placa, Método do Número mais Provável (NMP) e por Espectrofotometria no leitor de Elisa, a fim de verificar qual método é mais eficaz na quantificação das células microbianas nas amostras de combustíveis em estudo.

Para a realização do método de Contagem Padrão em Placa, primeiro foi realizada a diluição seriada. Foram pipetados 10 mL da amostra em um erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina denominada 10^{-1} , a partir da qual foram realizadas as demais diluições. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo contendo 9 mL de solução salina (diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente até a obtenção da diluição de 10^{-5} . Para o plaqueamento em superfície, 0,1 mL de amostra de cada tubo, nas diferentes

diluições preparadas, foi transferido para as placas Petri contendo *Plate Count Ágar* (PCA) em duplicata, sendo que as mesmas foram á incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Para a realização do método do Número Mais Provável também procedeu-se a diluição seriada e a partir das mesmas foi inoculado 1 mL em uma série de três tubos contendo Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), os quais foram incubados a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A densidade bacteriana foi determinada pela combinação dos resultados dos tubos positivos e negativos em uma tabela de probabilidade designada por tabela do NMP. Os tubos foram considerados positivos quando apresentaram crescimento e/ou produção de gás.

Em paralelo ao método do NMP também foi realizada a técnica de Espectrofotometria no leitor de Elisa, para tanto retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada tubo da série de três da etapa anterior e colocou-se na cubeta para leitura no aparelho ajustado em 630 nm de absorbância. Essas leituras foram realizadas nos períodos de incubação de 24 e 48 horas.

O isolamento dos microrganismos foi realizado através da técnica de esgotamento. Portanto, de cada tubo da série de três do método do NMP foi retirada uma alçada, e semeada em placas de Petri contendo *Plate Count Ágar* (PCA), para o isolamento de bactérias mesófilas aeróbias, e em placas com *Ágar Sabouraud Dextrose* (SDA) para o isolamento de fungos filamentos e leveduriformes. As placas foram incubadas invertidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para as bactérias e a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 7 dias para os fungos.

Após a etapa de isolamento as cepas bacterianas foram acondicionadas em frascos contendo 2,4 mL de Caldo BHI e 0,6 mL de glicerol e os fungos foram acondicionados em tubos com *Ágar Sabouraud* inclinado. As cepas foram mantidas sob refrigeração, para desenvolvimento de biofilme e posterior identificação.

4.2 Avaliação do pH e turbidez dos combustíveis

As análises de pH foram realizadas com um aparelho pHmetro da marca Hanna, exceto das amostras de biodiesel que foram analisadas com fita de pH.

A turbidez foi avaliada por meio de um aparelho turbidímetro marca Instrutherm.

4.3 Obtenção de uma suspensão padronizada de células vegetativas dos combustíveis para formação do biofilme

Para a obtenção de uma suspensão padronizada as cepas isoladas de cada combustível foram incubadas em um erlenmeyer contendo 50 mL de Caldo BHI a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente esse volume foi transferido para um erlenmeyer de 450 mL de Caldo BHI, sendo incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para garantir que todas as cepas fossem ressuspendidas.

4.4 Desenvolvimento do biofilme

Os biofilmes foram desenvolvidos em cupons de aço inoxidável, provenientes de um tanque de combustível, com dimensões de 1 cm^2 .

4.4.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável (tanque de combustível)

Os cupons utilizados foram higienizados da seguinte maneira: as superfícies foram limpas por escovação, usando-se escova de cerdas macias, água e detergente líquido neutro. Em seguida, foram rinsadas com água destilada e imersas em acetona, durante 30 minutos, para intensificar a remoção de gordura. Posteriormente, foram imersas em solução NaOH a 1%, por 1 hora. Após este tempo os cupons foram novamente rinsados e secos, em temperatura ambiente. As superfícies foram esterilizadas em autoclave, a 121°C , durante 15 minutos (Parizzi *et al.*, 2004).

4.4.2 Condicionamento da superfície dos cupons

Com o objetivo de obter uma superfície de aço inoxidável coberta por um filme de condicionamento semelhante ao encontrado em ambiente industrial, os cupons foram imersos durante uma hora nas amostras de combustíveis à temperatura ambiente.

4.4.3 Adesão das células vegetativas aos cupons

Em um erlenmeyer foram colocados com o auxílio de uma pinça, 33 cupons de prova, previamente preparados como descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2. Um volume de 150 mL de combustível foi acrescentado ao erlenmeyer, de maneira que os cupons

permaneceram submersos e adicionou-se 150 mL de suspensão de bactérias padronizada. Para cada amostra de combustível (gasolina comum, gasolina aditiva, diesel, etanol e biodiesel) foi preparado o ensaio descrito acima para verificar a adesão bacteriana aos cupons, sendo que as análises foram realizadas em triplicata.

O tempo de incubação foi suficiente para proporcionar a obtenção de um biofilme final de aproximadamente 10^6 UFC de células aderidas, de forma que os cupons foram retirados de cada erlenmeyer, com uso de uma pinça esterilizada, nos tempos 0, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 e 168 horas para verificar a formação de biofilme na superfície dos cupons.

4.4.4 Avaliação da adesão das células vegetativas nos cupons

Para avaliar a adesão das células vegetativas nos cupons foram utilizados dois métodos: Contagem Padrão em Placa (CPP) e Espectrofotometria no leitor de Elisa.

Em cada período de incubação em estudo foram retirados três cupons, um para analisar a formação do biofilme através da Contagem Padrão em Placa e os outros dois para as análises de biocorrosão.

Para a avaliação da formação do biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa, após o período de incubação, os cupons foram retirados do combustível com o auxílio de uma pinça esterilizada e, posteriormente foram acondicionados sobre um papel filtro previamente esterilizado para secarem. Em seguida, os cupons foram colocados em frascos esterilizados contendo solução salina para remoção das células não-aderidas ou planctônicas. Após a remoção das células planctônicas os cupons foram transferidos para tubos Corning® contendo 10 mL de solução salina e o conteúdo destes foi homogeneizado em agitador de tubos Vortex durante 10 minutos. Das suspensões homogeneizadas foram retiradas alíquotas para o preparo das diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-8}) em tubos de ensaio contendo 9 mL solução salina.

Para quantificação das células microbianas aderidas foi utilizada a técnica do plaqueamento em superfície em Ágar PCA, com placas em duplicata, incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após a contagem das colônias, foi determinado o número de UFC/cm².

Em paralelo foi analisada a formação do biofilme por meio de espectrofotometria de Elisa. Para tanto, após os cupons serem agitados no Vórtex uma

alíquota da suspensão homogeneizada foi transferida para uma placa de Elisa, com fundo reto, para leitura em duplicata no comprimento de onda de 630 nm de absorvância no Espectrofotômetro de Elisa.

4.5 Análise dos dados

Os resultados foram expressos na forma de gráficos e tabelas, e a análise estatística referente aos dados de microbiota, pH, turbidez e formação de biofilme dos combustíveis foram realizadas através do pacote estatístico SAEG 9.1 (UFV, 2007) e as médias comparadas através do teste de Tukey adotando-se 5% de nível de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da microbiota dos biocombustíveis e combustíveis de origem fóssil

Os combustíveis aparentam ser um ambiente desfavorável para o crescimento microbiano, no entanto, existem relatos de microrganismos em sistemas de armazenamento de combustíveis.

Para a avaliação da microbiota foram analisadas amostras de biocombustíveis (biodiesel e etanol) e combustíveis de origem fóssil (diesel, gasolina comum e aditivada), as quais foram submetidas a três métodos de quantificação: Contagem Padrão em Placa (CPP), o método do Número Mais Provável (NMP) e Espectrofotometria no leitor de Elisa.

A avaliação da microbiota pelo método CPP resultou em uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os combustíveis. A Figura 2 e Tabela 1 apresentam os valores médios de microrganismos e os coeficientes de comparação para cada tipo de combustível.

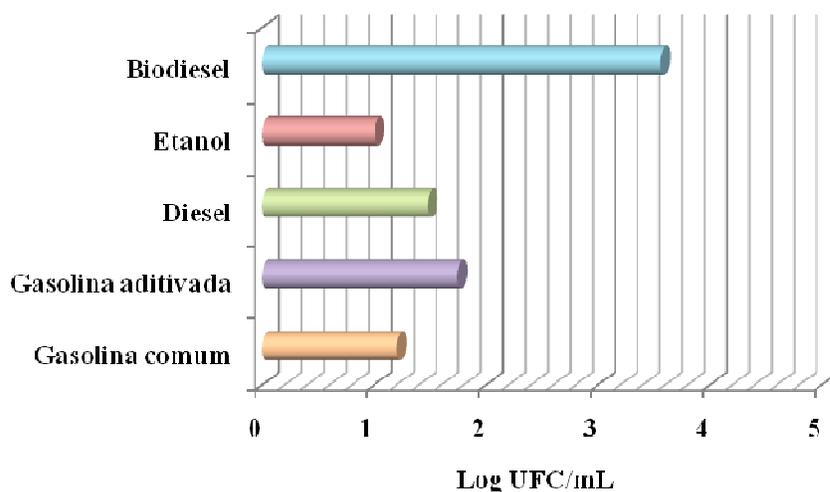


Figura 2: Quantificação média da microbiota dos combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/mL).

Tabela 1: Comparações entre os combustíveis analisados pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/mL), proposta pelo teste de médias.

Combustíveis	Médias (Log UFC/mL)	Comparações
Biodiesel	3,565	A
Gasolina aditivada	1,7455	AB
Diesel	1,4779	B
Gasolina comum	1,2054	B
Etanol	1,0057	B

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Pode-se verificar que dentre os combustíveis o biodiesel apresentou maior crescimento microbiano com 3,56 Log UFC/mL, seguido da gasolina aditivada com 1,74 Log UFC/mL, diesel com 1,47 Log UFC/mL, gasolina comum com 1,20 Log UFC/mL e etanol com 1,00 Log UFC/mL.

Em relação à quantificação da microbiota pelo método do NMP observou-se que não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os combustíveis (Figura 3). O diesel apresentou maior crescimento microbiano com 4,58 Log NMP/mL seguido das amostras de biodiesel, gasolina aditivada, comum e etanol, com 3,32 Log NMP/mL, 3,18 Log NMP/mL, 3,17 Log NMP/mL e 2,84, respectivamente.

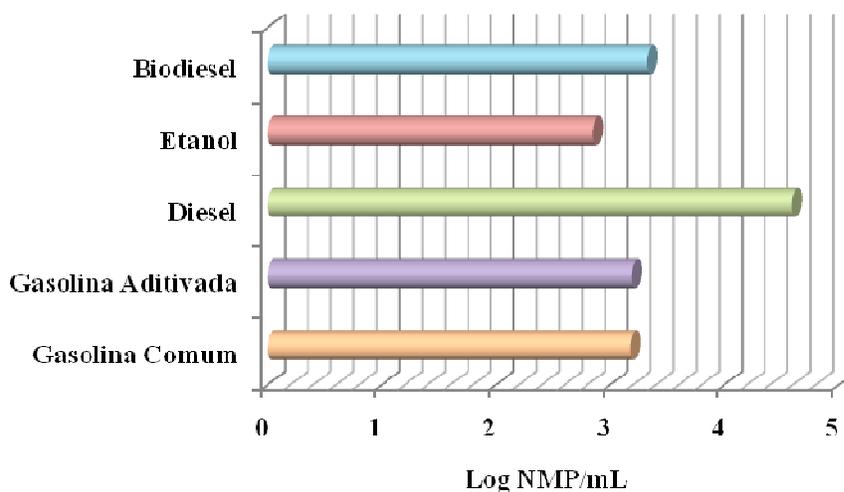


Figura 3: Quantificação da microbiota dos combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS, pelo método do Número Mais Provável (Log NMP/mL).

A microbiota dos combustíveis também foi avaliada pelo método de Espectrofotometria. Os resultados obtidos por essa técnica são apresentados em absorbância, por isso os mesmos foram transformados para Log NMP/mL pela equação da reta obtida pela correlação dos métodos NMP e Espectrofotometria (Apêndice A).

Pelo método de Espectrofotometria foi observada interação significativa ($P < 0,05$) entre os combustíveis. A Figura 4 e Tabela 2 apresentam os resultados da microbiota pelo método de Espectrofotometria e as comparações referentes ao teste de média, respectivamente. Pode-se perceber que as amostras do combustível diesel apresentaram maior crescimento microbiano com 4,69 Log NMP/mL, seguido da gasolina aditivada com 3,51 Log NMP/mL, gasolina comum com 3,34 Log NMP/mL, biodiesel com 3,32 Log NMP/mL e etanol com 2,84 Log NMP/mL.

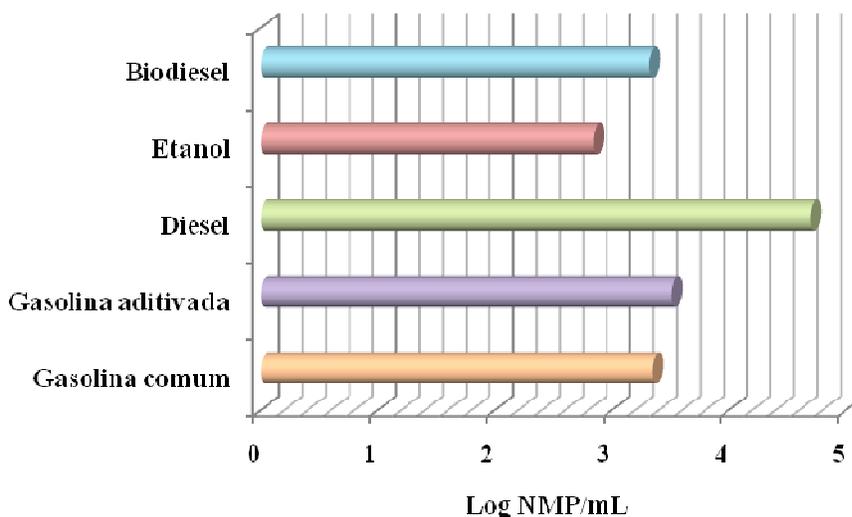


Figura 4: Quantificação da microbiota dos combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS, pelo método de Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log NMP/mL).

Tabela 2: Comparações entre os combustíveis analisados pelo método de Espectrofotometria (Log NMP/mL) no leitor de Elisa, proposta pelo teste de médias.

Combustíveis	Médias (Log NMP/mL)	Comparações
Diesel	4,6992	A
Gasolina aditivada	3,5124	AB
Gasolina comum	3,3491	B
Biodiesel	3,3217	B
Etanol	2,8454	B

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Pode-se perceber conforme descrito acima que os métodos CPP e Espectrofotometria foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) para quantificação dos microrganismos presentes nos combustíveis. Apesar do método do NMP não ter apresentado diferença estatística significativa sugere-se que ele seja mais adequado que o CPP, pois como a inoculação é feita em meios líquidos, a técnica do NMP apresenta algumas vantagens em relação a CPP, como a possibilidade de inocular quantidades maiores da amostra, aumentando-se proporcionalmente o meio de cultura. Fato que confere á técnica uma sensibilidade maior do que a do método CPP e uma grande flexibilidade no estabelecimento no limite de detecção. Outra vantagem da técnica do NMP é a introdução de etapas de recuperação de células injuriadas, ou seja, meios não seletivos podem ser utilizados para a inoculação inicial, os quais são favoráveis para microrganismos injuriados e depois transferidos para meios de cultura seletivos (Silva *et al.* 2010).

Portanto, comparando-se os três métodos de contagem microbiana (Figura 5), pode-se inferir que os métodos de NMP e T foram melhores para quantificação dos microrganismos presentes nos combustíveis.

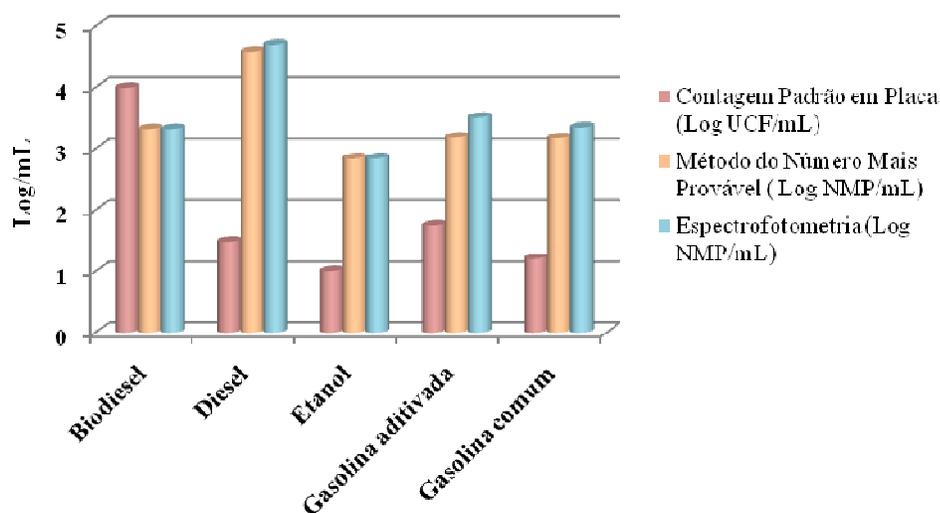


Figura 5: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa, método do Número Mais Provável e Espectrofotometria para avaliação da microbiota nas amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.

Em relação aos combustíveis que apresentaram maior crescimento microbiano, com base nos métodos sugeridos como ideais, NMP e Espectrofotometria, pode-se verificar que o diesel obteve maior crescimento médio com de 4,64 Log NMP/mL, seguido da gasolina aditivada com 3,34 Log NMP/mL, biodiesel com 3,32 Log NMP/mL, gasolina comum com 3,26 Log NMP/mL e etanol com 2,84 Log NMP/mL (Figura 6).

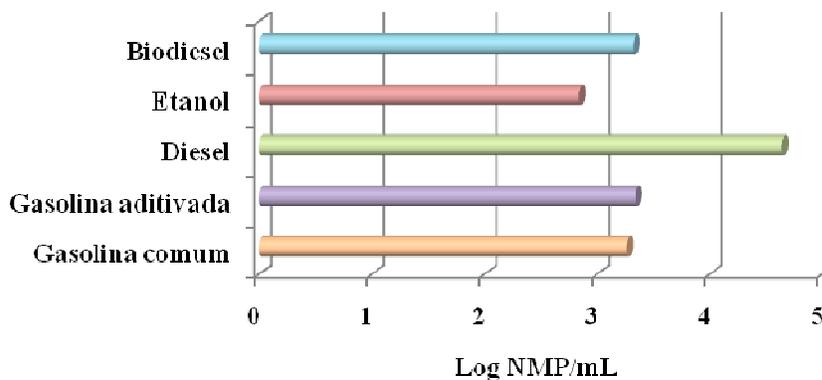


Figura 6: Quantificação média (Log NMP/mL) dos microrganismos presentes nas amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.

Esses resultados são condizentes com os apresentados por Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2009), em um estudo similar realizado com os combustíveis diesel, gasolina e querosene de quatro distribuidoras da região da Costa Rica, no qual verificou-se maior contagem microbiana nas amostras de diesel. Esses resultados também foram relatados por Bento e Gaylarde (2001) e Gaylarde (1999) em estudos realizados com os combustíveis no Brasil.

Segundo Gaylarde (1999), o diesel apresenta essa tendência microbiológica, pois possui uma maior quantidade e variedade de aditivos em relação aos outros combustíveis. Esses aditivos constituem fonte de micronutrientes e carbono para os microrganismos, além de facilitar o acesso dos hidrocarbonetos aos microrganismos (Leahy e Colwell 1990).

Outro fator que tem sido evidenciado como fonte de biodegradabilidade do diesel é a adição de biodiesel a esse combustível, aumentando assim a formação de biomassa microbiana na interface óleo água (Bucker *et al.* 2011), uma vez que a partir de 1 de janeiro de 2010 o óleo diesel comercializado em todo o Brasil passou a ter adição de 5% de biodiesel. Esse percentual de adição foi aprovado pela Resolução 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE).

Além do diesel as amostras de gasolina aditivada, gasolina comum, biodiesel e etanol também apresentaram contagem microbiana significativa (Figura 6). Estudos recentes também têm evidenciado a presença de microrganismos no biodiesel. Lutterbach *et al.* (2009) em um estudo realizado no Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) constatou que a microbiota do biodiesel constitui-se de 99-100% de bactérias anaeróbias.

Apesar do etanol ter apresentado a menor contagem microbiana em relação aos outros combustíveis, ele favorece o crescimento microbiano, uma vez que possui uma alta solubilidade, além de enzimas constitutivas que associadas as rotas metabólicas dos microrganismos degradam o etanol (Powers *et al.* 2001; Alvarez e Hunt, 2002).

Os dois tipos de gasolina analisados (gasolina comum e aditivada) também apresentaram contagem microbiana significativa. Pode-se sugerir que a gasolina aditivada apresentou maior contagem em relação à gasolina comum devido à presença de mais aditivos, além de uma maior quantidade de álcool que garante assim uma maior solubilidade.

A capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos deve-se, segundo Leahy e Colwell (1990) a três mecanismos inter-relacionados: indução e/ou repressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e seleção de cepas capazes de transformar tais compostos.

Os hidrocarbonetos podem ser inativos, inibidores ou estimulantes para os microrganismos (Lima, 1975). Os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como única fonte de matéria orgânica para o desenvolvimento de seus processos vitais. Do imenso número de microrganismos conhecidos, apenas uma centena de gêneros é citada na literatura como sendo capaz de utilizar hidrocarbonetos em seu metabolismo. A maioria é constituída por bactérias, havendo também fungos filamentosos e leveduras. As algas têm importância na formação do petróleo, mas não são citadas como utilizadores de hidrocarbonetos.

Segundo Chao *et al.* (2010), bactérias, fungos filamentosos e leveduras tem sido evidenciados como fontes de biodegradabilidade dos hidrocarbonetos. A maioria dos microrganismos isolados de sistemas de armazenamento de combustível pertence aos gêneros: *Bacillus* sp, *Cladosporium* sp, *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Aerobacter* sp, *Alcaligenes* sp, *Brevibacterium* sp, *Clostridium* sp, *Corynebacterium* sp, *Enterobacter* sp, *Flavobacterium* sp, *Micrococcus* sp, *Moraxella* sp, *Ochrobactrum* sp e *Pasteurella* sp.

Com base nos resultados apresentados pode-se sugerir que os combustíveis fósseis e biocombustíveis são ambientes favoráveis para o crescimento microbiano. Uma vez no interior dos tanques de combustíveis esses microrganismos podem se aderir à superfície, induzindo entre outros problemas o processo de biocorrosão. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que tem relatado a presença de microrganismos em sistemas de armazenamento de combustíveis.

5.3 Avaliação do pH e turbidez

As condições de pH e turbidez são fatores limitantes que podem favorecer ou não o crescimento microbiano.

As amostras de combustíveis foram significativas para pH ($P < 0,05$). Pode-se observar que as amostras de etanol apresentaram os valores mais altos de pH com 8,04

seguido da gasolina comum com 7,25, gasolina aditivada com 7,17, diesel com 6,00 e biodiesel com 5,5 (Figura 7).

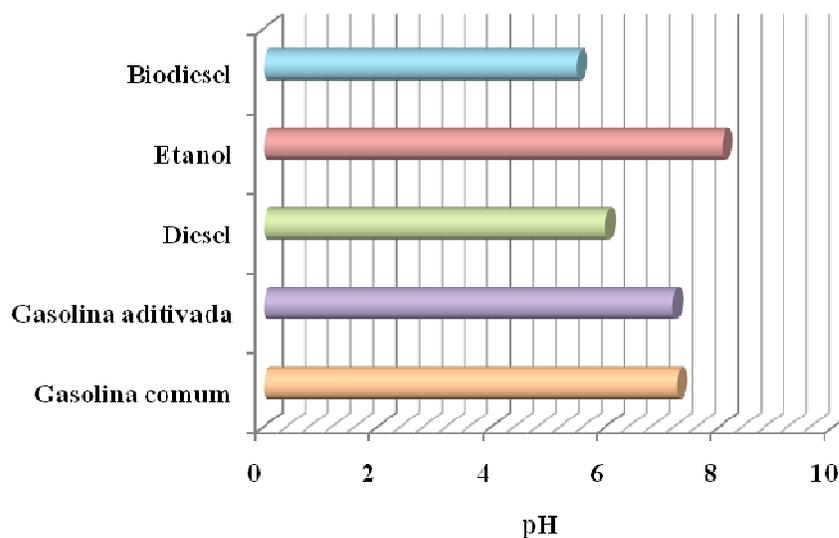


Figura 7: Determinação média do pH das amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.

A Tabela 3 apresenta as comparações entre os combustíveis referente ao teste de médias.

Tabela 3: Comparações de pH entre os combustíveis analisados, proposta pelo teste de médias.

Combustíveis	Médias	Comparações
Etanol	8,0478	A
Gasolina comum	7,2533	B
Gasolina aditivada	7,1733	B
Diesel	6,0011	C
Biodiesel	5,5	C

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As análises de turbidez foram significativas ($P < 0,05$) para os combustíveis analisados, sendo que os resultados referentes às médias de turbidez são apresentadas na

Figura 8, respectivamente. Verificou-se que as amostras de diesel apresentaram valores mais altos com 3,19 UNT seguido do biodiesel com 2,86 UNT e gasolina aditivada com 2,49 UNT. As amostras de gasolina comum e etanol apresentaram os valores mais baixos para turbidez com 1,80 UNT e 1,27 UNT, respectivamente.

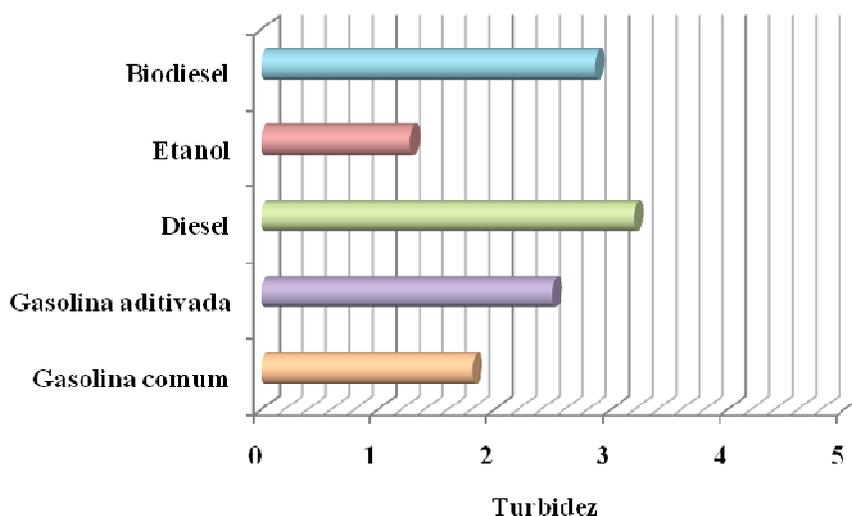


Figura 8: Determinação média da turbidez das amostras de combustíveis comercializados na cidade de Dourados, MS.

A Tabela 4 apresenta as comparações dos valores de turbidez proposta pelo teste de médias.

Tabela 4: Comparações de turbidez (UNT) entre os combustíveis analisados, proposta pelo teste de médias.

Combustíveis	Médias (UNT)	Comparações
Diesel	3,1933	A
Biodiesel	2,86	AB
Gasolina comum	2,4922	ABC
Gasolina aditivada	1,8089	BC
Etanol	1,2711	C

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos pelas análises de turbidez apresentaram relação direta com a avaliação da microbiota, uma vez que as amostras de diesel, biodiesel e gasolina aditivada apresentaram-se mais túrbidas e também com maior quantidade de microrganismos por mL.

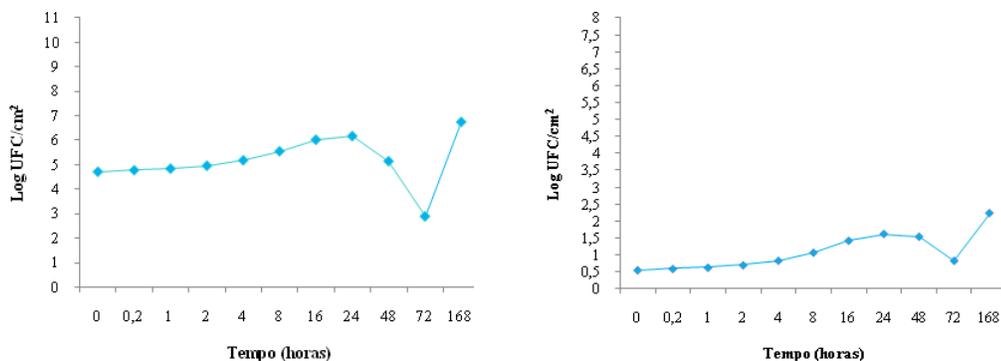
5.3 Avaliação da formação do biofilme nos cupons de prova

A adesão das células microbianas depende de vários fatores como morfologia das células (motilidade, flagelos, pili e fimbrias), características do meio e da superfície de contato. Outro fator limitante para formação de biofilme é o tempo de contato das células e o substrato, bem como a formação de um filme de condicionamento na superfície.

A avaliação da formação de biofilme foi realizada com amostras de combustíveis em estudo, sendo que para cada tipo foram realizados quatro ensaios. Para avaliar qual método é mais significativo para quantificação de biofilme em amostras de combustíveis foram utilizados dois métodos: Contagem Padrão em Placa (CPP) e Espectrofotometria no leitor de Elisa. Os resultados obtidos pelo método de Espectrofotometria são apresentados em absorbância, por isso os mesmos foram transformados para Log UFC/cm² pela equação da reta obtida pela correlação dos métodos CPP e Espectrofotometria (Apêndice B).

Para as amostras de gasolina comum pode-se perceber o mesmo perfil de crescimento microbiano no método de Contagem Padrão em Placa e Espectrofotometria (Figura 9). As equações da reta pelos dois métodos não foram significativas ($P < 0,05$). A população inicial de microrganismos, para os ensaios de formação de biofilme de gasolina comum foi de 8,66 Log UFC/mL. A população inicial refere-se a quantidade de microrganismos no concentrado de bactérias antes de ser misturado com o combustível. No tempo 0 horas observou-se concentração celular de 4,71 Log UFC/cm² pelo método CPP e 0,55 Log UFC/cm² pelo método de Espectrofotometria. A partir do tempo de 4 horas pode-se perceber um aumento no crescimento microbiano passando para 5,18 Log UFC/cm² (CPP) e 0,83 Log UFC/cm² (Espectrofotometria). Pelo método CPP pode-se perceber que entre os tempos de 16 e 24 horas o crescimento microbiano entra na fase estacionária com 6,02 Log UFC/cm² e 6,17 Log UFC/cm², respectivamente. Pelo método de Espectrofotometria a fase estacionária manteve-se por

um período maior, uma vez que a concentração celular manteve-se estável pelos tempo de 16, 24 e 48 horas apresentando 1,41 Log UFC/cm², 1,61 Log UFC/cm² e 1,53 Log UFC/cm², respectivamente. A partir de 72 horas pode-se perceber a fase de declínio no crescimento microbiano pelos dois métodos com 2,90 Log UFC/cm² e 0,83 Log UFC/cm², respectivamente.



a) Contagem Padrão em Placa (CPP)

$$y = 0,000000000074(x^3) - 0,0000009(x^2) + 0,002161(x) + 4,71729 - R^2 0,5938$$

b) Espectrofotometria

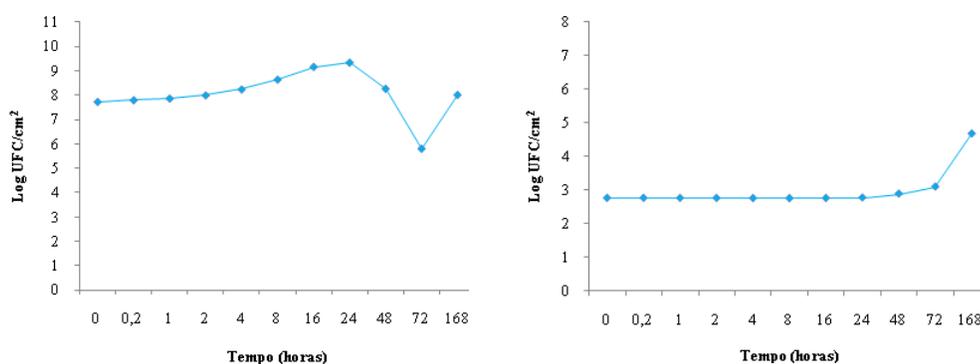
$$y = 0,000000000029(x^3) - 0,00000040(x^2) + 0,00125047(x) + 0,5582 - R^2 0,4651$$

Figura 9: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de gasolina comum em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanque de combustíveis.

Os ensaios para formação de biofilme de gasolina aditivada mostraram-se diferentes para os dois métodos (CPP e Espectrofotometria). A equação da reta não foi significativa ($P < 0,05$) para o método CPP e significativa ($P < 0,05$) para o método de Espectrofotometria (Figura 10).

Para os ensaios de formação de biofilme de gasolina aditivada a concentração inicial de microrganismos foi de 11,13 Log UFC/mL. Pelo teste CPP no tempo 0 horas a população de microrganismos aderidos foi de 7,73 Log UFC/cm². A partir do período de 2 horas até 16 horas pode-se perceber a fase Logarítmica de crescimento microbiano, passando de 7,73 Log UFC/cm² (tempo 0 horas) para 9,16 Log UFC/cm² (tempo 16 horas). Entre o período de 16 e 24 horas pode-se verificar a fase estacionária, sendo que a partir das 48 horas até 72 horas percebeu-se a fase de declínio.

O mesmo perfil de crescimento não pode ser observado pelo método de Espectrofotometria, uma vez que no tempo de 0 horas a contagem microbiana foi de 2,74 Log UFC/cm², sendo que a mesma só foi demonstrar um ligeiro aumento a partir do tempo 72 horas com 3,08 Log UFC/cm². Pelo de Espectrofotometria não pode-se observar a fase de declínio.



a) Contagem Padrão em Placa (CPP)

$$y = 0,00000000007229(x^3) - 0,0000009589(x^2) - 0,002349(x) + 7,7308 - R^2 0,5132$$

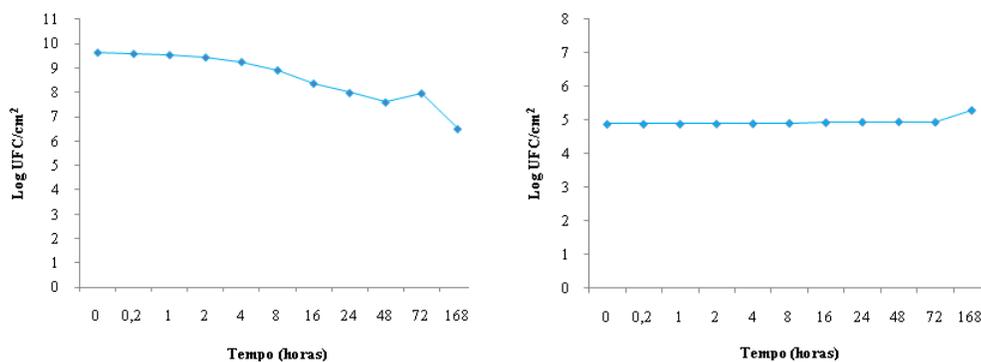
b) Espectrofotometria

$$y = - 0,00000000000584347(x^3) + 0,000000028179(x^2) - 0,0000316687(x) + 2,74703 - R^2 0,9256$$

Figura 10: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de gasolina aditivada em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanque de combustíveis.

Em relação aos ensaios de formação de biofilme com o diesel os dois métodos de avaliação mostraram-se distintos. A equação da reta pelo método de Espectrofotometria mostrou-se significativa ($P < 0,05$), e pelo método CPP não foi significativa ($P < 0,05$) (Figura 11).

A população inicial de microrganismos para o ensaio de biofilme do diesel foi de 10,97 Log UFC/mL. Em relação a gasolina comum e aditivada o diesel apresentou maior contagem no tempo 0 horas, com 9,64 Log UFC/cm² pelo método CPP e 4,88 Log UFC/cm² pelo método de Espectrofotometria. Pelo método CPP essa concentração manteve-se constante até o período de 4 horas, passando para a fase de declínio a partir das 16 horas com 8,37 Log UFC/cm². Pelo método Espectrofotometria o crescimento manteve-se constante até o período de 72 horas com 4,94 Log UFC/cm², caracterizando a fase estacionária.



a) Contagem Padrão em Placa (CPP)

$$y = -0,000000000290064(x^3) + 0,00000043,1098(x^2) - 0,00170897(x) + 9,64414 - R^2 0,3888$$

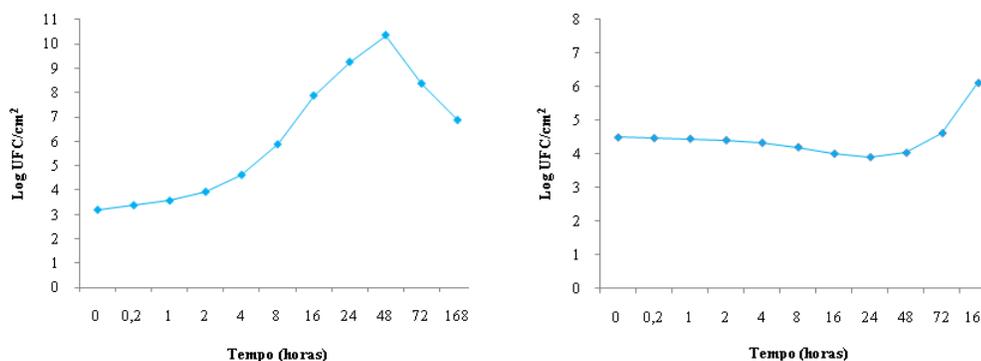
b) Espectrofotometria

$$y = 0,0000000000167914(x^3) - 0,0000001961(x^2) + 0,0000665363(x) + 4,88419 - R^2 0,6638$$

Figura 11: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de diesel em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanque de combustíveis.

Os ensaios de formação de biofilme para o biocombustível etanol apresentaram crescimento microbiano diferente para os dois métodos (CPP e Espectrofotometria) testados (Figura 12). A equação da reta pelo método CPP foi significativa a 1% ($P < 0,001$) e pelo método de Espectrofotometria foi significativa a 5% ($P < 0,05$).

A população microbiana inicial dos ensaios de formação de biofilme para esse biocombustível foi de 9,47 Log UFC/mL. Pode-se perceber que no tempo 0 horas pelo teste CPP a contagem foi de 3,20 Log UFC/cm², sendo possível observar um aumento progressivo até o tempo de 48 horas, atingindo a concentração celular de 10,35 Log UFC/cm². Após esse período observou-se um declínio até o tempo de 168 horas reduzindo a população aderida para 6,87 Log UFC/cm². Pelo método Espectrofotometria no tempo 0 horas observou-se concentração de 4,49 Log UFC/cm² permanecendo constante até o período de 2 horas com 4,41 Log UFC/cm². Do tempo 4 horas até 24 horas observou-se um leve declínio atingindo 3,90 Log UFC/cm² e após esse período até 168 horas verificou-se um crescimento progressivo atingindo a concentração celular de 6,11 Log UFC/cm².



a) Contagem Padrão em Placa (CPP)

$$y = 0,00000000010407(x^3) - 0,00000164304(x^2) + 0,006352(x) + 3,20123 - R^2 0,8451$$

b) Espectrofotometria

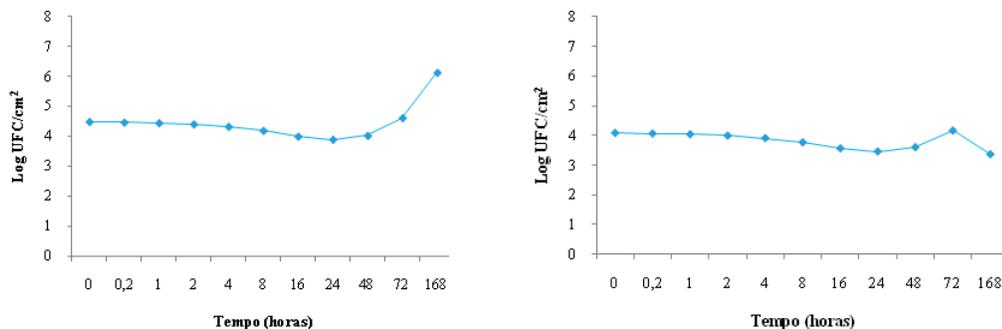
$$y = -0,0000000000149403(x^3) + 0,000000238030(x^2) - 0,000720386(x) + 4,49698 - R^2 0,5635$$

Figura 12: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de etanol em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanque de combustíveis.

Para os ensaios de formação de biofilme em biodiesel pode-se observar a mesma tendência de crescimento microbiano pelos dois métodos (CPP e Espectrofotometria) (Figura 13). Pelo método CPP a equação da reta foi significativa ($P < 0,05$) e pelo método de Espectrofotometria não foi significativa ($P < 0,05$).

A concentração inicial de microrganismos para formação de biofilme do biodiesel foi de 11,14 Log UFC/mL. No tempo 0 horas pelo método CPP observou-se crescimento microbiano de 9,40 Log UFC/cm², após o período de 4 horas verificou-se um declínio no crescimento atingindo 5,90 Log UFC/cm² em 48 horas. No tempo de 72 horas observou-se um aumento atingindo 6,21 Log UFC/cm², no entanto no período de 168 horas houve novamente um declínio passando para 4,99 Log UFC/cm². O crescimento microbiano pelo método de Espectrofotometria foi similar ao método CPP, uma vez que no tempo 0 horas a biomassa foi de 4,08 Log UFC/cm², mantendo-se estável até o período de 2 horas com 3,99 Log UFC/cm². Do tempo de 4 horas até 16 horas pode-se observar um pequeno declínio passando para 3,56 Log UFC/cm². Entre o período de 16 horas e 48 horas o crescimento manteve-se estável. No período de 72 horas verificou-se um aumento na biomassa microbiana passando para 4,16 Log

UFC/cm² e após as 168 horas observou-se novamente um declínio atingindo 3,36 Log UFC/cm².



a) Contagem Padrão em Placa (CPP)

$$y = -0,0000000000388077(x^3) + 0,000000610913(x^2) - 0,002653(x) + 9,40625 - R^2 0,6593$$

b) Espectrofotometria

$$y = -0,0000000000199834(x^3) + 0,00000027217(x^2) - 0,000784328(x) + 4,08226 - R^2 0,5635$$

Figura 13: Cinética da formação de biofilme dos microrganismos isolados das amostras de biodiesel em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanque de combustíveis.

A Figura 14 apresenta as curvas de crescimento microbiano de todos os combustíveis analisados pelo método CPP. Por esse método observou-se que os combustíveis e a interação combustível/tempo foram significativos ($P < 0,05$) estatisticamente para formação de biofilme.

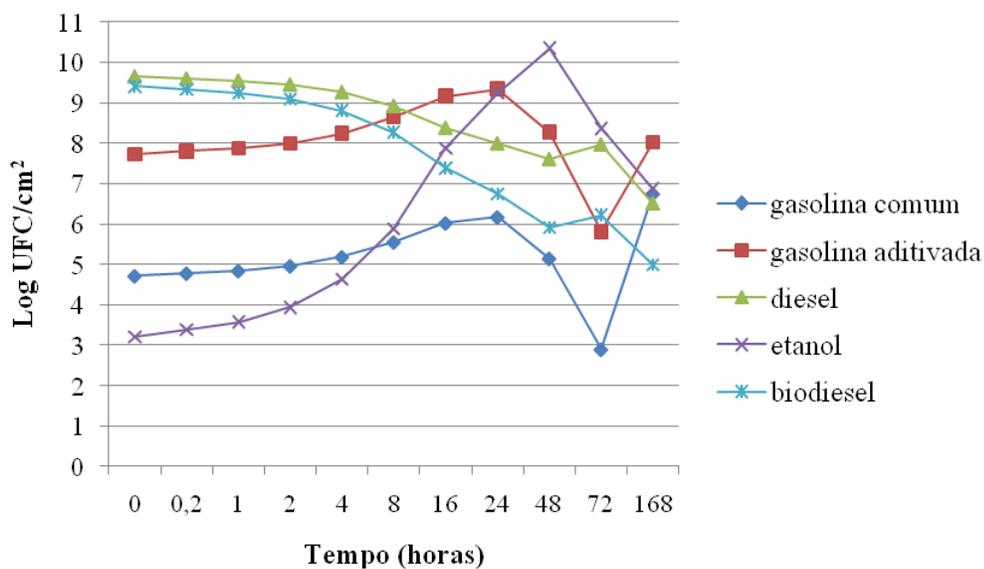


Figura 14: Cinética da formação de biofilme da microbiota isolada das amostras de gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanques de combustíveis, pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²).

A Tabela 5 apresenta as comparações entre os combustíveis para a formação de biofilme pelo método CPP.

Tabela 5: Comparações entre os combustíveis referente ao teste de médias do ensaio de formação de biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²).

Combustíveis	Médias (Log UFC/cm ²)	Comparações
Diesel	8,6232	A
Gasolina aditivada	8,0814	A
Biodiesel	7,7619	AB
Etanol	6,1239	BC
Gasolina comum	5,5362	C

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A Tabela 6 apresenta as comparações entre a interação combustível/tempo para formação de biofilme pelo método CPP.

Tabela 6: Comparações entre a interação combustível/tempo dos combustíveis referente ao teste de médias do ensaio de formação de biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²).

Tempo (h)	Gasolina comum		Gasolina aditivada		Diesel		Etanol		Biodiesel	
	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C
0	4,00	B	5,82	AB	10,74	AB	2,23	B	8,19	AB
0,2	3,60	B	7,29	AB	9,10	AB	3,40	AB	10,14	AB
1	5,43	A	8,53	A	9,42	A	5,44	A	8,98	A
2	3,84	AB	8,58	AB	8,75	AB	3,52	B	9,92	AB
4	6,34	A	8,61	A	9,73	A	5,46	A	9,46	A
8	8,99	AB	10,21	AB	10,12	AB	3,5	B	7,79	A
16	4,82	A	9,29	A	7,10	A	8,90	A	8,11	A
24	4,46	A	8,56	A	6,26	A	9,43	A	4,51	A
48	6,20	A	7,91	A	10,23	A	10,18	A	7,78	A
72	2,84	A	6,10	A	6,87	A	8,40	A	5,49	A
168	10,38	A	8,01	A	6,54	A	6,88	A	5,00	A

M = médias; C = comparações. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Analisando os resultados obtidos pelo método CPP pode-se verificar que a biomassa microbiana variou mais, sendo possível observar todas as fases do crescimento (lag, log, estacionária e declínio) ao contrario do método de Espectrofotometria, no qual a população mostrou-se mais estável. Pode-se observar que o diesel apresentou maior contagem microbiana para os ensaios de biofilme, seguido da gasolina aditivada, biodiesel, etanol e gasolina comum.

Na Figura 15 é possível comparar a tendência microbiana de todos os combustíveis em relação ao método de Espectrofotometria. Por esse método observa-se que a variação do combustível foi significativa estatisticamente ($P < 0,05$) para formação de biofilme, não sendo observada diferença estatística para as variações tempo e combustível/tempo.

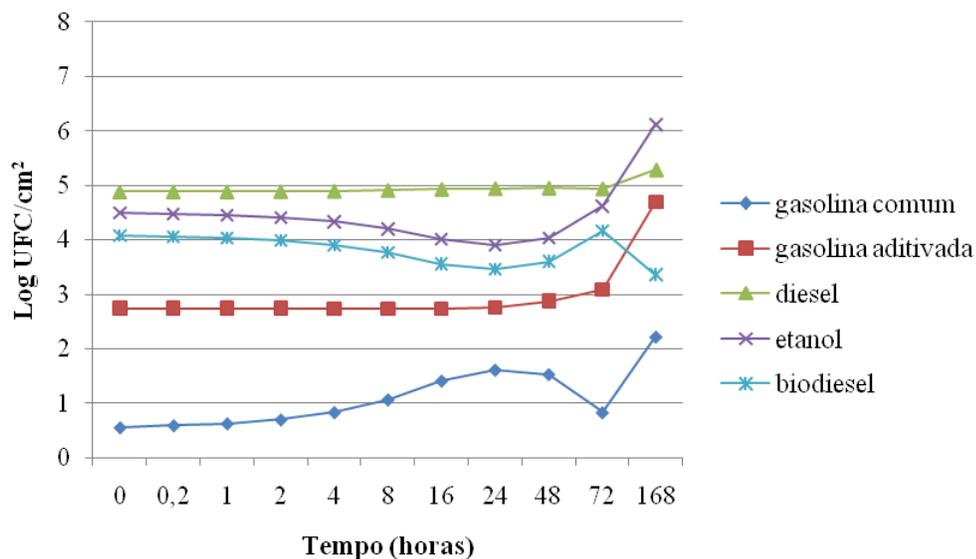


Figura 15: Cinética da formação de biofilme da microbiota isolada das amostras de gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel em cupons de aço inoxidável, provenientes de tanques de combustíveis, pelo método Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log UFC/cm²).

A Tabela 7 apresenta a comparação entre os coeficientes de variação dos combustíveis pelo teste de médias.

Tabela 7: Comparações entre os combustíveis referente ao teste de médias do ensaio de formação de biofilme pelo método de Espectrofotometria (Log UFC/cm²) no leitor de Elisa.

Combustíveis	Médias (Log UFC/cm ²)	Comparações
Diesel	4,9467	A
Etanol	4,4622	AB
Biodiesel	3,8177	B
Gasolina aditivada	2,9652	C
Gasolina comum	1,1173	D

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Pelo método de Espectrofotometria verificou-se que o diesel também apresentou maior crescimento microbiano para formação de biofilme, seguido do etanol, biodiesel, gasolina aditivada e gasolina comum.

Comparando-se os dois métodos analisados (CPP e Espectrofotometria), pode-se inferir que o método CPP foi mais viável para as condições desse estudo, uma vez que representa melhor as fases de crescimento microbiano, porém, para a confirmação dessa afirmação é necessária a realização de mais ensaios.

Tomando como base os ensaios realizados pelo método CPP (Figura 14), pode-se perceber que todos os combustíveis gasolina comum e etanol apresentaram adesão caracterizando a formação de biofilme, ou seja, concentração celular superior a 10^6 UFC/cm², conforme proposto por Andrade *et al.* (1998).

A gasolina comum e o etanol apresentaram comportamento celular similar, uma vez que nas primeiras horas houve um crescimento progressivo seguido de um declínio na adesão microbiana. A gasolina comum atingiu concentração celular característica de formação de biofilme após terem decorridas 16 horas de ensaio, momento no qual apresentava 6,02 Log UFC/cm².

Nos ensaios de avaliação da microbiota, o etanol apresentou menor contagem microbiana, porém para a formação de biofilme, atingiu maior taxa de crescimento em relação aos outros combustíveis. Pode-se inferir que esse fato deve-se a alta solubilidade dos alcoóis, facilitando o processo de deterioração microbiana (Powers *et al.* 2001; Alvarez e Hunt, 2002). O etanol como a gasolina comum atingiu adesão com concentração característica de biofilme após as primeiras 16 horas de ensaio atingindo 7,87 Log UFC/cm².

Segundo Zotola e Sasahara (1994), a adesão bacteriana tende a aumentar com o decorrer do tempo de contato com a superfície. Fato este que pôde ser evidenciado no presente estudo, como por exemplo, no caso do etanol que no tempo 2 horas a adesão foi de 3,93 Log UFC/cm² passando para 7,87 Log UFC/cm² no tempo de 16 horas.

Rossi (2008) em um estudo sobre a adesão de *Bacillus cereus* na superfície de aço inoxidável também verificou a influencia do tempo na formação do biofilme sendo que, após 6 horas a contagem foi de 3 Log UFC/cm², aumentando para 5 Log UFC/cm² em 10 horas. Gândara e Oliveira (2000) encontraram resultados parecidos na adesão de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável tipo 316, onde após 3 horas adesão a média foi de 1,20 Log UCF/cm² e após 6 horas 4,27 Log UCF/cm².

Apesar de o presente estudo ser pioneiro na avaliação da adesão microbiana na superfície de tanques e sistemas de armazenamento de combustíveis, vários trabalhos tem evidenciado a presença de biofilme em diversos segmentos da indústria e na área hospitalar, demonstrando que a adesão dos microrganismos sob a forma de biofilme tem sido causa de inúmeros problemas.

Boari *et al.* (2009) avaliaram a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável usando leite em diferentes condições de temperatura (18°C e 4°C) e constatou que a adesão foi de 8,23 Log UFC/cm² e 7,39 Log UFC/cm², respectivamente. Marques (2005) também analisou a adesão de *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável AISI 304 e verificou que após 15 dias de incubação a adesão média foi de 8 Log UFC/cm².

Pode-se perceber que em um curto intervalo de tempo é possível o desenvolvimento de sistemas de biofilme na superfície dos tanques de combustível. De acordo com Heydorn *et al.* (2000) e Stoodley *et al.* (2002) o aumento de células em um biofilme faz parte de seu próprio processo de maturação, podendo compreender até 10 dias após a adesão inicial. Este aumento ocorre em decorrência da divisão celular e da co-adesão de outras células presentes no sistema em seu estado planctônico.

Alguns fatores como, tempo de sonicação, o inóculo inicial, o tipo de substrato (tanque de combustível de aço inoxidável) e a metodologia empregada podem ter influenciado na adesão das células microbianas.

No presente estudo foi estabelecido o período de 10 minutos para a remoção dos microrganismos aderidos no substrato, porém alguns trabalhos têm evidenciado outros tempos. Locatelli (2001) através de visualização em microscopia eletrônica de varredura constatou que a sonicação por dois períodos de 10 minutos é eficaz para remoção das células bacterianas aderidas, sem afetar a sua viabilidade. Portanto, o tempo estabelecido nessa pesquisa talvez não tenha sido suficiente para remover as células aderidas, sendo esse um dos fatores que contribuíram para baixa adesão nos ensaios com o diesel e o biodiesel.

Em relação ao material utilizado como superfície de adesão, Sommer *et al.* (1999), sugere que a interação substrato-microrganismos difere conforme a hidrofobicidade do material. Além das características do material, é preciso considerar propriedades bacterianas como carga e apêndices celulares (Bower *et al.*, 1996), cuja

importância na adesão varia conforme a espécie de microrganismo em estudo (Chmielewski & Frank, 2003).

A hidrofobicidade do aço inox é controversa na literatura: alguns trabalhos o citam como sendo um material hidrofílico (Barnes *et al.*, 1999; Moretro *et al.*, 2003) outros, relatam que é hidrofóbico (Sinde e Carballo, 2000; Peng *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2005). Segundo Boari *et al.*(2009), no aço inoxidável o cromo, devido à sua alta afinidade com o oxigênio, tende a se combinar com este formando uma fina camada de óxido de cromo, com aproximados 40 Angstrom de espessura. Esta camada passiva é a responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável. Os diferentes graus de hidrofobicidade de uma célula são conferidos por fatores de virulência associados à adesão, como pili, fimbrias e flagelos, bem como pela membrana externa, em gram-negativos, e os diferentes graus de eletronegatividade conferidos pela presença de grupos funcionais polares, como fosfatos, carboxilas, hidroxilas e ácido teicoico (Flach *et al.*, 2005). Desta forma, bactérias Gram-negativas, devido a suas estruturas peculiares, apresentariam uma vantagem competitiva, quando comparadas a Gram-positivas, no que diz respeito à adesão inicial, colonização da superfície e formação do biofilme.

Outro fator que pode ter influenciado a adesão microbiana ao tanque de combustível é a capacidade de certos microrganismos atuarem como condicionadores de superfície. É o caso dos colonizadores primários, produtores de grande quantidade de EPS, que acabam favorecendo a adesão de outros microrganismos à superfície.

Os combustíveis gasolina aditivada, diesel e biodiesel não apresentaram adesão característica de formação de biofilme. Esses três combustíveis apresentaram uma concentração microbiana elevada nas primeiras horas, 7,34 Log UFC/cm² para gasolina aditivada, 9,64 Log UFC/cm² para o diesel e 9,40 Log UFC/cm² para o biodiesel. Essa concentração manteve-se estável para a gasolina aditivada até o período de 4 horas, a partir do qual houve um aumento na concentração celular passando para 9,34 Log UFC/cm² e após o tempo de 48 horas observou-se um declínio atingindo 8,26 Log UFC/cm². O diesel e o biodiesel exibiram um perfil de crescimento diferente, pois a concentração manteve-se estável até o tempo de 4 horas apresentando concentração de 9,25 Log UFC/cm² e 8,80 Log UFC/cm², respectivamente. Após esse período observou-se um declínio até o tempo de 168 horas chegando a 6,51 Log UFC/cm² nas amostras de diesel e e 4,99 Log UFC/cm² no biodiesel.

Pode-se verificar que as amostras de gasolina aditivada, diesel e biodiesel não apresentaram adesão característica de biofilme, ou seja, 10^6 UFC/cm² conforme proposto por Andrade *et al.* (1998), porém, mesmo estando no seu estado planctônico podem caracterizar um risco na indústria, uma vez que a presença destas bactérias indica que, caso um biofilme não se forme em um tanque de expansão, poderá haver uma quantidade de células suficientes para alterar as propriedades das amostras (Martins *et al.*, 2002; Tiryaki e Tuncel, 2006).

Segundo Hood e Zottola (1997) o potencial de biotransferência, ou seja, a presença de microrganismos aderidos em uma superfície que poderiam eventualmente levar à contaminação, deve ser levado em consideração e interpretado como um problema a ser resolvido. Além disso, o fato de as bactérias aderidas serem mais resistentes aos sanificantes do que as em suspensão (Peng *et al.*, 2001) já é capaz de gerar uma situação talvez tão indesejável para a indústria quanto a presença de biofilmes maduros, porque em ambos os casos haverá maior sobrevivência de microrganismos.

Com base nos resultados obtidos pode-se observar a importância da avaliação de processos de formação de biofilme, uma vez que, apesar desses ambientes não aparentarem, são propícios para o desenvolvimento de microrganismos, podendo levar sérios problemas à indústria e ao meio ambiente, pois quando em biofilme os microrganismos se aderem firmemente ao substrato e os seus produtos metabólicos podem induzir e/ou acelerar o processo de corrosão na superfície do tanque de combustível.

Segundo Chmielewski e Frank (2003), a forma mais eficiente de se impedir a formação de um processo de biofilme e a conseqüente ocorrência de tantos malefícios em virtude dessa problemática corresponde à prática constante de adequados procedimentos de higiene industrial, contemplando não apenas remoção de resíduos, mas também a eliminação de células indesejáveis, por meio da sanitização. Kumar e Anand (1998) propõem que as substâncias associadas com o biofilme podem limitar a difusão de sanificantes no biofilme e provocar trocas fisiológicas nos microrganismos e produção de enzimas que degradam os sanificantes. Portanto, ainda que a contaminação da superfície seja relativamente baixa, como $1,2 \times 10^2$ UFC/cm², é difícil prever, após o período de produção, o grau de eficiência que os sanificantes terão contra essas bactérias.

Uma vez que esse é um dos primeiros trabalhos a avaliar o processo de formação de biofilme em superfícies de tanque de combustível, sugere-se que outros trabalhos desenvolvam esses ensaios, testando mais tempos de incubação, concentração celular inicial e os processos de biocorrosão provocados, para se obter em média o tempo que a degradação microbiana pode levar a processos biocorrosão, para assim trabalhos posteriores sugerirem alternativas para minimizar os impactos causados pelo biofilme nos sistemas de armazenamento de combustíveis.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos em relação à quantificação da microbiota e avaliação do processo de adesão e formação de biofilme dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (etanol e biodiesel) pode-se concluir que:

- Em relação aos métodos testados para avaliação da microbiota: Contagem Padrão em Placa (CPP), Método do Número Mais Provável (NMP) e Espectrofotometria no leitor de Elisa. Constatou-se que apesar dos testes CPP e Espectrofotometria terem apresentado efeito significativo a 5% ($P < 0,05$) os métodos NMP e CPP foram considerados mais favoráveis para enumeração de microrganismos provenientes de combustíveis;
- Entre os combustíveis analisados o diesel foi o que apresentou maior contagem microbiana com 4,64 Log UFC/mL;
- Os valores de turbidez apresentaram relação direta com a concentração celular dos combustíveis;
- Na avaliação do processo de adesão e formação de biofilme verificou-se que entre os métodos testados, Contagem Padrão em Placa (CPP) e Espectrofotometria no leitor de Elisa, o método CPP foi mais favorável por representar melhor os ciclos microbianos quando em biofilme.
- Em relação à avaliação dos processos de adesão a gasolina comum e o etanol apresentaram concentração celular acima de 10^6 UFC/cm² caracterizando a formação de biofilme;
- Verificou-se a necessidade de novos estudos sobre adesão e formação de biofilme para a avaliação de mais tempos de incubação;

- Concluiu-se que os combustíveis apresentam características favoráveis para o desenvolvimento microbiano, sendo necessário a realização de mais estudos para se conhecer com exatidão o perfil microbiano das amostras de combustíveis e assim sugerir medidas que diminuam os impactos provocados pelos microrganismos nas indústrias petrolífera e petroquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRISHAMI, S. H.; TALL, B. D.; BRURSEMA, T. J.; EPSTEIN, P. S.; SHAH, D. B. Bacterial adherence and viability on cutting board surfaces. **Journal of Food Safety**, v. 14, p. 153-171, 1994.

ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S.; The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, São Paulo, v. 44, n. 2, p 83-104, 2002.

ALVES, V. M.; ROCHA L. M.; ZOTIN, Z. M.F.; PINTO DA C. R. R. Stability and Filtering capacity of Diesel oil. **Boletim Técnico da Petrobras**, Rio de Janeiro, v.49, n.1/3, dez. 2006.

ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A., Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ANTONY, P. J.; RAMAN, R. K. S.; MOHANRAM, R.; KUMAR, P.; RAMAN, R. Influence of thermal aging on sulfate-reducing bacteria (SBR) – influenced corrosion behavior of 2205 duplex stainless steel. **Corrosion Science**, v. 50, p. 1858-1864, 2008.

BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p. 4543-4548, 1999.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state-of-the art methods of study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 53, p. 177-183, 2004.

BEECH, I. B; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International Microbiology**, v. 8, 2005.

BENTO, F. M., GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 107-112, 2001

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BOWER, C.K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.71, p.152-157, 1996.

BOTT, T. R. Aspects of biofilm formation and destruction. **Corrosion Reviews**, v.11, p.1-24, 1993.

BRASIL. Resolução ANP nº 07, de 19 de março de 2008. Estabelece a especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=6637](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=6637)>. Acesso em: 15 abr. 2011.

BUCKER, F. Biodeterioração de misturas diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. 2009, 147 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 172-178, 2011.

CAPELLETTI, R. V. Avaliação da atividade e biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. 2006, 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Campinas. Campinas, 2006.

CHAO, Y.; LIU, N.; ZHANG, T.; CHEN, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 11, p. 2010.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J.; How bacteria stick. **Scientific American**, 238, p.86-95, 1978.

DEMILLY, M.; BRÉCHET, Y.; BRUCKERT, F.; BOULANGÉ, L. Kinetics of yeast detachment from controlled stainless steel surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, p. 71-79, 2006.

EMTIAZI, G., H. SHAKARAMI, NAHVI, I.; MIRDAMADIAN, S.H. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp and transformed *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 172-176, 2005.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com confeites: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 291-296, 2005.

FLEMMING, H-C. Biofilms and environmental protection. **Water Science Technonology**. v.27, n.7-8, p.1-10, 1993.

FLETCHER, M. How do bacteria attach to solid surfaces? *Microbiological Sciences*, v. 4, p. 133-136, 1987.

FLINT, S. H., BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing. **Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1997.

FRANÇA, F. P.; CRAVO JR., W. B. Variation in sessile microflora as a function of flow velocity during biofilm formation in carbon steel coupons exposed to circulating seawater. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 811-814, 2000.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, 2000.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista Microbiologia**, v. 30, p. 1-10, 1999.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A.T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v.146, p.395-407, 2000.

HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVN, D. E; KOLD, J.; GRAM, L. **Influence** of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 3, p. 175-185, 2003.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 4, p. 1312-1320, 2010.

KARTAVTSEVA, Z. M.; KOVAL, E. Z.; KALAGANOV, V. A.; LYAPUNOVA, N. A. Destruction of diesel fuel by microorganisms in circulating systems. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, v. 51, p. 87-93, 1989.

KIM, K. Y.; FRANK, J. F. Effect of growth nutrients on attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 8, p. 720-726, 1994.

KREPSKY, N.; FERREIRA, R. B. R; NUNES, A. P. F; LINS, U. G. L; FILHO, F. S; MATTOS-GUARALDI, A. L.; NETTO DOS SANTOS, K. R. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **Current Microbiology**, v. 46, p.280-286, 2003.

KUMAR, C.G., ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.

LEAHY, J. G; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Ver**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LIMA, U. A. **Microbiologia do Petróleo**. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LI, U. A. Tópicos de Microbiologia Industrial, v. 2. Cordenadores Aquarone, São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., cap. 8, páginas 151-168, 1975.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, v. 108, p. 27-37, 2006.

LIU, Y.; TAY, J. H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, v. 36, p. 1653-1665, 2002.

LIU, Z. D.; LI, H., R. Effects of bio- and abio-factors on electricity production in a mediatorless microbial fuel cell. **Biochemical Engineering Journal**. n.36, p. 209 – 214, 2007.

LOCATELLI, C.I. **Estudo da aderência bacteriana a lentes intraoculares de polimetilmetacrilato e de silicone**. 2001. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

LUTTERBACH, M.; BARRETO, A.; TOMACHUK, C.R.; FERRAZ, O.B.; CAVALCANTI, E. Avaliação da Tendência à Biocorrosão e da Estabilidade à Oxidação de Biodiesel Metílico de Soja e Mistura B5. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 1, Brasília. **Resumos**. Brasília: MCT, 2006.

LUTTERBACH, M. T. S.; CONTADOR, L. S.; OLIVEIRA, V.; GALVÃO, M. M.; OLIVEIRA, A. L. C.; FERREIRA, D. G.; PIMENTA, G. S. Diversidade microbiana em amostras de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25, 2009, Porto de Galinhas. **Anais**. Porto de Galinhas: SBM, 2009.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 9, p. 742-746, 1990.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.

MARQUES, C. S., Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.237-242, 2002.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 289-314, 2006.

MIRANDA, E.; BETHENCOURT, M.; BOTANA, F. J.; CANO, M. J.; SÁNCHEZAMAYA, J. M.; CORZO, A.; GARCÍA DE LOMAS, J.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B. Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexico oil field separator. **Corrosion Science**, v.48, p.2417-2431, 2006.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 1, p. 34-41, 1993.

MUÑOZ, L. S., BERGEL, A., BASSEGUY, R. Role of the reversible electrochemical deprotonation of phosphate species in anaerobic biocorrosion of steels. **Corrosion Science**. n. 49, p. 3988–4004, 2007.

MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A. L.; SIDHU, M. S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648–5655, 2003.

NOGUEIRA, T.; LAGO, C. L.; GURGEL, C; SILVA, G. V.; HIDALGO, P. Estudo dos compostos formados pela degradação do biodiesel usando técnica de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (ce-c4d). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 3, 2009, Brasília. **Anais**, Brasília: MCT/MBC, v. 3, 2009. p. 79-80.

NUNES, D. L.; CABRAL, F. D.; PRADO, I. C. S. Potencial de contaminação microbiológica em oleaginosas e biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL – “BODIESEL: TECNOLOGIA LIMPA, 5, 2008, Lavras. **Resumos**. Lavras: UFLA, 2008. p. 2953-2961.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**, 1998, 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia em Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, C. A. S; SOARES, N. F. F.; SILVA, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives Biological Technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 105-111, 2001.

PEREIRA, M. O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 234 p. Tese (Doutorado) Universidade do Minho, Braga – Portugal.

PÉREZ, E. J.; SIERRA, R. C.; GONZÁLEZ, I.; VIVES, F. R. Influence of *Desulfovibrio* sp biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. **Corrosion Science**, v.49, p.3580-3597, 2007.

PITCHER, D. G. Industrial case histories of microbiological fuel contamination-cause, effect and treatment. **International Biodeterioration**, v. 25, p. 207-218, 1989.

POWERS, S. E. Hunt, C. S.; Heermann, S. E.; Corseuil, H. X.; Rice, D.; Alvarez, P. J. J. The Transport and Fate of Ethanol and BTEX in Groundwater Contaminated by Gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 79-123, 2001.

RAIKOS V.; VAMVAKAS, S. S.; KAPOLOS, J; KOLIADIMA, A.; KARAIKAKIS, G. Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**, v. 90, p. 695-700, 2011.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E.W.; BLUESTEIN, R. L.; HEMPHIL, J. B.; REGUTTI, R. R. Antimicrobial efficacy of a new organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 496-501, 1994a.

RESTAINO, L.; HEMPHIL, J. B.; FRAMPTON, E.W.; BLUESTEIN, R. L. Hycheck™ slides versus RodacR plates compared to the swabs technique for the recovery of bacteria from hard smooth surfaces. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 14, n. 9, p. 529-531, 1994b.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilmes. **Trends in Microbiology**, v.11, p. 94-100, 2003.

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

ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZÄHRINGER, U.; MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 103-111, 2009.

RONNER, A. B., WONG, A. C. L., Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

ROSSI, A. C. R. **Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios**. 2008, 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RUBIO, C.; OTT, C.; AMIEL, C.; MORAL, I. D.; TRAVERT, J.; MARIEY, L. Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 287-296, 2006.

SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTROFF, R. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 724-730, 2009.

SCHWACH, T. S.; ZOTOLLA, E. A. Use of scanning electron microscopy to demonstrate microbial attachment to beef and beef contact surfaces. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1401-1405, 1982.

SKERKER, J.M.; BERG, H.C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **Proceedings of National Academic of Science**, v. 98, p. 6901–6904, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Varela, ed. 4, 2010. 625 p.

SILVA, R. C. B.; PONTES FILHO, T.R. Corrosão do aço carbono em meio sulfato na presença da bactéria *Salmonella anatum*. **Revista Matéria**, v. 13, n. 2, p. 282 – 293, 2008.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, London, v.17, p.439-447, 2000.

SOMMER, P.; MARTIN-ROUAS, C.; METTLER, E. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. **Food Microbiology**, London, v.16, p.503-515, 1999.

SPURLOCK, A. T.; ZOTOLLA, E. A. Growth and attachment of *Listeria innocua* to cast iron. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 12, p. 925-929, 1991.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M. J. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 247-251, 2005.

TIRYAKY, G.G.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.329-336, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA-UFV. SAEG - **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 9,1. Viçosa, MG. 142p. (manual do usuário). 2007.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 04, p. 503–549, 2003.

VEENING, J. W.; KUIPERS, O. P.; BRUL, S.; HELLINGWERF, K. J.; KORT, R. Effects of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.188, n.8, p. 3099-3109, 2006.

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 2009, 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

VIDELA, H. A. **Biocorrosão, Biolouling e Biodeterioração de materiais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2003. 148 p.

VIDELA, H. A. Microbially induced corrosion. Updated Overview. **Biodeterioration and Biodegradation** p 63, 1991.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L.K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International Microbiology**, v. 8, p. 169-180, 2005.

WIEDEMANN, L. S. M.; D'AVILAB, L. A.; AZEVEDO, D. A. Brazilian Gasoline Quality: Study of Adulteration by Statistical Analysis and Gas Chromatography. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 139-146, 2005.

WIRTANEN, G., HUSMARK, U., MATTILA-SANDHOLM, T., Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

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

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial. activity. **Journal of Food Bacteriology**, v. 46, p. 39-56, 1943.

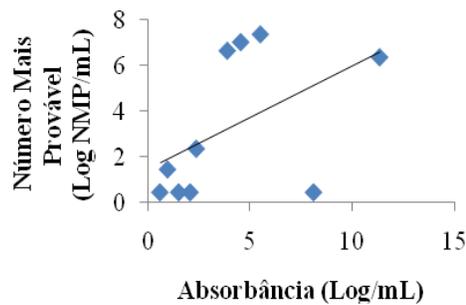
ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. Attachment of marine bacteria to submerged surfaces. **Journal Bacteriology**, v. 29, p. 239-251, 1935.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.125-148, 1994.

ZOTTOLA, E. A special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In: TORTORELLO, M. L.; GRENDDEL, S. M. (Ed.) *Food microbiologist analysis: new technologies*. **Baltimore: IFT Basic Symposium Series**, p. 315-343, 1997.

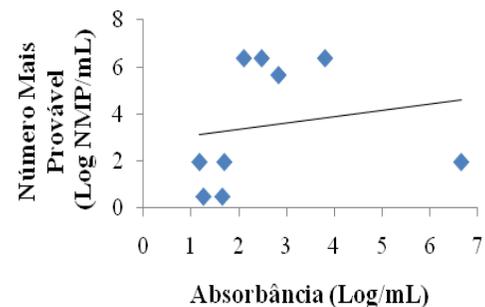
APÊNDICE A – Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa e Espectrofotometria para avaliação da microbiota.

O Apêndice A apresenta os gráficos com as respectivas equações da reta que foram utilizadas na transformação dos valores de absorbância para Log NMP/mL referente à correlação dos métodos Número mais Provável e Espectrofotometria utilizados para avaliar a microbiota dos combustíveis: gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel.



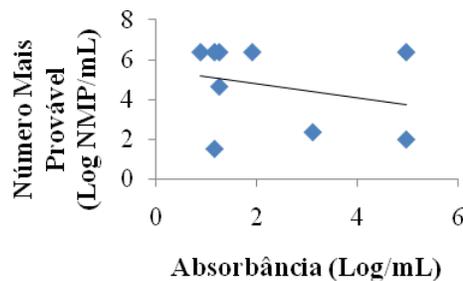
a) Gasolina comum

$$y = 1,1089x + 5,2172 - R^2 0,2371$$



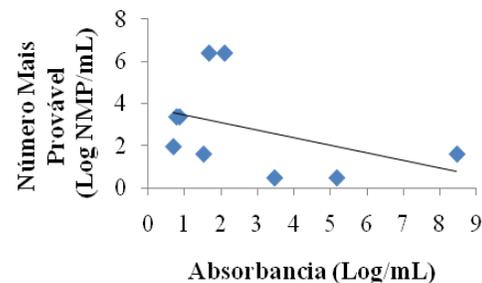
b) Gasolina aditivada

$$y = 0,2701x + 2,8036 - R^2 0,0317$$



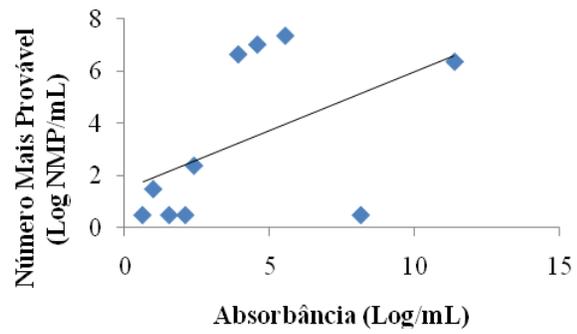
c) Diesel

$$y = -0,3543x + 5,5121 - R^2 0,0727$$



d) Etanol

$$y = -0,3587x + 3,8285 R2 0,1703$$



e) Biodiesel

$$y = 0,451x + 1,4667 - R^2 0,2463$$

Figura 16: Correlação entre os métodos Número Mais Provável (Log NMP/mL) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da microbiota dos combustíveis.

Apêndice B – Correlação entre os métodos Número Mais Provável e Espectrofotometria para análise da formação de biofilme.

O Apêndice A apresenta os gráficos com as respectivas equações da reta que foram utilizadas na transformação dos valores de absorbância para Log UFC/cm² referente à correlação dos métodos Número mais Provável e Espectrofotometria utilizados para avaliar a microbiota dos combustíveis: gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel.

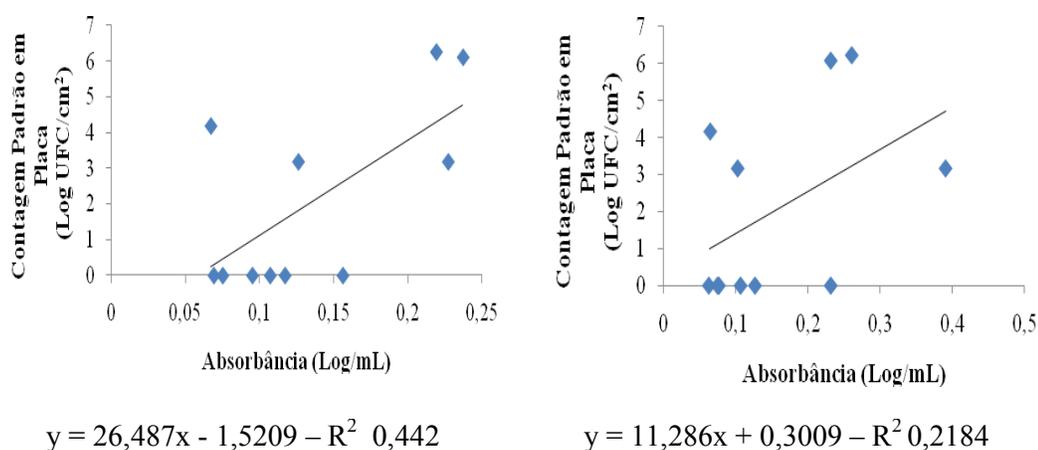


Figura 17: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com gasolina comum.

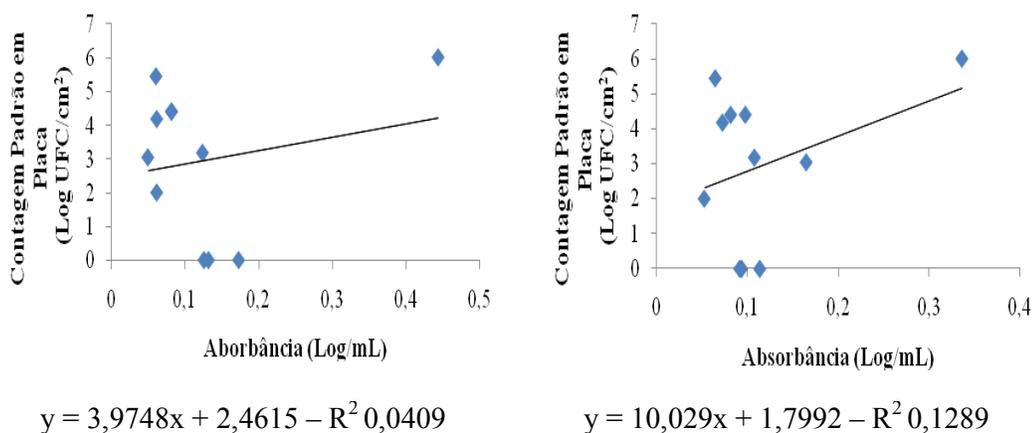
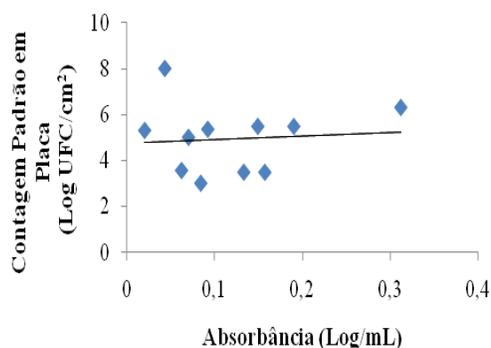
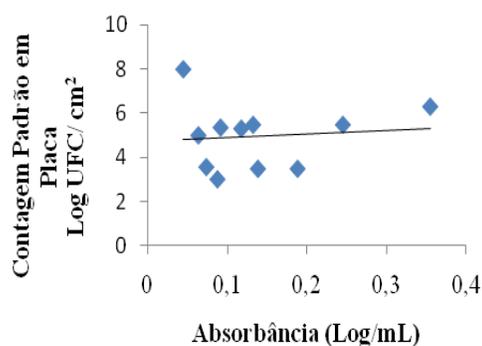


Figura 18: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com gasolina aditivada.

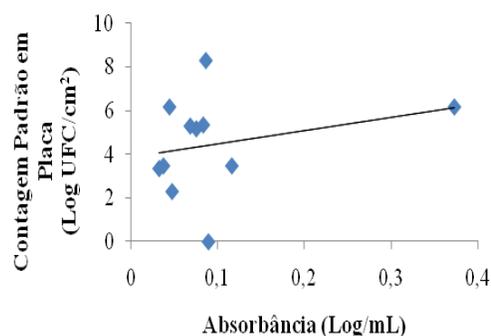


$$y = 1,5474x + 4,7626 - R^2 = 0,0074$$

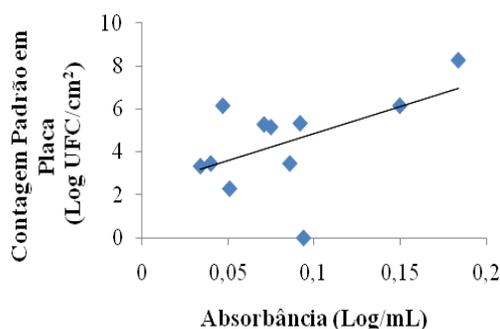


$$y = 1,7193x + 4,7076 - R^2 = 0,0114$$

Figura 19: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com diesel.

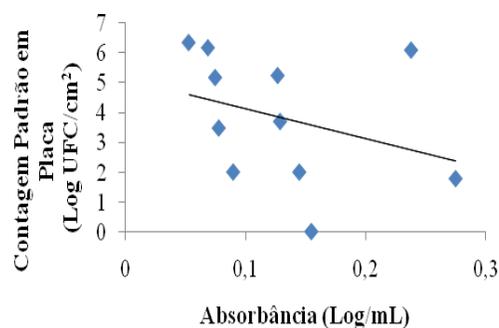


$$y = 5,9527x + 3,8945 - R^2 = 0,0643$$

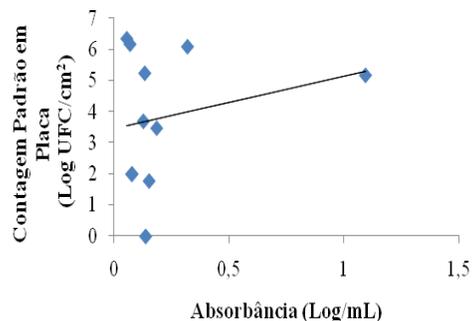


$$y = 25,242x + 2,3424 - R^2 = 0,2741$$

Figura 20: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com etanol.



$$y = -9,891x + 5,1075 - R^2 = 0,1062$$



$$y = 1,6932x + 3,4431 - R^2 = 0,0551$$

Figura 21: Correlação entre os métodos Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) e Espectrofotometria (Log/mL) para avaliação da formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com biodiesel.

APENDICE C – Resumo da análise de variância

O Apêndice C apresenta as análises de variância referente a avaliação da microbiota e formação de biofilme em superfícies de tanques de combustíveis abastecidos com combustíveis: gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel.

Tabela 8: Análise de variância da microbiota pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/mL) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).

Contagem Padrão em Placa	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	10,22618	5,294	0,00157
Resíduo	41	1,931541		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 9: Análise de variância da microbiota pelo método do Número Mais Provável (Log NMP/mL) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).

NMP	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	5,273963	0,725	*****
Resíduo	41	7,27289		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 10: Análise de variância da microbiota pelo método de Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log NMP/mL) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).

Espectrofotometria	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	4,312012	4,331	0,00517
Resíduo	41	0,9957069		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 11: Análise de variância do pH dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).

pH	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	9,927582	32,096	0,00000
Resíduo	41	0,3093133		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 12: Análise de variância da turbidez dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (biodiesel e etanol).

Turbidez	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	5,571769	6,632	0,00033
Resíduo	41	0,8401691		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 13: Análise de variância da formação de biofilme pelo método de Contagem Padrão em Placa (Log UFC/cm²) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (etanol e biodiesel).

Contagem Padrão em Placa	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	77,45058	7,778	0,00000
Tempo	10	13,06143	1,312	0,22729
Combustível*Tempo	40	18,14184	1,822	0,00479
Resíduo		9,957868		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

Tabela 14: Análise de variância da formação de biofilme pelo método de Espectrofotometria no leitor de Elisa (Log UFC/cm²) dos combustíveis de origem fóssil (gasolina comum, gasolina aditivada e diesel) e biocombustíveis (etanol e biodiesel).

Espectrofotometria	GL	QM	F	SIG.
Combustíveis	4	49,91545	63,408	0,00000
Tempo	10	1,450290	1,842	0,7441
Combustível*Tempo	40	0,6239820	0,793	*****
Resíduo		0,7872130		

*($P < 0,05$) GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = frequência; SIG = significância.

ANEXO

Composição dos meios de cultura e soluções utilizadas no processo de avaliação da microbiota e formação de biofilme em amostras gasolina comum, gasolina aditivada, diesel, etanol e biodiesel.

Tabela 15: Composição dos meios de cultura utilizados para quantificação da microbiota e formação de biofilme das amostras de combustíveis.

Composição g/L		
Plate Count Ágar (PCA)	Caseína Enzimática Hidrolisada	5,00
	Dextrose	1,00
	Extrato de Levedura	2,50
	Ágar	15,00
Ágar Sabouraud (SDA)	Caseína Enzimática Hidrolisada	10,00
	Dextrose	40,00
	Ágar	15,00
Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI)	Infusão de cérebro de bezerro	200,00
	Infusão de coração de boi	250,00
	Peptona	10,0
	Dextrose	2,00
	Cloreto de sódio (NaCl)	5,00
	Fosfato disódico	2,5
Solução Salina	NaCl	8,5