

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

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DURANTE
ARMAZENAMENTO SIMULADO DA MISTURA B10 E ÓLEO DIESEL COM
DIFERENTES TEORES DE ENXOFRE.**

ALINE OLIBONI DE AZAMBUJA

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Fátima Menezes Bento
Co-orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Dörr de Quadros

Porto Alegre

Junho/2016

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

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DURANTE
ARMAZENAMENTO SIMULADO DA MISTURA B10 E ÓLEO DIESEL COM
DIFERENTES TEORES DE ENXOFRE.**

Aline Oliboni de Azambuja

Graduada em Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado

Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia da Biodegradação, Biodeterioração e Biorremediação.

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Fátima Menezes Bento

Co-orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Dörr de Quadros

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Junho/2016

CIP - Catalogação na Publicação

de Azambuja, Aline
Avaliação da contaminação microbiana durante
armazenamento simulado da mistura B10 e óleo diesel
com diferentes teores de enxofre. / Aline de
Azambuja. -- 2016.
243 f.

Orientadora: Fátima Menezes Bento.
Coorientadora: Patrícia Dörr de Quadros.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Óleo diesel. 2. Biodegradação. 3. Mistura B10.
4. Teores de enxofre. 5. Contaminação microbiana. I.
Menezes Bento, Fátima, orient. II. Dörr de Quadros,
Patrícia, coorient. III. Título.

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

*Dedico aos meus
maiores incentivadores:*

Odilon e Helena

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos órgãos de fomento à pesquisa brasileira: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa do doutorado sanduíche no exterior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de recursos financeiros para esse projeto (Edital 40-2013) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil.

Ao Office Naval Research (Projeto N62909-14-1-N18) pelo financiamento das pesquisas desenvolvidas na Universidade de Oklahoma – USA, durante o período de doutoramento no exterior.

A minha orientadora, prof. Dra. Fátima Menezes Bento, pela orientação, ensinamentos, paciência e incentivo incondicional ao longo destes quatro anos.

A co-orientadora Dra. Patrícia Dörr de Quadros pela disponibilidade e todo o valioso auxílio prestado.

A Dra. Iwona Beech e ao Dr. Jan Sunner pela orientação e oportunidade de conhecer novas tecnologias e trabalhar com um grupo de profissionais altamente qualificados durante a estada na Universidade de Oklahoma.

Ao Dr. Joseph Suflita, diretor do Centro de Biocorrosão da Universidade de Oklahoma, pelo suporte na condução das pesquisas.

A Dra. Christine Gaylarde pela valiosa oportunidade de contar com seu auxílio e experiência.

Ao prof. Dr. Marco Flores Ferrão e sua equipe pelo importante auxílio nas análises químicas.

A minha família: Oliboni de Azambuja, pelo fundamental apoio emocional e incentivos recebidos de Odilon, Helena, André, Melanie, Juliana e Manuela.

A família Steigleder, especialmente ao Ernesto pelo apoio, paciência e compreensão pela minha ausência e à Natália pelo auxílio.

Aos professores do PPGMAA pelos ensinamentos e atenção.

As colegas do LAB-BIO: Sabrina Beker, Francielle Bücken e Juciana Cazarolli por toda a ajuda prestada.

Ao grupo de pesquisa da Universidade de Oklahoma, em especial, Sukriye Aydin e Akiko Ogawa pelo auxílio nos experimentos e análise de dados.

A equipe da IPIRANGA pelo suporte técnico e fornecimento dos combustíveis.

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DURANTE ARMAZENAMENTO SIMULADO DA MISTURA B10 E ÓLEO DIESEL COM DIFERENTES TEORES DE ENXOFRE¹

Aline Oliboni de Azambuja

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Fátima Menezes Bento

Co-orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Dörr de Quadros

RESUMO

Desde 2008 o óleo diesel comercializado no território nacional tem recebido a adição crescente de biodiesel, além da redução gradativa nos teores de enxofre, que é uma tendência mundial de minimizar o impacto gerado pela queima de combustíveis fósseis. Aspectos relacionados com a qualidade final das misturas diesel com biodiesel, desde a produção até o armazenamento, tem recebido especial atenção. O objetivo desse trabalho foi avaliar a suscetibilidade à contaminação microbiana, durante o armazenamento simulado, do óleo diesel puro e mistura B10 com diferentes teores de enxofre: ULSD (S10), LSD (S50), HSD (S500) e UHSD (S1800). Os resultados dessa pesquisa mostraram que *Pseudallescheria boydii* apresentou maior habilidade de crescer na mistura B10 que *Paecilomyces variotii*. As análises de degradação, por espectroscopia no infravermelho, revelaram que os combustíveis avaliados possuem distintas características moleculares de acordo com os teores de enxofre. Os dados de RMN H⁻¹ mostraram que o diesel com maior teor de enxofre (UHSD) apresentou reduzido teor de ramificações e compostos aromáticos comparado ao diesel com menor teor de enxofre (ULSD). O sequenciamento de alto rendimento (Illumina) do rDNA 16 e 18S mostrou que os Filos mais abundantes presentes no inóculo misto ao longo do tempo foram: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Ascomycota e Basidiomycota. Os prováveis metabólitos identificados por UPLC/Q-ToF - MS, na fase aquosa, foram os ácidos: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e α -linolênico com abundância relativa de 2-10 vezes superior aos controles, indicando degradação de origem microbiana. Entre os 10 parâmetros avaliados de estabilidade química, somente a estabilidade oxidativa apresentou desconformidade com o Regulamento Técnico ANP e os níveis de contaminação microbiana, ao final de 90 dias, foram considerados aceitáveis. O conjunto de dados sugere que a redução de compostos sulfurados no diesel não induz suscetibilidade à contaminação microbiana, porém fatores como a origem da matéria prima, processo de refino e adição de biodiesel devem ser considerados. Os resultados desses estudos auxiliam na melhor compreensão dos microrganismos e metabólitos envolvidos nos processos de biocorrosão e biodeterioração do diesel e suas misturas visando a qualidade final do combustível.

Palavras-chave: óleo diesel, biodegradação, mistura B10, teores de enxofre, contaminação microbiana, armazenamento.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (243 p.) Junho, 2016.

ASSESSMENT OF MICROBIAL CONTAMINATION DURING SIMULATED STORAGE OF BLEND B10 AND DIESEL FUEL WITH DIFFERENT SULFUR CONTENTS¹

Aline Oliboni de Azambuja

Advisor: Prof. Dr. Fátima Menezes Bento

Co-Advisor: Prof. Dr. Patrícia Dörr de Quadros

ABSTRACT

Since 2008, the diesel fuel sold in the country has received the increasing addition of biodiesel, in addition to the gradual reduction in sulfur content, which is a global trend to minimize the impact generated by burning fossil fuels. Aspects related to the final quality of diesel and biodiesel blends, from production to storage, has received special attention. The aim of this study was to evaluate the susceptibility to microbial contamination during simulated storage, in pure diesel and blend B10 with different sulfur contents: ULSD (S10), LSD (S50), HSD (S500) and UHSD (S1800). The results of this research showed that *Pseudallescheria boydii* had greater ability to grow in the blend B10 than *Paecilomyces variotii*. The degradation analysis, infrared spectroscopy, showed that these fuels have different molecular characteristics according to their sulfur content. The data H¹ NMR showed that the diesel with higher sulfur content (UHSD) showed a low level of branching and aromatic compounds compared to diesel fuel with lower sulfur content (ULSD). The high throughput sequencing (Illumina) of 16S and 18S rDNA showed the Phyla most abundant present in the mixed inoculum over time were: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Ascomycota and Basidiomycota. Putative metabolites identified by UPLC / Q-ToF-MS in the water phase were: myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic and α -linolenic acids with relative abundance of 2-10 times higher than controls indicating degradation of microbial origin. Among the 10 evaluated parameters for chemical stability, only oxidative stability showed nonconformity with the ANP Technical Regulation and microbial contamination levels at the end of 90 days were considered acceptable. The data set suggest that the reduction of sulfur compounds in diesel fuel are not induced microbial susceptibility contamination, but factors such as the origin of the raw material, refining process and adding biodiesel to be considered. The results of these studies help to better understand the microorganisms and metabolites involved in the biocorrosion and biodeterioration processes of diesel and their blends aiming at the final quality of the fuel.

Keywords: diesel oil, biodegradation, blend B10, sulfur content, microbial contamination, storage.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.(243 p.) June, 2016.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Combustíveis	4
3.1.1 Situação atual dos óleos diesel e biodiesel brasileiros	4
3.1.2 Aspectos gerais da origem, composição e produção do diesel e biodiesel	4
3.1.2.1 Óleo diesel	5
3.1.2.1.1 Combustão de compostos sulfurados	6
3.1.2.1.2. Hidrodessulfurização	6
3.1.2.2 Biodiesel	7
3.2 Redução dos teores de enxofre no Brasil e no mundo	9
3.2.1 Efeito dos compostos sulfurados na suscetibilidade à contaminação microbiana	11
3.3 Problemas na estocagem da mistura diesel/biodiesel	14
3.3.1 Fatores que afetam a estabilidade dos combustíveis	15
3.3.1.1 Origem do combustível	15
3.3.1.2 Presença de água	15
3.3.1.3 Comunidade microbiana	16
3.4 Microrganismos deteriorantes de combustíveis	16
3.4.1 Diversidade microbiana deteriogênica	16
3.4.2 Ciclo do enxofre na natureza	20
3.4.3 Metabolismo microbiano na degradação de combustíveis	20
3.4.3.1 Biodegradação de alifáticos	21
3.4.3.2 Biodegradação de compostos aromáticos	24
3.4.3.3 Enzimas de degradação de hidrocarbonetos	25
3.4.3.4 Biodegradação do biodiesel	26
3.5 Técnicas de identificação de microrganismos degradadores de combustível	27
3.5.1 Métodos dependentes de cultivo	28

3.5.1.1 Métodos diretos	29
3.5.1.2 Métodos indiretos	30
3.5.2 Métodos independentes de cultivo	31
3.5.2.1 PCR e variantes da técnica	35
3.5.2.2 DGGE	35
3.5.2.3 Sequenciamento genético	36
3.5.2.3.1 Sequenciamento de nova geração – NGS	37
Referências	41
4. CAPÍTULO 1	
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TEORES DE ENXOFRE NO DIESEL PURO (B0) E NA MISTURA B10 NO CRESCIMENTO DE <i>Pseudallescheria boydii</i> E <i>Paecilomyces variotii</i>.	52
Destaques	54
Resumo	55
4.1 Introdução	56
4.2 Material e Métodos	57
4.2.1 Combustíveis utilizados	57
4.2.2 Microrganismos deteriogênicos	58
4.2.3 Condições de cultivo	58
4.2.4 Ensaio de biodegradabilidade preliminar	58
4.2.5 Interface óleo/água	59
4.2.5.1 Crescimento fúngico	59
4.2.6 Fase oleosa	59
4.2.6.1 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H ⁻¹)	59
4.2.7 Fase aquosa	60
4.2.7.1 pH	60
4.2.8 Análise estatística	60
4.3 Resultados e Discussão	61
4.3.1 Degradação preliminar com teste colorimétrico	61
4.3.2 Biomassa fúngica	62
4.3.3 Degradação do diesel e biodiesel	64
4.4 Conclusões	72
Agradecimentos	72

Referências	72
5. CAPÍTULO 2	
MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION IN BRAZILIAN STORED DIESEL FUEL OF VARYING SULFUR CONTENT, USING HIGH THROUGHPUT SEQUENCING.	
.....	76
Highlights	78
Abstract	79
5.1 Introduction	80
5.2 Materials and Methods	81
5.2.1 Fuels and sulfur content evaluation	81
5.2.2 Microbial contamination	81
5.2.3 Simulated storage	81
5.2.4 Water phase analysis	82
5.2.5 Oil-water interface analysis	82
5.2.5.1 Biomass	82
5.2.5.2 DNA extraction	83
5.2.5.3 Analysis of the microbial community by high throughput sequencing	83
5.2.6 Oil phase analysis	85
5.2.6.1 HATR- FTIR	85
5.2.6.2 H ¹ NMR	85
5.2.7 Statistical analysis	85
5.3 Results and Discussion	86
5.3.1 Microbial growth and sulfur content	86
5.3.2 Microbial community composition determined by high throught sequencing analysis	87
5.3.2.1 Analysis of 16S rRNA gene	87
5.3.2.2 Analysis of 18S rRNA gene	89
5.3.2.3 Responses of microbial community to sulfur content	90
5.3.3 HATR- FTIR and H ¹ NMR analysis	94
5.4 Conclusions	97
Acknowledgements	97
References	97
Supplementary Material	102

6. CAPÍTULO 3

EFFECT OF SULFUR CONTENT ON MICROBIAL COMPOSITION AND BIODEGRADATION OF BRAZILIAN FUEL BLEND B10. 106

Abstract 109

6.1 Introduction 110

6.2 Materials and Methods 111

6.2.1 Fuels 111

6.2.2 Microbial contamination levels 111

6.2.3 Simulated storage 112

6.2.4 Physical/chemical analysis 112

6.2.5 Microbiological analysis 112

Biomass 112

DNA extraction 112

PCR conditions and high throughput sequencing 113

Bioinformatics 114

UPLC-HRMS 115

Metabolomics identification 116

6.3 Results 116

6.3.1 Microbial growth 116

6.3.2 Diesel and biodiesel degradation (HATR/FTIR and ¹H NMR analyses) 117

6.3.3 Microbial community profile 118

16S rRNA gene 118

18S rRNA gene 120

6.3.4 Metabolic profile 121

6.4 Discussion 125

Associated Content 129

Author Information 130

Acknowledgment 130

References 130

Supporting Information 138

7. CAPÍTULO 4

MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE ABIÓTICA E BIÓTICA DURANTE ARMAZENAMENTO SIMULADO DA MISTURA BRASILEIRA B10-S10. 145

Destaques 148

Resumo	148
7.1 Introdução	149
7.2 Material e Métodos	150
7.2.1 Combustíveis utilizados	150
7.2.2 Experimento piloto	151
7.2.3 Inóculo não caracterizado e condições de cultivo	152
7.2.4 Análises microbianas	152
7.2.4.1 Estimativa de heterotróficos cultiváveis pela técnica de laminocultivos (UFC/mL)	152
7.2.4.2 Detecção de bactérias ferredutoras e bactérias redutoras de sulfato (BRS)	153
7.2.4.3 Identificação dos isolados por sequenciamento Sanger (16S rRNA)	153
7.2.4.4 Determinação da biomassa	154
7.2.5 Análises Físico-Químicas	155
7.2.5.1 Temperatura e pH	155
7.2.5.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	155
7.2.5.3 Estabilidade ao armazenamento da mistura B10	155
7.3 Resultados e Discussão	156
7.3.1 Análise dos parâmetros físico-químicos	156
7.3.1.1 Temperatura e pH	156
7.3.1.2 Estabilidade química	157
7.3.2 Análises bióticas	165
7.3.2.1 Estimativa da contaminação microbiana	165
7.3.2.2 Microrganismos deteriorantes em meios de cultivo seletivo	167
7.3.2.2.1 Identificação molecular com sequenciamento total do gene rRNA 16S ..	168
7.3.2.3 Produção de sedimentos biológicos e químicos	168
7.3.3 Avaliação da degradação	169
7.4 Conclusões	173
Agradecimentos	174
Referências	174
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	180
9. CONCLUSÕES	190
REFERÊNCIAS	191
ANEXO 1 - Certificado de ensaio do óleo diesel A S10	196

ANEXO 1A - Certificado de ensaio do óleo diesel A S10	197
ANEXO 2 - Certificado de ensaio do óleo diesel A S50	198
ANEXO 3 - Certificado de ensaio do óleo diesel A S500,.....	199
ANEXO 3A - Certificado de ensaio do óleo diesel A S500	200
ANEXO 4 - Certificado de ensaio do óleo diesel A S1800	201
ANEXO 4A - Certificado de ensaio do óleo diesel A S1800	202
ANEXO 5 - Certificado de qualidade do biodiesel B100	203
ANEXO 5A - Certificado de qualidade do biodiesel B100	204
ANEXO 5B - Certificado de qualidade do biodiesel B100	205
ANEXO 6 - Regulamento Técnico ANP Nº 4/ 2013,.....	206
ANEXO 7 - Regulamento Técnico ANP Nº 2/ 2016,.....	211
ANEXO 8 - Regulamento Técnico ANP Nº 3/ 2014,.....	214

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA Página

Tabela 1. Evolução dos teores de enxofre comercializados no Brasil. 10

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Combustíveis utilizados no experimento e teores de enxofre avaliados pelas distintas empresas. 57

Tabela 2. Tempo de viragem do indicador-redox (DCPIP) para *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* indicando a degradação do diesel puro (B0) e mistura B10 com diferentes teores de enxofre. 62

Tabela 3. Áreas correspondentes aos distintos hidrogênios presentes no diesel puro e na mistura B10 com diferentes teores de enxofre após 14 dias. 69

CAPÍTULO 2 Página

Supplementary Material

Table S1. Number of reads obtained from 16S rRNA gene (Bacteria and Archaea) sequencing, and number of OTUs from Phylum to Genus level, detected in each microcosm with different sulfur content S1800, S500, S50 and S10 at 40, 30, 20 and 10 days. 104

Table S2. Number of reads obtained from 18S rRNA gene (Eukarya) sequencing, and number of OTUs from Phylum to Genus level, detected in each microcosm with different sulfur content S1800, S500, S50 and S10 over 40 days. 105

CAPÍTULO 3 Página

Table 1. Putative fatty acids identified in the water phase of B10 with various sulfur levels at 40 days. 124

Supporting Information (SI)

Table S1. Characteristics of the fuels used in the preparation of the B10 blend with different sulfur contents at time zero. 138

Table S2. Corresponding areas to the different hydrogens present in the B10 blend with different sulfur contents at time zero and 40 days of experiment. 139

Table S3. Average of relative abundance for the taxonomic level of Phylum, Class, Order and Family representative of 16S rRNA gene sequencing from the initial

inoculum (time zero) and high contamination treatment in the B10 blend with ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) present at the interface and water phase over 40 days. 140

Table S4. OTU abundance from 16S rRNA gene sequencing of the initial inoculum (time zero) and high contamination treatment in the B10 blend with ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) present at the interface and water phase at 40 days. 142

Table S5. OTU abundance from 18S rRNA gene sequencing of the initial inoculum (time zero) and high contamination treatment in the B10 blend with ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) present at the interface and water phase at 40 days. 142

Table S6. Metabolic pathways detected in the water phase from high contamination treatment of the B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) UHSD (≤ 1800 ppm sulfur), at 40 days. 143

CAPÍTULO 4

Página

Tabela 1. Identificação dos tanques experimentais de acordo com os níveis de contaminação microbiana e presença de água no fundo dos tanques. 151

Tabela 2. Análises físico-químicas dos combustíveis: biodiesel puro (B100); diesel puro (B0 S10) e da mistura B10, utilizados nesse estudo no tempo inicial (tempo zero). 158

Tabela 3. Monitoramento das propriedades referentes a estabilidade química da mistura B10 ao final de 90 dias de avaliação. 161

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA	Página
Figura 1. Principais hidrocarbonetos encontrados no petróleo bruto (Fonte: Alves et al., 1999).	5
Figura 2. Reação geral de transesterificação de triglicerídeos (Fonte: Lobo & Ferreira, 2009).	8
Figura 3. Teores máximos de enxofre (ppm) no combustível diesel em diferentes partes do mundo (Junho de 2016) (Fonte: http://www.unep.org).	9
Figura 4. Esquema geral do metabolismo aeróbio de degradação de <i>n</i> -alcanos (Fonte: Cruz & Marsaiole, 2012).	22
Figura 5. Esquema geral do metabolismo anaeróbio de degradação de hidrocarbonetos. (A) : Ativação via fumarato; (B) : Ativação via carboxilação em C-3 (Fonte: Cruz & Marsaiole, 2012).	23
Figura 6. Esquema geral do metabolismo aeróbio de degradação de compostos aromáticos (Fonte: Cruz & Marsaiole, 2012).	25
Figura 7. Esquema geral do metabolismo de degradação do biodiesel (hidrólise do éster ácido linoléico) (Fonte: Cooper, 2000 <i>apud</i> Bücker, 2009).	27
Figura 8. Desenho esquemático representando a integração das meta-ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) gerando diferentes redes de informações. 2D- PAGE: gel bidimensional; DIGE: eletroforese em gel diferencial; NMR: ressonância magnética nuclear; PPI: interação proteína-proteína (Fonte: Hernández-Prieto et al., 2014).	32
Figura 9. Representação esquemática das etapas do sequenciamento utilizado na plataforma Illumina. (A) Etapa de fragmentação: o DNA é fragmentado e ligado aos adaptadores em ambas às extremidades. (B) Etapa de adesão ao suporte: as moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido contendo oligonucleotídeos de alta densidade complementares aos adaptadores. (C) Etapa de anelamento: no primeiro ciclo de amplificação o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte formando uma estrutura em ponte. (D) Etapa de extensão: com adição dos reagentes a PCR inicia com a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como <i>primer</i> . (E) Etapa de desnaturação: com a elevação da temperatura a “ponte” é desfeita. (F) Etapa de repetição do anelamento: sucessivos anelamentos formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. (G) Etapa de obtenção dos <i>clusters</i> : após sucessivos ciclos são obtidos <i>clusters</i> de moléculas idênticas ligadas ao suporte. (H) Etapa de adição dos nucleotídeos marcados e excitação: incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser gerando um sinal. (I) Etapa de leitura dos nucleotídeos: o sinal é captado por dispositivo de leitura e interpretado	

como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia. **(J, K)** Etapa de repetição dos nucleotídeos marcados, excitação e leitura: o processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura são repetidos para cada nucleotídeo componente da sequência. **(L)** Montagem das sequências: a leitura é feita de forma sequencial permitindo a montagem das sequências completas de cada *cluster* (Fonte: modificado de Carvalho & Silva, 2010). 39

CAPÍTULO 1

Página

Figura 1. Teste de biodegradabilidade da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) para os fungos deteriorogênicos na fase aquosa contendo o meio mineral Bushnell-Haas e o indicador redox DCPIP. **A:** *Pseudallescheria boydii* (*Pb*); **B:** *Paecilomyces variotii* (*Pv*). 61

Figura 2. Teste de biodegradabilidade do diesel puro com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) para os fungos deteriorogênicos na fase aquosa contendo o meio mineral Bushnell-Haas e o indicador redox DCPIP. **A:** *Pseudallescheria boydii* (*Pb*); **B:** *Paecilomyces variotii* (*Pv*). 61

Figura 3. Valores do peso seco da biomassa (mg), formada na interface óleo/água, de *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no óleo diesel puro com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800), após 14 dias de experimento. 63

Figura 4. Valores do peso seco da biomassa (mg), formada na interface óleo/água, de *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* na mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800), após 14 dias de experimento. 64

Figura 5. Dendrograma resultante dos espectros no infravermelho do diesel puro (B0) com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) com os fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* aos 14 dias de avaliação. T0: tempo zero; CT: controle estéril. 65

Figura 6. Análise do componente principal (PCA) obtido pela análise no infravermelho da fase oleosa do diesel puro (B0) com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800) e os fungos deteriorogênicos: *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* após o 14^o dia de armazenamento simulado. T0: tempo zero; CT controle estéril. 66

Figura 7. Dendrograma resultante dos espectros no infravermelho da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) com os fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* aos 14 dias de avaliação. T0: tempo zero; CT controle estéril. 67

Figura 8. Análise do componente principal (PCA) obtido pela análise no infravermelho da fase oleosa da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800) e os fungos deteriorogênicos: *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no 14^o dia de armazenamento simulado. T0: tempo zero; CT controle estéril. 68

Figure 1. Microcosms simulating storage of diesel oil of varying sulfur content (ULSD \leq 10 ppm sulfur; LSD \leq 50 ppm sulfur; HSD \leq 500 ppm sulfur and UHSD \leq 1800*).
..... 82

Figure 2. Interfacial biomass formed in diesel with different sulfur contents: ULSD (\leq 10 ppm sulfur); LSD (\leq 50 ppm sulfur); HSD (\leq 500 ppm sulfur) and UHSD (\leq 1800 ppm sulfur), in the control (sterile), as received and inoculated (ASTM E1259-10) treatments during simulated storage for 10, 20, 30 and 40 days.
..... 86

Figure 3. The relative abundance of Phyla (\geq 1 %), represented as a proportion of 16S rRNA gene reads of the total number of reads from simulated storage of diesel oil of varying sulfur content: **a:** ULSD (\leq 10 ppm sulfur); **b:** LSD (\leq 50 ppm sulfur); **c:** HSD (\leq 500 ppm sulfur) and **d:** UHSD (\leq 1800 ppm sulfur) for 10, 20, 30 and 40 days. Others*: Phyla < 1 %.
..... 88

Figure 4. Principal component analysis (Spearman correlation-based PCA) of the results of biomass, pH and microbial relative abundance after 40 days' incubation. **A:** 16S rRNA gene analysis at the Phylum level. **B:** 18S rRNA gene analysis at the Phylum level. ULSD (\leq 10 ppm sulfur); LSD (\leq 50 ppm sulfur); HSD (\leq 500 ppm sulfur) and UHSD (\leq 1800 ppm sulfur).
..... 91

Figure 5. Heat map of the classified OTUs with relative abundance (\geq 0.1 %) from rRNA 16S gene, to Family level (ascendant hierarchical clustering based on Euclidian distances) and Shannon Diversity Index (SDI) for treatments with different sulfur contents: ULSD (\leq 10 ppm sulfur); LSD (\leq 50 ppm sulfur); HSD (\leq 500 ppm sulfur) and UHSD (\leq 1800 ppm sulfur) for 10, 20, 30 and 40 days. Similarity between treatments are characterized by horizontal rectangles of homogeneous color along the map. Similar individuals are characterized by vertical rectangles of homogeneous color along the map. From red to yellow = 1 to -1.
..... 92

Figure 6. Dendrograms of infrared spectra of various sulfur content diesels: ULSD (\leq 10 ppm sulfur); LSD (\leq 50 ppm sulfur); HSD (\leq 500 ppm sulfur) and UHSD (\leq 1800 ppm sulfur) showing biodegradation in as received (R); non-characterized inoculum (I) and sterile control (C), at time zero and after 40 days.
..... 94

Figure 7. Proton nuclear magnetic resonance spectra (H^1 NMR) of the oil phase of the inoculated treatment after 40 days. Red: ULSD (\leq 10 ppm sulfur); Blue: UHSD (\leq 1800 ppm sulfur).
..... 95

Supplementary Material

Página

Figure S1. Analysis of sulfur contents in $mg\ kg^{-1}$ (ppm) present in diesel used in the experiment at time zero, by different Companies. In this study it was selected the Company B as a parameter in the analysis of sulfur content.
..... 102

Figure S2. Sulfur content in mg kg⁻¹ (ppm) present in diesel for the controls, inoculated treatments and as received after 40 days of experiment. The values refer to the average of triplicates for each treatment. 103

CAPÍTULO 3

Página

Figure 1. Interfacial biomass formed in B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur), in the control (sterile), as-received ($\sim 10^3$ CFU L⁻¹) and inoculated ($\sim 10^6$ bacterial cells and fungal spores mL⁻¹) treatments during simulated storage for 10, 20, 30 and 40 days. *Means followed by the same letter do not differ at 5 % probability by Tukey test. Error bars represent the standard errors of triplicate incubations.* 117

Figure 2. Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectrum (¹H NMR) for the oil phase of the HSD B10 blend from the high contamination (inoculated) treatment. **A:** Biodiesel degradation at time zero (blue) and at 40 days (red). **B:** Diesel degradation time zero (red) and at 40 days (blue). 118

Figure 3. Mean of the relative abundance between 10, 20, 30 and 40 days obtained by 16S rRNA gene sequencing, for the bacterial genera found in the initial inoculum (time zero) and high contamination (inoculated) treatment in the B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) in the interface (**I**) and water phase (**WP**) microcosm. 119

Figure 4. Mean of the relative abundance between 10, 20, 30 and 40 days obtained from 18S rRNA gene sequencing, for the fungal classes found in the initial inoculum (time zero) and high contamination (inoculated) treatment in the B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) in the interface (**I**) and water phase (**WP**) microcosm. 121

Figure 5. Distribution profile of putative lipid metabolites detected in the water phase of the high contamination (inoculated) treatment in the B10 blend with different sulfur contents at 40 days. **Treatments:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur), HSD (≤ 500 ppm sulfur), UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); **Controls** (sterile): ULSDct; HSDct; UHSDct; **Blank:** mineral medium Bushnell-Hass. **A:** Overview of PCA (PC 1 - PC 5); **B:** PCA with PC 1 and PC 2 score plot; **C:** hierarchical clustering analysis combined with heat mapping. 123

Figure 6. Relative abundance of putative fatty acids (lipid metabolism) identified in the water phase of the high contamination (inoculated) treatment of B10 blend with different sulfur contents at 40 days. **Treatments:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur), HSD (≤ 500 ppm sulfur), UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); **Controls** (sterile): ULSDct; HSDct; UHSDct; **Blank:** mineral medium Bushnell-Hass. **A:** Myristic acid (Tetradecanoic acid); **B:** Palmitic acid (Hexadecanoic acid); **C:** Stearic acid (Octadecanoic acid); **D:** Oleic acid ([FA (18:1)]9Z-ctadecenoic acid); **E:** Linoleic acid (Linoleate); **F:** α -Linolenic acid ([FA(18:3)]9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid). Relative intensity varies according to mean of peak intensity for each putative metabolite. Fatty acids A-C were detected in low abundance (1.0×100000) compared to fatty acids D-E in high abundance (6.0×100000), but statistically different from controls ($p < 0.05$). 125

Figure S1. Dendrograms resulting from infrared spectra for the oil phase of the B10 blend with different sulfur contents at time zero (T0) and 40 days (T40). **A:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur); **B:** HSD (≤ 500 ppm sulfur); **C:** UHSD (≤ 1800 ppm sulfur). **Treatments:** high contamination (**I**): $\sim 10^6$ bacterial cells and fungal spores mL^{-1} ; Low contamination (**R**): $\sim 10^3$ CFU L^{-1} ; **Controls (C):** sterile. 138

CAPÍTULO 4

Figura 1. Valores das temperaturas internas ($^{\circ}\text{C}$) dos tanques, registradas durante 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento (Janeiro a Abril/ 2013). 156

Figura 2. Valores de temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$), da área de armazenamento dos tanques, registradas durante 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento (Janeiro a Abril/ 2013). 156

Figura 3. Vista externa e interna dos tanques (Tq) no tempo zero (24/01/2013). ... 158

Figura 4. Vista externa e interna dos tanques (Tq) após os 90 dias de armazenamento (24/04/2013). 159

Figura 5. Aspecto da mistura B10 S10 com microgotículas de água, coletadas em tanques sem a adição de água (Tanques 3, 4, 7, 8), após 90 dias de experimento..... 160

Figura 6. Aparência interna do tanque e aspecto do material coletado (origem química ou biológica) encontrado no fundo dos tanques com adição de água (Tanques 1, 2, 5, 6), após 90 dias de experimento. 160

Figura 7. Gráficos PC1 X PC2 de escores (**A**) e de pesos (**B**) para a análise por componentes principais empregando os parâmetros: % biodiesel (B); massa específica (d); índice de acidez (IA); teor de água (KF); estabilidade oxidativa (EO) e teor de enxofre (S). 164

Figura 8: Gráficos PC1 X PC3 de escores (**A**) e de pesos (**B**) para a análise por componentes principais empregando os parâmetros: % biodiesel (B); massa específica (d); índice de acidez (IA); teor de água (KF); estabilidade oxidativa (EO) e teor de enxofre (S). 164

Figura 9. Estimativa de microrganismos cultiváveis da fase oleosa (todos os tanques) e aquosa (Tanques 1, 2, 5 e 6) da mistura B10 pela técnica de laminocultivos, na condição de recebido e média contaminação. **A:** fase oleosa - Fungos; **B:** fase oleosa - Bactérias; **C:** fase aquosa - Fungos; **D:** fase aquosa - Bactérias. 165

Figura 10. Estimativa de microrganismos cultiváveis na fase oleosa (todos os tanques) e fase aquosa (Tanques 1, 2, 5, e 6) da mistura B10 pela técnica de laminocultivos, na condição de recebido e média contaminação. **A:** fase oleosa - Microrganismos totais; **B:** fase aquosa - Microrganismos totais. 166

- Figura 11.** Produção de biomassa/sedimentos formada na condição de Postos (com adição de água) nos tanques com baixa (Tanques 1 e 2) e média contaminação microbiana (Tanques 5 e 6) no tempo 90 dias. 169
- Figura 12.** Dendrograma obtido para os espectros no infravermelho da fase oleosa da mistura B10 para todos os tanques nos tempos 0, 15, 30, 60, 90. 170
- Figura 13.** Gráfico de escores PC1 x PC2 para a análise por componentes principais (PCA) dos espectros no infravermelho para a fase oleosa da mistura B10 de todos os tanques no tempo 90 dias de estocagem. 171
- Figura 14.** Gráfico dos pesos obtido pela análise no infravermelho da fase oleosa de todos os tanques no tempo 90 dias de estocagem. 172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFNOR	Associação Francesa de Normas Técnicas - <i>Association Française de Normalization</i>
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APS	Adenosina Fosfosulfato
ARLA	Agente Redutor Líquido Automotivo
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
B0	Óleo diesel puro
B10	Biodiesel puro adicionado 10 % em 90 % de diesel puro
BH	Bushnell e Haas meio mineral
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRF	Bactérias Redutoras de Ferro
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
°C	Graus Célsius
CEN	<i>European Committee for Standardization</i>
CIM	Corrosão Induzida por Microrganismos - <i>Microbiologically Influenced Corrosion (MIC)</i>
CLPP	Perfil Fisiológico da Comunidade - <i>Community Level Physiological Profiles</i>
CoA	Coenzima A
CTAQ	Centro de Tecnologia Aplicada e da Qualidade
DBT	Dibenzotiofeno
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOU	Diário Oficial da União
dsrAB	Enzima dissimilatória sulfito redutase
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EN	Norma Européia

FAME	Éster Metílico de Ácido Graxo - <i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformado de Fourier e Refletância Atenuada Total - <i>Fourier Transform Infrared</i>
GC	Cromatografia Gasosa
GEE	Gases do Efeito Estufa
h	Hora
HCA	Análise de Agrupamento Hierárquico
HDS	Hidrodessulfurização
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HRMS	Espectrometria de Massas com Alta Resolução acima de 10 ⁴
HSD	Diesel com alto teor de enxofre - <i>High Sulfur Diesel</i>
IP	Instituto de Petróleo
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ITS	Separador Transcrito Interno - <i>Internal Transcribed Spacer</i>
g	Grama
KEGG	Kyoto Enciclopédia de Genes e Genomas
kg	Quilograma
L	Litro
LSD	Diesel com baixo teor de enxofre - <i>Low Sulfur Diesel</i>
LSU	Subunidade maior do ribossomo
MDA	Ágar Malte Dextrose
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Espectrometria de Massas
NCBI	<i>National Center of biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração - <i>Next Generation Sequencing</i>
NOx	Óxido de Nitrogênio
OK	Oklahoma
PAPS	Fosfoadenosina Fosfosulfato
pb	Pares de bases

PCA	Análise do Componente Principal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Material Particulado
ppm	Partes por milhão
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
qPCR	PCR quantitativo
Q-ToF/MS	Espectômetro de massas tempo de voo quadrupolar
RLU	Unidade Relativa de Luz
RMN H ¹	Resonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m.	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcriptase reversa
s	Segundo
S	Enxofre
SDI	Índice de Diversidade de Shannon - <i>Shannon Diversity Index</i>
SI	Supporting Information
SOx	Óxido de Enxofre
SPE	Substância Polimérica Extracelular - <i>Extracellular Polymeric Substance</i> (EPS)
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
SSU	Subunidade menor do ribossomo
TSA	Ágar Triptona de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia – <i>Colony Forming Unit</i> (CFU)
UHSD	Diesel com ultra alto teor de enxofre - <i>Ultra High Sulfur Diesel</i>
ULSD	Diesel com ultra baixo teor de enxofre - <i>Ultra Low Sulfur Diesel</i>
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UTO	Unidade Taxonômica Operacional – <i>Operational Taxonomic Unit</i> (OTU)
µL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

As legislações ambientais mundiais têm sido introduzidas com o objetivo de reduzir os teores de enxofre dos combustíveis fósseis a níveis ultra-baixos, visando à melhoria da qualidade do ar. O enxofre é o principal responsável pela liberação de partículas de óxidos de nitrogênio (NO_x) e óxidos de enxofre (SO_x), durante a combustão, sendo também o causador da oxidação catalítica dos veículos reduzindo a eficácia no tratamento de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e matéria orgânica volátil (Stanislaus et al., 2010; Grishin & Zinina, 2015).

Atualmente no Brasil existem dois tipos de óleo diesel de uso rodoviário sendo comercializados. O diesel com até 500 mg kg⁻¹ (ppm), de enxofre (S500) e o diesel com ultra baixo teor de enxofre (ULSD), com até 10 mg kg⁻¹ (ppm) (S10) (Resolução ANP 50/2013). Com a introdução do biodiesel, na matriz energética brasileira, em 2005 (Lei 11.097), foram estabelecidos percentuais mínimos de biodiesel ao diesel mineral, e a mais recente obrigatoriedade é de 7 % de biodiesel puro, (B100) adicionado ao diesel (B0), com previsão de atingir 10 % em 2019 (Lei 13.263, DOU 24.03.2016).

Ambos os combustíveis apresentam vantagens na perspectiva de proteção ambiental, no entanto geram alguns problemas quando utilizados em sistemas de combustíveis (Passman & Dobranic, 2005; Knothe & Steidley, 2005; Sharma et al., 2008; Yang et al., 2008; Knothe, 2010; Sørensen et al., 2011; Passman, 2012; Moser, 2014; Suflita et al.; 2014). O biodiesel possui algumas vulnerabilidades, como a baixa estabilidade química, presença de ácidos graxos de cadeia longa e capacidade de reter água, e por essas razões, mais suscetível à contaminação microbiana (Tyagi et al., 2010; Das & Chandran, 2011; Jakeria et al.; 2014). O enxofre é considerado um antagonista do crescimento microbiano, porém recentemente alguns estudos têm abordado a contaminação microbiana em misturas de diesel/biodiesel contendo diferentes teores de enxofre (Passman & Dobranic, 2005; Lee et al., 2010; Dodos et al., 2011; Dunn, 2011; Sirivastava & Nandan, 2012; Lyles et al., 2013; Suflita et al., 2014).

Existe uma forte pressão dos órgãos ambientais para a redução dos níveis de enxofre no óleo diesel e, em virtude disso, muitos países buscam se adequar às novas exigências do mercado mundial visando à inserção de um produto que tenha mínimo impacto ambiental e seja competitivo economicamente. Considerando o

cenário brasileiro, um país com dimensões continentais, diferentes teores de enxofre sendo comercializados (S500 e S10); diferentes substratos sendo utilizados na produção de biodiesel (soja, mamona, dendê, sebo bovino, etc); diferentes condições climáticas e principalmente distintas práticas de manuseio poderão comprometer a qualidade do combustível final. A falta de informações sobre as consequências da redução de enxofre e a suscetibilidade à contaminação microbiana, como principal fator de deterioração do diesel e misturas com biodiesel, tem despertado enorme interesse sobre como será o futuro desses combustíveis. A identificação de microrganismos deteriogênicos permitirá elucidar quais grupos são mais abundantes (bactérias, arqueas e fungos) no interior dos tanques de combustível já que métodos convencionais de cultivo não são capazes de caracterizar a diversidade real. O conhecimento das espécies que compõem a comunidade microbiana e os metabólitos provenientes da degradação permitirá sugerir métodos para detectar, monitorar e controlar o processo de biodeterioração que ocorre atualmente, em tanques sem a devida manutenção, como a falta de drenagem e limpeza periódica. Desta forma, experimentos foram conduzidos envolvendo o crescimento de fungos filamentosos, além de lodo biológico, oriundo de tanques de armazenamento, no diesel puro e na mistura B10 confeccionada com óleo diesel com diferentes teores de enxofre, tais como S1800, S500, S50 e S10.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade à contaminação microbiana durante o armazenamento de óleo diesel puro e mistura B10 com diferentes teores de enxofre.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Verificar o crescimento e a produção de biomassa de fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* em diferentes concentrações de enxofre no diesel puro (B0) e na mistura B10 e sua relação com a biodegradação.

2.2.2 Revelar a comunidade microbiana com o uso de sequenciamento de nova geração (Illumina HiSeq); acompanhar a biomassa formada na região interfacial e a degradação do óleo diesel puro com diferentes teores de enxofre.

2.2.3 Avaliar o comportamento da biomassa microbiana em termos de composição (Illumina MiSeq), metabólitos e degradação da mistura B10, confeccionada com óleo diesel com diferentes teores de enxofre.

2.2.4 Monitorar a degradação abiótica e biótica em tanques simulados de 20 L (escala piloto) em duas condições de contaminação microbiana na mistura B10 S10 durante 90 dias.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Combustíveis

3.1.1 Situação atual dos óleos diesel e biodiesel brasileiros

O óleo diesel é um combustível amplamente versátil, sendo utilizado tanto em veículos auto-motores (carros, ônibus e caminhões) como fora das estradas em sistemas de transporte (locomotivas, embarcações marítimas, equipamentos, etc). Os motores a diesel são cerca de 40 % mais eficientes que os motores a gasolina, no entanto, do ponto de vista ambiental e de saúde, geram mais emissões de materiais particulados (PM), óxidos de nitrogênio (NOx) e óxidos de enxofre (SOx). Em função disso, legislações ambientais estão sendo introduzidas em todo o mundo para reduzir os teores de enxofre no diesel a níveis ultra baixos (10 - 15 ppm) (Stanislaus et al., 2010; Pawelec et al., 2011; Sufliya et al., 2014; Grishin & Zinina, 2015). Desde 2009 os teores de enxofre, no diesel brasileiro, vêm sofrendo alterações (Resolução ANP 65/2011) e atualmente o país utiliza os dieséis de uso rodoviário com 10 mg kg⁻¹ (ppm) de enxofre (S10) e 500 mg kg⁻¹ (ppm) de enxofre (S500) (Resolução ANP 50/2013).

O Brasil ocupa uma posição de destaque entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel no mundo com uma produção anual de cerca de 3,3 milhões de metros cúbicos (Portal ANP, 2015). A introdução desse biocombustível na matriz energética brasileira ocorreu em 2005 (Lei 11.097), estabelecendo percentuais mínimos de mistura do biodiesel (B100) ao diesel mineral (B0). Desde então, os percentuais da mistura vêm crescendo - B2 (2008), B4 (2009), B5 (2010), B6 (2014) e B7 (2014) - e a nova legislação (Lei 13.263, DOU 24.03.2016) dita a obrigatoriedade de um aumento, até 2019, de 10 % de biodiesel (B100) adicionado ao diesel mineral (B0), sendo denominada de mistura B10.

3.1.2 Aspectos gerais da origem, composição e produção do diesel e biodiesel

O petróleo bruto é composto por uma grande variedade de substâncias orgânicas como hidrocarbonetos misturados ao oxigênio, nitrogênio, compostos de enxofre orgânico e inorgânico. Os hidrocarbonetos podem ser lineares e ramificados, saturados e insaturados, alifáticos, alicíclicos, aromáticos e poliaromáticos (Figura 1) variando conforme a sua origem (Gaylarde et al., 1999; Yemashova et al., 2007) e geralmente estão distribuídos da seguinte forma: alcanos (30 %), cicloalcanos (49 %), compostos aromáticos (15 %), asfaltenos (6 %), compostos orgânicos (contendo O,

N, S) e compostos organometálicos que são encontrados em pequenas quantidades. As moléculas dos hidrocarbonetos no óleo bruto possuem de 5 a 40 carbonos e durante o processo de refino, os componentes são separados com base nos pontos de ebulição individuais (Viggor et al., 2013).

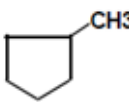

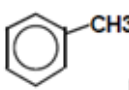
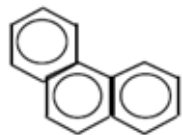

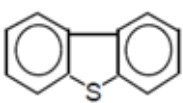
ALIFÁTICOS	n-Hexadecano	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3$
	2-metiltetradecano	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{CH} - (\text{CH}_3)_2$
CÍCLICOS	1 - metilciclopentano	
	Ciclohexano	
AROMÁTICOS	Tolueno	
	Fenantreno	
"NSO" *	Piridina	
	Dibenzotiofeno	

Figura 1. Principais hidrocarbonetos encontrados no petróleo bruto (Fonte: Alves et al., 1999). *Hidrocarbonetos que contém nitrogênio, enxofre ou oxigênio na sua estrutura.

No petróleo já foram encontradas mais de 200 estruturas correspondentes aos compostos organosulfurados, incluindo os tióis, sulfeto orgânico, dissulfetos e derivados tiofenos (Londry & Suflita, 1998). O enxofre presente no óleo bruto está em distintas concentrações, variando entre 0,05 até 13,95 % (de peso) e essa concentração pode aumentar de acordo com intervalo do ponto de ebulição e da fração destilada do combustível (Grossman et al., 1999).

3.1.2.1 Óleo diesel

O óleo diesel, que corresponde a fração intermediária média do petróleo, possui elevado teor de carbono, metais, asfaltenos e apresenta menor estabilidade em relação à fração mais leve. O óleo diesel é composto de hidrocarbonetos, com ponto de ebulição entre 150 °C e 400 °C e de cadeias carbônicas com C₁₅-C₂₂. Tais características, assim como distintas concentrações de enxofre, diferem e classificam o combustível de país para país (Gaylarde et al., 1999; Srivastava & Nandan, 2012). Em relação à composição da molécula, o diesel possui cerca de 40 % de alifáticos e

alcanos cíclicos e cerca de 22 % de aromáticos (com um ou dois anéis), mais os compostos sulfurados que podem variar entre 0,04 a 6 % (v/v) (Abbad-Anadloussi et al., 2003; Cyplik et al., 2011; Suflita et al., 2014; Al-Degs & Al-Ghouti, 2015).

3.1.2.1.1 Combustão de compostos sulfurados

Quando o combustível sofre a combustão, o enxofre presente é liberado na forma de material particulado e gases tóxicos. Inúmeros são os prejuízos acarretados com a presença de compostos sulfurados nos combustíveis, entre eles, as emissões de NO_x, juntamente com os hidrocarbonetos promovem a elevação dos níveis de ozônio na troposfera, assim como os gases SO_x que provocam a chuva ácida. O dióxido de carbono (CO₂), óxido nitroso (N₂O) e o metano (CH₄), chamados de gases do efeito estufa (GEE), estão estreitamente relacionados à queima de combustível e consequente aquecimento global, aliados aos não menos importantes: hidrocarbonetos não metânicos, dióxido de nitrogênio (NO₂) e ozônio (O₃). Os hidrocarbonetos poliaromáticos são responsáveis pelas partículas ou fuligem emitida no diesel, além dos traços de enxofre presentes no combustível para motores a diesel prejudicando os catalisadores de oxidação no controle de emissões e redução na eficácia do tratamento de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e matéria orgânica volátil (Pawelec et al., 2011). Em virtude dessas questões, os teores de enxofre nos combustíveis vêm sendo regulamentados, e devem ser removidos durante o processo de refino (Hadder et al., 1991; Grossman et al., 1999; Pawelec et al., 2011; Grishin & Zinina, 2015).

3.1.2.1.2 Hidrodessulfurização

Na etapa de refino do petróleo, esse passa por diferentes fases (separação, craqueamento, polimerização ou alquilação e mistura), além de outros tratamentos como dessalinização, desidratação e dessulfurização alterando a composição do produto final (Stanislaus et al., 2010).

A hidrodessulfurização ou hidrotreatamento também chamado de HDS é a remoção do enxofre do combustível. Esse processo é catalítico, convertendo o enxofre orgânico a gás sulfídrico, numa reação que adiciona hidrogênio sob altas pressões (> 100 atm) e temperaturas (> 300 °C), de acordo com o nível de dessulfurização necessária. Embora o HDS possa facilmente remover o enxofre inorgânico ou compostos de enxofre orgânico, no processo de destilação do petróleo, a fração destilada média a qual origina o óleo diesel, apresenta quantidades importantes de benzotiofenos e dibenzotiofenos (DBTs), que são mais difíceis de

remover. Entre eles os DBTs promovem substituições adjacentes nas porções do enxofre impedindo estericamente a catálise e conseqüentemente a redução nos níveis de enxofre desejados. Para atingir os níveis ultra baixos de enxofre no diesel, conforme regulamentação mundial, é necessário uma profunda dessulfurização do combustível. No entanto, existe uma série de fatores que devem ser considerados. A fonte e qualidade da matéria-prima, catalisadores, reatividade dos compostos de enxofre, efeito da inibição do H₂S, compostos nitrogenados, aromáticos, parâmetros do processo, entre outros, são fatores que apresentam uma grande influência no grau de dessulfurização (Grossman et al., 1999; Ohshiro & Izumi, 1999; Stanislaus et al., 2010; Pawelec et al., 2011).

3.1.2.2 Biodiesel

O biodiesel está entre os principais combustíveis alternativos utilizados, sendo obtido a partir de fontes renováveis (óleos e gorduras vegetais e/ou animais), seguro de manusear, ambientalmente correto e miscível com o óleo diesel, podendo ser utilizado nos motores a diesel atuais, sem alterações (Tyagi et al., 2010). Para tanto, antes de ser misturado ao diesel, o biodiesel deve atender aos requisitos das normas de combustíveis como da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), da *International Organization for Standardization* (ISO) e do *Comité Européen de Normalisation* (CEN) (Resolução ANP 45/2014).

Do ponto de vista ambiental, a utilização do biodiesel promove a redução nas emissões de escape (hidrocarbonetos, monóxido de carbono, dióxido de enxofre, hidrocarbonetos poliaromáticos, e material particulado) podendo atingir entre 66 - 94 % de redução dos gases do efeito estufa (monóxido de carbono, metano e óxido nítrico) dependendo de como o co-produto (glicerol) é utilizado após a conversão (Dunn, 2011). Além disso, é biodegradável, apresenta alto ponto de fulgor e alta lubrificidade. Apesar de ser tecnicamente competitivo e adequado ao petrodiesel, restaurando a lubrificidade do ULSD, por exemplo, algumas propriedades como redução nas emissões de NO_x, melhorias nas propriedades de fluxo a frio e estabilidade oxidativa devem ser melhoradas (Knothe & Steidley, 2005; Knothe et al., 2006; Dunn, 2011).

Esse biocombustível é uma mistura de alquil ésteres de cadeia linear longa, obtida a partir da transesterificação dos triglicerídeos de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta gerando o glicerol como coproduto (Figura 2). O processo de

transesterificação se utiliza do metanol ou etanol na presença de um catalisador ácido ou básico (Lobo & Ferreira, 2009; Tyagi et al., 2010; Jakeria et al. 2014).

As propriedades do biocombustível podem variar conforme a composição dos ácidos graxos e lipídios presentes nas diferentes matérias primas, do qual ele é derivado.

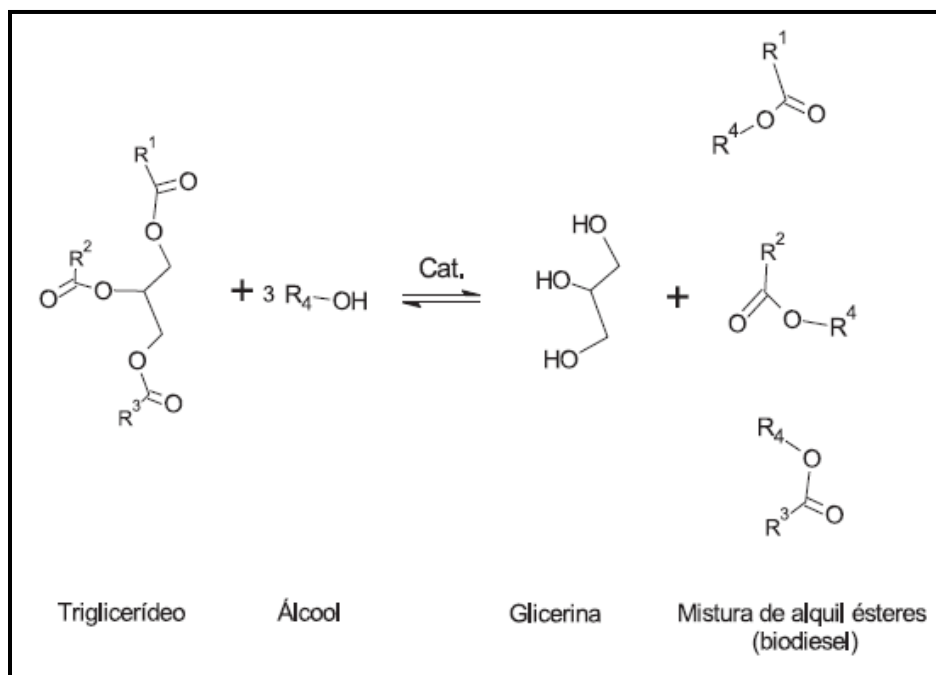


Figura 2. Reação geral de transesterificação de triglicerídeos (Fonte: Lobo & Ferreira, 2009).

Em óleos vegetais, podemos destacar cinco ácidos graxos mais comumente encontrados: palmítico 16:0 (Hexadecanoico), esteárico 18:0 (Octadecanoico), oleico 18:1 (Ácido *cis*-9-octadecenoico), linoleico 18:2 (Ácido *cis,cis*-9,12-octadecadienoico), e linolênico 18:3 (Ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico). Características como o comprimento da cadeia carbônica, natureza do grupo éster, localização, orientação, número de ligações duplas interferem no ponto de fusão dos ésteres metílicos. O ponto de fusão aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e influencia na insaturação a partir da relação estrutura-propriedade dos ácidos graxos metil éster (FAMES) monoinsaturados que são os componentes ideais do biodiesel. Estes constituintes proporcionam um equilíbrio satisfatório entre o fluxo a frio e estabilidade oxidativa, como também entre a viscosidade cinemática e número de cetano (Knothe & Dunn, 2001; Moser, 2014).

3.2 Redução dos teores de enxofre no Brasil e no mundo

As exigências para a produção de um combustível de qualidade requerem um índice de cetano elevado, a redução significativa de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e uma menor temperatura de destilação em virtude dos níveis de enxofre ultra-baixos. Indústrias automobilísticas sabem da importância na redução significativa de níveis de enxofre tanto no diesel como na gasolina que são essenciais para permitir que as futuras tecnologias de veículos possam se adequar às exigências dos rigorosos controles de emissões e consumo de combustível (Pawelec et al., 2011).

A redução dos níveis de enxofre nos combustíveis é uma tendência em países desenvolvidos desde o final do século 20. O diesel europeu e Alemão tem 10 ppm de enxofre desde 2003; outros países da União Europeia e o Japão introduziram o diesel com 10 ppm de enxofre em 2008, e Estados Unidos, com máximo de 15 ppm, desde 2006. Os teores de enxofre variam de país para país embora o limite de 50 ppm tenha sido adotado em várias partes do mundo (Stanislaus et al., 2010) (Figura 3).

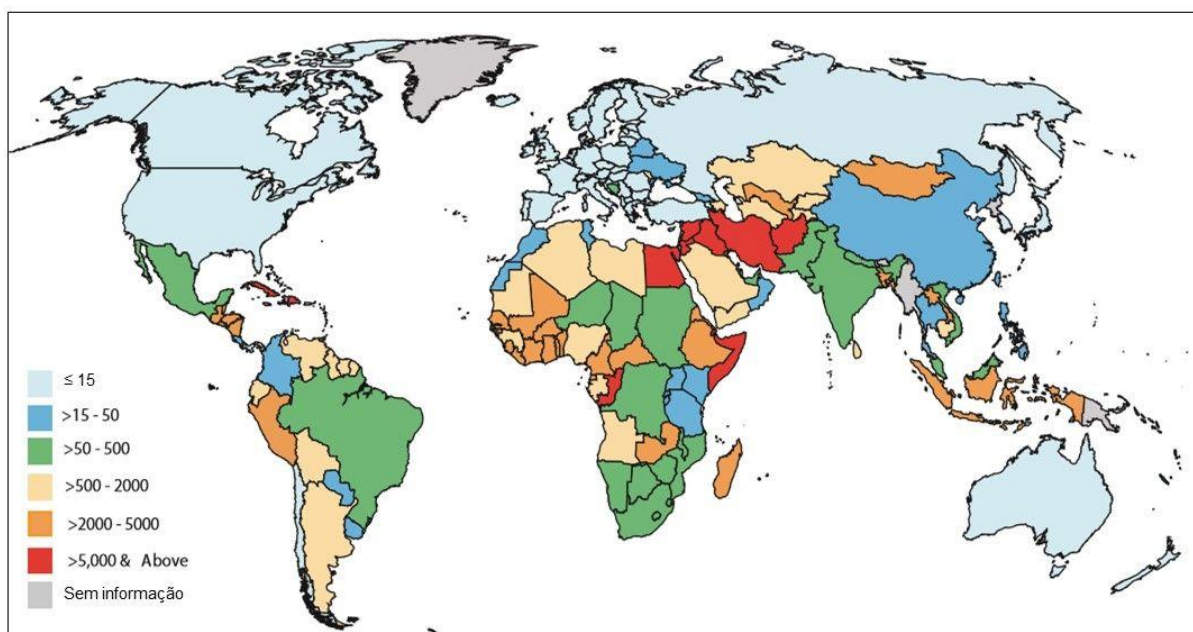


Figura 3. Teores máximos de enxofre (ppm) no combustível diesel em diferentes partes do mundo (Junho de 2016) (Fonte: <http://www.unep.org>).

Como mencionado anteriormente, a grande vantagem do ponto de vista ambiental é a redução de gases tóxicos e material particulado que deixam de ser liberados no ambiente. No entanto, algumas mudanças nas propriedades do diesel são esperadas como: redução da lubrificidade, da densidade, da condutividade elétrica

e de compostos anti-oxidantes que ajudam a prevenir a formação de gomas, bem como redução de compostos anti-corrosivos e do ponto de entupimento (Knothe & Steidley, 2005; Yemashova et al., 2007; Dunn, 2011). Aditivos para recuperar estas propriedades terão que ser adicionados. Nesse sentido, estas novas especificações representam um desafio operacional e econômico, pois baixo teor de enxofre significa maior custo de produção e distribuição para a indústria de petróleo (Stanislaus et al., 2010).

A evolução na redução dos teores de enxofre no combustível brasileiro pode ser visualizada na Tabela 1, de acordo com a Resolução ANP 65/2011. Atualmente somente o S10 e o S500 permanecem em circulação nacional (Resolução ANP 50/2013).

Tabela 1. Evolução dos teores de enxofre comercializados no Brasil.

Diesel A e B	Teores máximos de enxofre (ppm)	Nomenclatura	Especificações
S1800	1800	Diesel de interior	Substituição gradativa pelo S500 desde 2009. Eliminado da frota rodoviária em 2014. Somente para geração de energia elétrica, ferroviário e mineração.
S500	500	Diesel metropolitano	Substituição gradativa pelo S50 desde 2009. Atualmente permanece como o diesel com maior conteúdo de enxofre de uso rodoviário no país com adição de corante vermelho para diferenciação.
S50	50	Diesel S50	Mandatório em 2012 para antecipar a entrada do S10. Substituído pelo S10 em 2013 e não mais disponível na frota brasileira.
S10	10	Diesel ultra baixo teor de enxofre (ULSD)	Mandatório em 2013. Atualmente permanece como o diesel com menor conteúdo de enxofre de uso rodoviário no país.

Fonte: adaptado de www.anp.gov.br

Enfatizando que o óleo diesel, independentemente do seu teor de enxofre, tem estabilidade e teor de água potencialmente afetados após a mistura com biodiesel, valendo a recomendação de no máximo um mês para circulação do produto (Resolução ANP 45/2014). Porém, segundo a ANP não existe um "prazo de validade" para o óleo diesel, independentemente do teor de enxofre, visto que o atendimento às boas práticas de manuseio e armazenamento possibilita o prolongamento da vida útil desse produto.

Desde 1º de Janeiro de 2014, os óleos diesel A (sem biodiesel) S1800 e o óleo diesel B (com biodiesel) S1800 não podem ser comercializados como óleos diesel de uso rodoviário somente nos segmentos de geração de energia elétrica, ferroviário e de mineração. Em virtude disso, o óleo diesel S500 substituiu o S1800 (antigo óleo diesel de interior) e recebeu a adição de um corante vermelho, antes utilizado no S1800, para identificar esse combustível como o de maior teor de enxofre em circulação rodoviária.

A atual adição de 7 % de biodiesel ao diesel puro, tem sido vista como uma possibilidade em potencial de melhorar a lubrificidade. O diesel S10 foi a principal alteração em relação à redução do enxofre no combustível brasileiro (Resolução ANP 65/2011). Outra questão a ser considerada é a adição de um agente redutor veicular líquido denominado ARLA 32. Esse produto, a base de uréia, deve ser utilizado em veículos novos, pesados (tipo caminhões), produzidos desde 2013, com o objetivo de neutralizar as emissões de NO_x e de materiais particulados reduzindo a poluição atmosférica (Portaria INMETRO, 2013).

3.2.1 Efeito dos compostos sulfurados na suscetibilidade à contaminação microbiana

A presença dos compostos organosulfurados no ambiente tem recebido considerável atenção em função de sua prevalência no petróleo e combustíveis fósseis (Londry & Suflita, 1998). Conforme mencionado anteriormente, é imprescindível à redução dos níveis de enxofre nos combustíveis em nível mundial, no entanto, algumas questões sobre as consequências de tal redução ainda estão sendo estudadas. Passman (2012), sugere que o processo de hidrotreamento, utilizado na redução do conteúdo de enxofre no combustível, pode diminuir os compostos aromáticos favorecendo assim a sua biodegradabilidade. Além disso, esse autor observou um aumento de sólidos dissolvidos totais resultante da adição de aditivos (que servem como nutrientes para os microrganismos) para restaurar a

lubricidade, estabilidade oxidativa e evitar a ferrugem, sendo estas, propriedades perdidas, em virtude do hidrotreatamento. Chapman (2011), relatou problemas de corrosão no diesel com ultra baixo teor de enxofre - ULSD (em inglês - *ultra low sulfur diesel*). Dodos et al. (2011), concluíram, em seu estudo com ULSD (≤ 15 ppm de enxofre) e misturas de biodiesel, que a redução do conteúdo de enxofre parece favorecer a atividade microbiana, afetando a estabilidade oxidativa e a acidez dos combustíveis avaliados. Em relação às propriedades físico-químicas o processo de remoção do enxofre afeta não só a condutividade, como também a lubricidade, densidade e viscosidade do combustível (Knothe & Steidley, 2005; Yemashova et al., 2007).

Em outro trabalho, Srivastava e Nandan (2012), verificaram que o aumento nos teores de enxofre reduz o crescimento microbiano, mas por outro lado, promove a corrosão química de metais. A corrosão microbiana pode ser verificada com a redução dos níveis de enxofre, pois reduz a acidez do combustível e favorece o crescimento de microrganismos. Essa relação de variação dos teores de enxofre com a corrosão e o crescimento fúngico foi observado pelos autores. Para evitar a corrosão ácida o valor de 380 ppm de enxofre é indicado e para evitar a corrosão de origem microbiana, 400 ppm de enxofre deve ser empregado reduzindo assim custos de manutenção e capital com os tanques de armazenamento, perdas na qualidade do diesel, menos entupimentos nos filtros, menor custo de manutenção e perda de produtos em função da formação de borras biológicas.

Embora a redução dos teores de enxofre no combustível seja imprescindível, o impacto da dessulfurização e a perspectiva do uso de aditivos em relação ao metabolismo microbiano ainda não foram completamente elucidados (Lyles et al., 2013). Sabe-se que a remoção de compostos organosulfurados podem afetar a biodeterioração do diesel através de vários mecanismos, pois se apresentam em multiformas - tióis, tiofenos e derivados do sulfeto, que são compostos com ação antimicrobiana. Assim, a sua remoção poderia facilitar o crescimento de microrganismos degradadores de combustível. Além disso, no processo de hidrotreatamento, o hidrogênio reage com o diesel sob altas temperaturas e pressão, na presença de um catalisador, provocando a destruição de alguns hidrocarbonetos e produzindo compostos residuais de menor massa molecular, os quais podem ser substratos preferenciais na degradação por microrganismos (Lyles et al., 2013).

Lee et al. (2010) avaliaram a natureza e extensão da contaminação microbiana e o potencial de corrosão induzida por microrganismos (CIM) ou MIC (em inglês - *Microbiologically Influenced Corrosion*) em B100 e suas misturas (B5, B20), ULSD e diesel convencional sem redução de enxofre em diferentes cupons metálicos. Eles concluíram que todos os combustíveis foram favoráveis à formação de biofilmes, no entanto, o aço carbono apresentou corrosão ativa em contato com o ULSD e diesel convencional, e corrosão passiva em B100 e suas misturas. O aço inox apresentou corrosão passiva e o alumínio foi suscetível à corrosão em todos os combustíveis. Este estudo demonstra as diferenças de corrosão em relação aos distintos combustíveis avaliados, no entanto, sobre a suscetibilidade à contaminação microbiana, não há dados conclusivos. Neste sentido, Passman & Dobranic (2005) sugerem que o biodiesel a base de côco e o diesel com baixo teor de enxofre - LSD (em inglês - *Low sulfur diesel*) apresentam diferentes suscetibilidades a biodeterioração. Essa diferença ocorre em função do biodiesel apresentar alta quantidade de ácido láurico (n-dodecanóico) com propriedades antimicrobianas, embora seja naturalmente mais favorável à biodegradação (higroscopicidade e ligações ésteres de alta energia) apresentou menor suscetibilidade à atividade microbiana que o LSD.

Uma grande variedade de compostos organossulfurados já foram identificados em combustíveis fósseis, porém pouco se sabe sobre sua toxicidade em microrganismos (Londry & Suflita, 1998). Esses mesmos autores encontraram tiofenos, tióis, ácidos tiofênicos e sulfetos aromáticos em diesel como inibidores de uma série de processos metabólicos de microrganismos anaeróbios a partir de borra oleosa.

Microrganismos aeróbios e anaeróbios respondem de formas diferentes a degradação em função do seu metabolismo especializado. No caso de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que são um grupo diversificado de microrganismos anaeróbios, o alto conteúdo de enxofre (1800 ppm e 5000 ppm) parece ter estimulado a atividade microbiana em água de lastro de tanques de armazenamento de combustível com os distintos teores de enxofre. No entanto, os autores sugerem que são necessários mais estudos dessa natureza (Lutterbach et al., 2011).

Conforme o exposto acima os processos de dessulfurização alteram as propriedades do diesel e podem impactar a estabilidade química aumentando a contaminação microbiana em tanques de combustível (Passman & Dobranick, 2005;

Lee et al., 2010; Dodos et al., 2011; Dunn, 2011; Lyles et al., 2013). Contudo, mais estudos para verificar a suscetibilidade à contaminação microbiana em diesel com diferentes teores de enxofre são necessários para o entendimento desta vulnerabilidade.

3.3 Problemas na estocagem da mistura diesel/biodiesel

Com a introdução da mistura diesel e biodiesel surgiram novas condições durante o armazenamento desse combustível aos postos de abastecimento, devido às suas distintas peculiaridades. O biodiesel possui muitas características que o tornam atrativo como um substituto natural do diesel de petróleo (biodegradabilidade, não tóxico, não inflamável, reduz a emissão de hidrocarbonetos, monóxido de carbono, dióxido de enxofre, hidrocarbonetos poliaromáticos e material particulado) (Knothe & Steidley, 2005; Knothe et al., 2006; Dunn, 2011).

O biodiesel dependendo de sua origem (óleos e gorduras vegetais ou animais) apresenta características distintas em termos de composição química e que podem se traduzir em diferentes estabilidades, nucleando a geração de sedimentos de natureza química diversa (gomas, monoglicerídeos, esterol-glicosídeos, compostos inorgânicos, ácidos orgânicos e inorgânicos). Outros aspectos como a higroscopicidade e poder de solvência do biodiesel, também precisam ser considerados durante o armazenamento (Passman, 2012; Yang et al., 2014).

A biodegradabilidade do biodiesel deve-se a presença de moléculas (ésteres de ácidos graxos), que são facilmente reconhecidas pelos microrganismos, ou seja, geralmente, o biodiesel é mais degradado que o diesel (Pasqualino et al., 2006; Sørensen et al., 2011; Bücken et al., 2014). Segundo a literatura, sob a perspectiva ambiental, a biodegradabilidade no caso de um derramamento é uma vantagem, no entanto, representa um problema para quem armazena o combustível (Passman & Dobranick, 2005).

Os dados de pesquisa no Brasil, assim como os publicados na literatura internacional, mostram que a adição de biodiesel ao diesel promove um maior incremento de populações microbianas, especialmente quando existe a presença de água livre (Passman & Dobranick, 2005; Bento et al., 2006; Siegert, 2009; Dodos et al., 2011; Zimmer et al., 2013; Bücken et al., 2014; Cazarolli et al., 2014). As possibilidades de encontrarmos água na fase óleo aumentam, considerando as misturas diesel e biodiesel. Como consequência direta e visível, maior biomassa é formada especialmente na interface óleo-água e, dependendo da movimentação do

combustível armazenado, parte desta biomassa se desagrega e se mistura ao combustível como um todo. Além desse fato, o poder de solvência do biodiesel contido na mistura, também colabora com o desprendimento de material biológico aderido (biofilme), muitas vezes formado ao longo de anos, nas paredes dos tanques e tubulações, acarretando no aumento de sólidos suspensos no combustível. Uma constatação imediata deste evento é percebida por uma saturação prematura, seja de elementos filtrantes do sistema prensa ou nos próprios veículos, e em nível preocupante, o entupimento de bicos injetores (Passman, 2003; Alsopp et al., 2004; Yemashova et al., 2007; Bento et al., 2010; Passman, 2012).

3.3.1 Fatores que afetam a estabilidade dos combustíveis

3.3.1.1 Origem do combustível

A qualidade final do combustível inicialmente é dependente da natureza do petróleo processado (por exemplo, local de origem), processos durante o refino (hidrotratamento) e principalmente as condições de estocagem. Do ponto de vista químico, uma das consequências da redução de compostos sulfurados na corrente diesel, é a maior suscetibilidade à formação de gomas, uma vez que os antioxidantes naturais, (compostos com enxofre) foram retirados (Stanislaus et al., 2010). A adição do biodiesel à mistura leva novas características como a higroscopicidade, poder de solvência e tendência natural à oxidação gerando particulados de natureza orgânica e inorgânica (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2003; Passman, 2012; Yang et al., 2014).

3.3.1.2 Presença de água

O biodiesel é um meio altamente higroscópico e apresenta uma capacidade 30 vezes maior de absorção de água do que o diesel comum, o que altera sua tendência natural e, por conseguinte, pode aumentar seu potencial corrosivo durante o armazenamento. A presença de água livre pode desencadear uma série de processos de degradação como a corrosão de componentes automotivos e tanques de armazenamento, induz a formação de depósitos abióticos que podem causar problemas nos motores, desgaste nos sistemas de injeção e entupimento nos filtros e tubulações (Passman, 2003; Bento et al., 2006; Bento et al., 2010)

A água livre também é responsável pelo estabelecimento de um terceiro conjunto de processos associados às atividades metabólicas de microrganismos, promovendo a biocorrosão e a formação de sedimentos de origem biológica, com graves implicações para os mercados de distribuição e usuários finais. Do ponto de

vista biológico, a presença de água no sistema, assim como biodiesel, propicia condições ideais para o crescimento de populações microbianas. A entrada de água pode ocorrer de diferentes maneiras: carregada pelo combustível, pela condensação do ar nas paredes dos tanques, pelo metabolismo microbiano, entrada pelos respiros, durante a lavagem dos tanques ou ainda pode ser adicionada intencionalmente, como lastro. Nessa água, são carregados sais inorgânicos, que funcionam como suporte de micronutrientes. Apesar de esporos de fungos e bactérias permanecerem viáveis no combustível, eles apenas crescem e se reproduzem na presença de água (Gaylarde et al., 1999; Yemashova et al., 2007; Passman, 2012).

3.3.1.3 Comunidade microbiana

Microrganismos com competência metabólica para degradar óleo, podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes, no ar, na água e no solo. Da mesma forma, a localização dentro do tanque é um fator importante a se considerar. Microrganismos aeróbios ocupam preferencialmente a interface óleo/água e a fase aquosa, enquanto os anaeróbios ou aeróbios facultativos podem ser encontrados nas camadas de lodo do fundo dos tanques e no interior dos biofilmes aderidos às paredes. As bactérias são mais abundantes e diversas na fase aquosa, enquanto os fungos filamentosos ocupam a interface óleo/água e aderem às superfícies do tanque (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Yemashova et al., 2007; Passman, 2012).

3.4 Microrganismos deteriorantes de combustíveis

3.4.1 Diversidade microbiana deteriorogênica

Muitas espécies microbianas, responsáveis pela biodeterioração de petróleo e seus derivados, já foram identificadas utilizando tanto abordagens de microrganismos cultiváveis, quanto de não cultiváveis (Lee et al., 2010; Rajasekar et al., 2010; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Sørensen et al., 2011; White et al., 2011; Suflita et al., 2012; Aktas et al., 2013; Bückner et al., 2014). Contudo, torna-se importante não só o conhecimento das espécies, como também determinar a sua capacidade de crescer e se manter nestes sistemas. Neste sentido, Gaylarde et al. (1999), descrevem várias espécies de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos, provenientes de amostras de combustíveis como, por exemplo, os fungos *Pseudallescheria boydii*, *Paecilomyces variotii*, *Candida* sp., espécies bacterianas como *Bacillus* sp., bactérias redutoras de sulfato e microrganismos com distinta capacidade de crescimento em combustíveis (Gaylarde et al., 1999). Outros

autores vêm identificando cada vez mais espécies que se desenvolvem em diferentes tipos de combustíveis como derivados de petróleo (aviação, marinho e automotivo) (White et al., 2011), a partir de diesel (Bento & Gaylarde, 2001; Lyles et al. 2013) e diferentes misturas de biodiesel (Sørensen et al., 2011; Bücker et al., 2014), corroborando com os dados obtidos por Gaylarde et al. (1999) e adicionando novas informações nesta área em função do tipo de combustível.

Os microrganismos (fungos filamentosos e leveduriformes, bactérias aeróbias e anaeróbias, arqueas) que crescem nos combustíveis, se desenvolvem na interface óleo-água formando um sedimento biológico que pode comprometer a qualidade do combustível, assim como a indução de corrosão passiva e ativa em tanques de armazenamento e tubulações devido aos metabólitos ácidos derivados da degradação dos hidrocarbonetos (Gaylarde et al., 1999; Bento et al., 2005; Passman, 2012). Em especial, os fungos são os grandes responsáveis pelo comprometimento da superfície dos tanques, diretamente quando penetram nos revestimentos protetores, ou indiretamente como outros grupos microbianos, pela biomassa produzida entupindo bicos injetores, promovendo a redução da vida útil dos filtros, produção de sólidos suspensos no combustível, produção de surfactantes e metabólitos corrosivos, aumento do teor de água, formação de gomas e bloqueio de válvula e filtros (Gaylarde et al., 1999). Por exemplo, o fungo *Hormoconis resiniae* apresenta uma grande competência para crescer em combustíveis e já foi isolado de diferentes tipos (querosene de aviação, diesel, gasolina, parafina). Ele é capaz de metabolizar hidrocarbonetos de cadeia C₁₀-C₁₉ tais como *n*-alcanos, alcanos ramificados e cíclicos, como também anéis aromáticos. O crescimento micelial desse fungo permite o seu desenvolvimento na interface óleo-água formando uma camada de emulsão no combustível. Essa emulsão é resultante de compostos ativos secretados pelo fungo juntamente com uma película micelial que pode ser carregada no sistema de distribuição do combustível ocasionando uma série de problemas como já mencionado (Allsopp et al., 2004).

Em virtude dos problemas associados ao crescimento microbiano em combustíveis vários estudos vêm isolando e evidenciando o potencial deteriorogênico de fungos filamentosos e leveduriformes como, por exemplo, *Hormoconis resiniae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii* e *Candida silvicola* (Bento & Gaylarde, 2001), *Aspergillus fumigatus*, *Hormoconis resiniae* e *Candida silvicola* (Bento et al., 2005), *Penicillium* sp. *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp. (Rodríguez-

Rodríguez et al., 2010), *Pseudallescheria boydii* (Cazarolli et al., 2012, 2014) *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. (Bücker et al., 2011).

Algumas espécies de bactérias produzem um biopolímero mucilaginoso chamado de substância polimérica extracelular (SPE) que corresponde ao glicocálice. Após a entrada no sistema de armazenamento, esses microrganismos tendem a se estabelecer e se difundir no meio utilizando a SPE para garantir a sua adesão e formação do biofilme (Passman, 2003). As interações entre a SPE e os íons metálicos são conhecidas por alterar as condições de equilíbrio da superfície metálica em reações anódicas e catódicas que constituem o processo global de corrosão (Ford et al., 1995). Exemplificando, as reações anódicas (oxidação) ocorrem a partir da produção de metabólitos ácidos que aumentam a ação corrosiva de certos íons no meio, já as reações catódicas ocorrem a partir da redução de espécies químicas como íons hidrogênio do meio ou pela produção metabólica de reativo catódico, tal como o H₂S. Assim, importantes alterações no tipo e concentrações dos íons, pH e condições redox são induzidas pela presença de biofilmes, alterando o comportamento passivo do substrato metálico e produtos de corrosão, bem como os parâmetros eletroquímicos para avaliar as taxas de corrosão (Videla, 1995; Little & Lee, 2014). Na presença do biofilme, que abriga uma comunidade metabolicamente ativa, microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos que crescem no SPE criam um ambiente anóxico para que as BRS e outros anaeróbios possam se desenvolverem. Os metabólitos dos microrganismos degradadores de combustível servem de nutrientes para o consórcio do biofilme promovendo a famosa CIM (Passman, 2003).

Um dos principais grupos de microrganismos que desempenham um papel fundamental na CIM são as bactérias redutoras de sulfato - BRS (Passman, 2003). Essas bactérias podem ser facilmente encontradas no fundo dos tanques armazenadores, onde os níveis de oxigênio e potencial redox são mínimos, formando biofilmes, e utilizando os ácidos orgânicos produzidos por outros degradadores aeróbios. Elas reduzem a qualidade do combustível em função do sulfeto de hidrogênio produzido e prejudicando a eficiência dos catalisadores automotivos. No processo de conversão dos sulfatos a sulfeto de hidrogênio, esse subproduto serve de substrato para as bactérias oxidantes de enxofre que crescem na fase aquosa em condições de microaerofilia e ambientes ácidos (Passman, 2003; Yemashova et al., 2007).

Os microrganismos redutores de sulfato são um grupo bastante diversificado incluindo diferentes Filos dos Domínios Archaea e Bacteria. Dentre as bactérias, estão incluídas Gram positivas e Gram negativas, formadoras ou não de esporos e especializadas de acordo com o tipo de substrato a ser utilizado (Vandecasteele, 2008). Essas bactérias estão classificadas dentro de três grandes grupos: subclasse Proteobacteria (Gram negativas); Firmicutes Gram positivas (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*) e bactérias termofílicas (*Thermodesulfobacteria* e *Thermodesulfovibrio*) (Tang et al., 2009).

As bactérias redutoras de enxofre, outro grupo de anaeróbios obrigatórios, responsáveis pela produção de sulfeto tais como *Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Sulfurospirillum* and *Campylobacter* são capazes de reduzir enxofre a sulfeto, mas incapazes de reduzir sulfato a sulfeto de hidrogênio (Vandecasteele, 2008; Tang et al., 2009). Algumas redutoras de sulfato do Domínio Archaea podem reduzir ou oxidar formas de enxofre, mas a utilização do sulfato aparece restrito ao Domínio Bacteria (Allsopp et al., 2004). A presença da enzima dissimilatória sulfito redutase (dsrAB), a qual catalisa a redução do sulfito a sulfeto, na última etapa da respiração anaeróbica exclusiva de BRS (Lutterbach et al., 2011; Lutterbach & Galvão, 2014), torna esse grupo o único que reduz sulfato para sulfeto.

Outro grupo microbiano responsável pela CIM em sistemas de armazenamento de combustível são as ferrobactérias (Uchiyama et al., 2010). Estas bactérias fazem parte de um grupo morfológico e fisiológico heterogêneo com algumas espécies de difícil cultivo em laboratório (APHA, 1992). As bactérias quimiolitotróficas obtêm energia a partir da oxidação do íon ferroso a íon férrico e depositam o hidróxido férrico $\text{Fe}(\text{OH})_3$ em suas secreções mucilaginosas (Allsopp et al., 2004), que são responsáveis pelos processos de corrosão. Os gêneros *Leptothrix*, *Crenothrix* e *Sphaerotillus* apresentam um arranjo filamentosos de suas células envolto por uma bainha, já o gênero *Gallionella* apresenta células reniforme (formato de rim), incurvadas que segregam um filamento longo a partir do hidróxido férrico depositado na célula. As ferroredutoras são capazes de reduzir íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), sendo consideradas anaeróbios facultativo, como por exemplo, *Shewanella oneidensis* (Little & Lee, 2014). Algumas espécies de ferroredutoras podem precipitar óxido férrico (Fe_2O_3) durante o metabolismo heterotrófico (Khan et al., 2010). Segundo Sobolev & Roden (2001), na oxidação bacteriana do ferro (Fe^{3+}) ocorre o acoplamento das reações de oxidação e redução pela produção de óxidos amorfos ou óxidos

férricos (Fe^{3+}) cristalinos que estão prontamente disponíveis para bactérias que reduzem o ferro (Fe^{3+}), tais como *Thiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus* sp. e *Bacillus megaterium*.

3.4.2 Ciclo do enxofre na natureza

Os microrganismos desempenham um importante papel no ciclo global de vários elementos como nitrogênio, carbono, ferro e enxofre (Tang et al., 2009). No ciclo do enxofre, este ocorre em três estados de oxidação -2 (sulfeto e enxofre orgânico reduzido); 0 (enxofre elementar) e +6 (sulfato), sendo este último, o mais significativo na natureza. A forma reduzida de enxofre (S^{-2}), pode ser oxidado a enxofre ou sulfato por uma variedade de microrganismos, no entanto, o sulfato pode ser reduzido a sulfeto pelas BRS (Bouchez-Naitali & Vandecasteele, 2008; Tang et al., 2009).

No ciclo do enxofre, a redução do sulfato pode ocorrer através de duas vias: assimilatórias ou dissimilatórias. A via assimilatória gera compostos de enxofre reduzidos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas sem escretar o sulfeto diretamente. Na via dissimilatória, o sulfato, ou enxofre é utilizado como acceptor de elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido a sulfeto inorgânico e excretado obrigatoriamente pelas BRS. Ambas as vias iniciam com a ativação do ATP (adenosina trifosfato) ligadas a um sulfato resultando na formação APS (adenosina fosfosulfato) que é catalisada pela enzima ATP sulfurilase. Na redução dissimilatória, o sulfato da APS é reduzido diretamente a sulfito (SO_3^{2-}) pela enzima APS redutase. Na redução assimilatória um átomo de fósforo é adicionado a APS para formar fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS) que é reduzida a sulfito e convertido em sulfeto pela enzima sulfito redutase (Tang et al., 2009).

Embora a maioria das pesquisas sobre biocorrosão seja focada em BRS, alguns estudos sugerem que outros tipos de bactérias tais como bactérias oxidantes de ferro, oxidantes de magnésio, bactérias produtoras de ácidos, metanogênicas, entre outras também possam estar envolvidas nos processos de biocorrosão (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2003; Allsopp et al., 2004; Bento et al., 2005; Aktas et al., 2010; Lee et al., 2010; Rajasekar et al., 2010; Uchiyama et al., 2010; Aktas et al., 2013).

3.4.3 Metabolismo microbiano na degradação de combustíveis

Os microrganismos possuem o metabolismo altamente especializado para utilizar o petróleo e seus derivados como fonte de carbono e energia (Van Hamme et

al., 2003; Yemashova et al., 2007). No entanto, além da composição molecular, alguns fatores como a biodisponibilidade aos microrganismos, suscetibilidade ao ataque microbiano, somados aos fatores abióticos (aeração, temperatura, umidade, pH) também influenciam o potencial da biodegradação (Seabra, 2008; Barbosa et al., 2008; Das & Chandran, 2011).

De forma geral, as cadeias de hidrocarbonetos mais prontamente utilizadas são os C₁₀ a C₁₈ e apresentam um padrão conforme a facilidade de degradação (*n*-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos), no entanto, alguns compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, de elevado peso molecular (HPAs), não podem ser integralmente degradados (Das & Chandran, 2011).

A mineralização de misturas complexas de hidrocarbonetos geralmente requer a co-existência e cooperação de vários microrganismos especializados em substratos específicos (Zanaroli et al., 2010). Também existem alguns microrganismos que não são capazes de metabolizar hidrocarbonetos sobrevivendo a partir do catabolismo, ou seja, dos metabólitos produzidos por outras espécies, nutrientes oriundos de aditivos do combustível ou da poeira que entra no sistema (Passman, 2012; Srivastava & Nandan, 2012).

Os microrganismos aeróbios e anaeróbios possuem diferentes rotas metabólicas e sistemas enzimáticos de degradação dos hidrocarbonetos (Yemashova et al., 2007). No entanto, a degradação mais rápida e completa de grande parte dos poluentes orgânicos ocorre em condições aeróbias (Das & Chandran, 2011).

3.4.3.1 Biodegradação de alifáticos

Os microrganismos aeróbios utilizam os hidrocarbonetos alifáticos incorporando moléculas de oxigênio diretamente na molécula substrato. Dessa forma existem três caminhos que levam a oxidação dos hidrocarbonetos: oxidação terminal, diterminal e subterminal (Solano-Serena et al., 2008).

De forma geral, a degradação aeróbia dos alifáticos (grupo estrutural de maior quantidade no diesel) inicia com a oxidação de um grupo metil terminal para um álcool primário, embora a oxidação subterminal tenha sido observada. Os álcoois primários são oxidados a aldeídos e, pela ação da enzima desidrogenase NAD dependente, são oxidados a ácidos graxos. Os ácidos graxos são degradados via β -oxidação ou são utilizados pelas células para construção de biomoléculas (Yemashova et al., 2007). Na oxidação terminal e diterminal os alcanos são oxidados

a ácidos carboxílicos e posteriormente metabolizados via β -oxidação ou incorporados dentro de lipídios celulares ou ainda participam da oxidação de uma cadeia alifática final (ω -oxidação). Em último caso, eles formam ácidos dicarboxílicos que são degradados na β -oxidação (Figura 4).

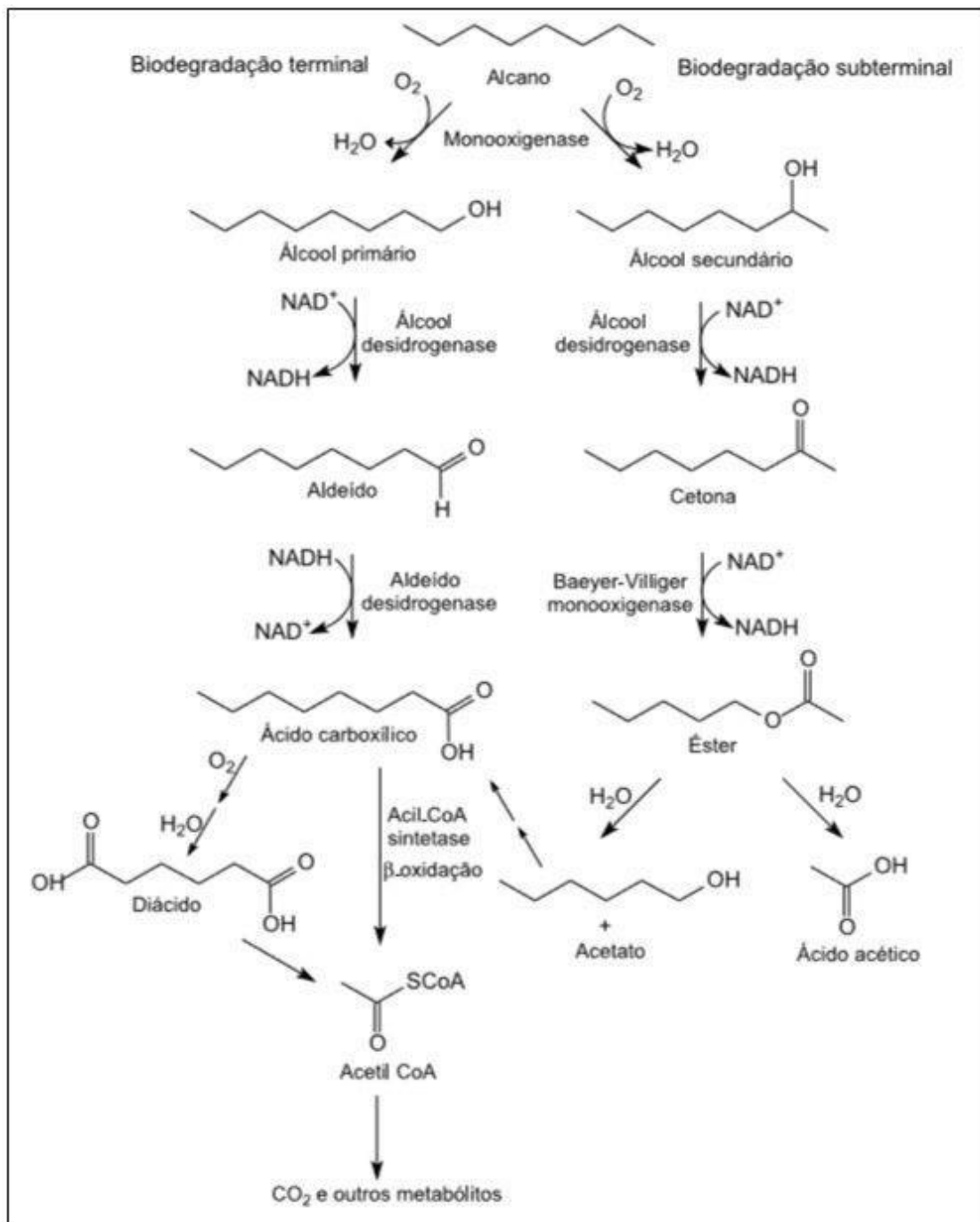


Figura 4. Esquema geral do metabolismo aeróbio de degradação de *n*-alcanos (Fonte: Cruz & Marsairole, 2012).

Na oxidação subterminal não ocorre a etapa inicial de conversão do hidrocarboneto em ácido graxo, mas ao invés do alcano hidroxilado, como um carbono

secundário, o álcool produzido torna-se dehidrogenado em cetona (álcool secundário). Na oxidação subterminal a ruptura da cadeia é feita a partir do éster derivado da 2-cetona sendo clivado em acetato e álcool ou em outras cetonas numa longa cadeia ácida e um álcool (Solano-Serena et al., 2008). As rotas esquemáticas estão apresentadas na Figura 4.

A biodegradação anaeróbia de alifáticos e também de aromáticos ocorre através de dois mecanismos de ativação (Figura 5).

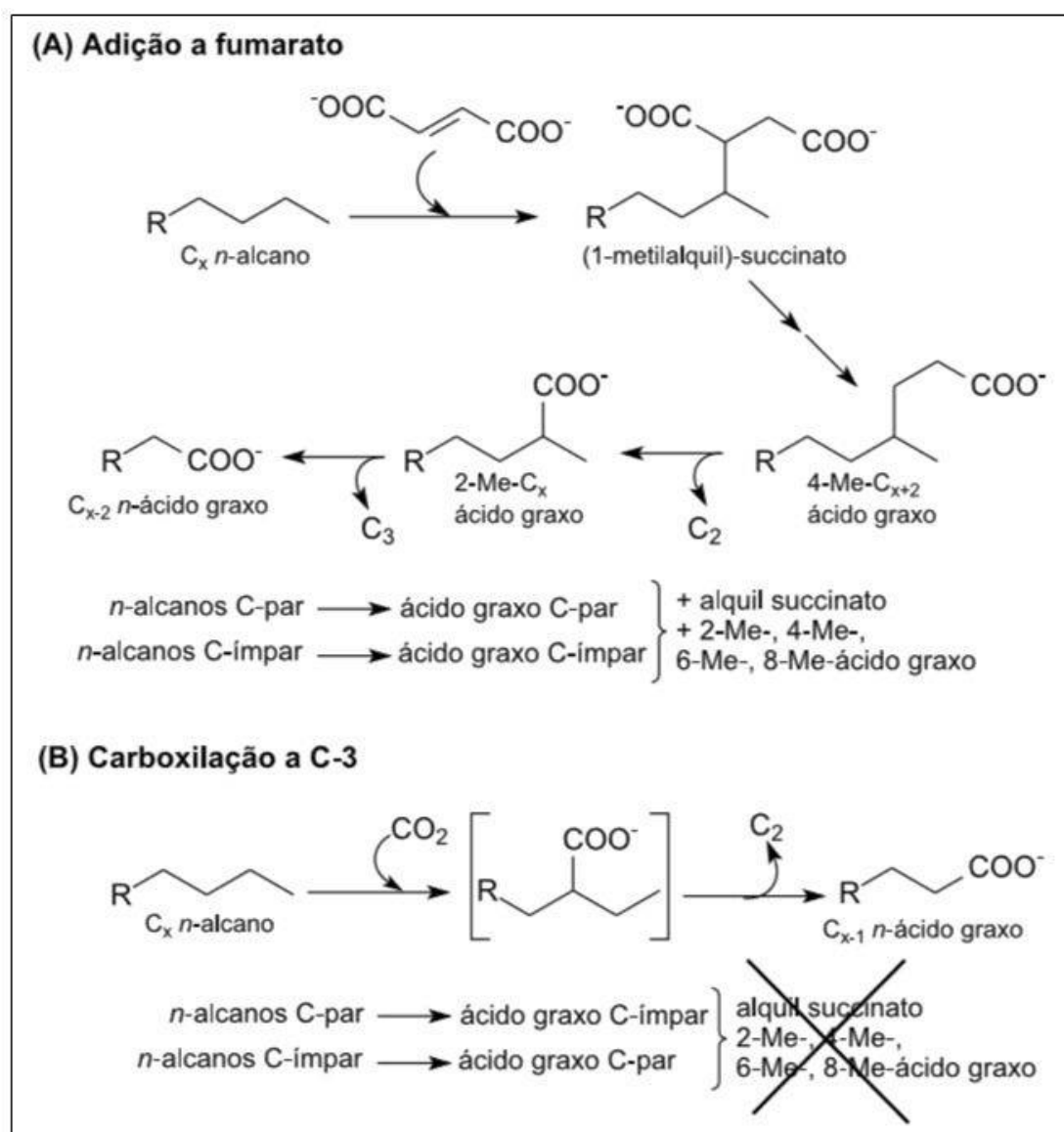


Figura 5. Esquema geral do metabolismo anaeróbio de degradação de hidrocarbonetos. (A): Ativação via fumarato; (B): Ativação via carboxilação em C-3 (Fonte: Cruz & Marsairole, 2012).

O primeiro inclui a adição do carbono subterminal do hidrocarboneto à dupla ligação do grupo carboxílico fumarato gerando ácidos graxos lineares,

ramificados e succinatos substituídos. Dependendo do número de carbonos do *n*-alcanos (pares ou ímpares) o produto da biodegradação será ácido graxos lineares de acordo com o número de carbonos da molécula substrato de origem (Figura 5A). O segundo mecanismo, envolve a carboxilação do hidrocarboneto na posição C-3 com formação de apenas ácidos graxos lineares, porém, nesse caso, os *n*-alcanos pares geram os ácidos graxos ímpares e vice-versa como mostra a Figura 5B (Yemashova et al., 2007; Cruz & Marsaiole, 2012).

3.4.3.2 Biodegradação de compostos aromáticos

A biodegradação aeróbia de HPAs já foi identificada em diferentes microrganismos, sendo iniciada pela ação de oxigenases, monoxigenases (Figura 6) ou dioxigenases.

Em bactérias este processo é realizado inicialmente pela ação da enzima intracelular periférica dioxigenase que reconhece o HPA e adiciona dois átomos de oxigênio, os quais desestabilizam a molécula que contém o anel aromático. A oxidação é realizada várias vezes até que o último anel aromático seja transformado em um dos intermediários centrais (catecol, protocatecol ou gentisato). Após, são adicionadas enzimas de fissão como o intradiol para abrir o anel aromático por via *orto* originando o *cis*-muconato que será convertido em succinato e acetil-coenzima. As enzimas de fissão extradiol abrem o anel por via *meta* originando o semialdeído 2-hidroxi-mucônico até a conversão em ácido pirúvico e acetaldeído (Figura 6) (Bamforth & Singleton, 2005 *apud* Jacques et al., 2010; Cruz & Marsaiole, 2012).

No entanto, o conhecimento sobre as rotas de biodegradação anaeróbia de HPA são limitadas. Genericamente, sob condições anóxicas, os compostos orgânicos são sucessivamente oxidados, atuando como substratos para as etapas seguintes, até a completa degradação e liberação do biogás (Cruz & Marsaiole, 2012).

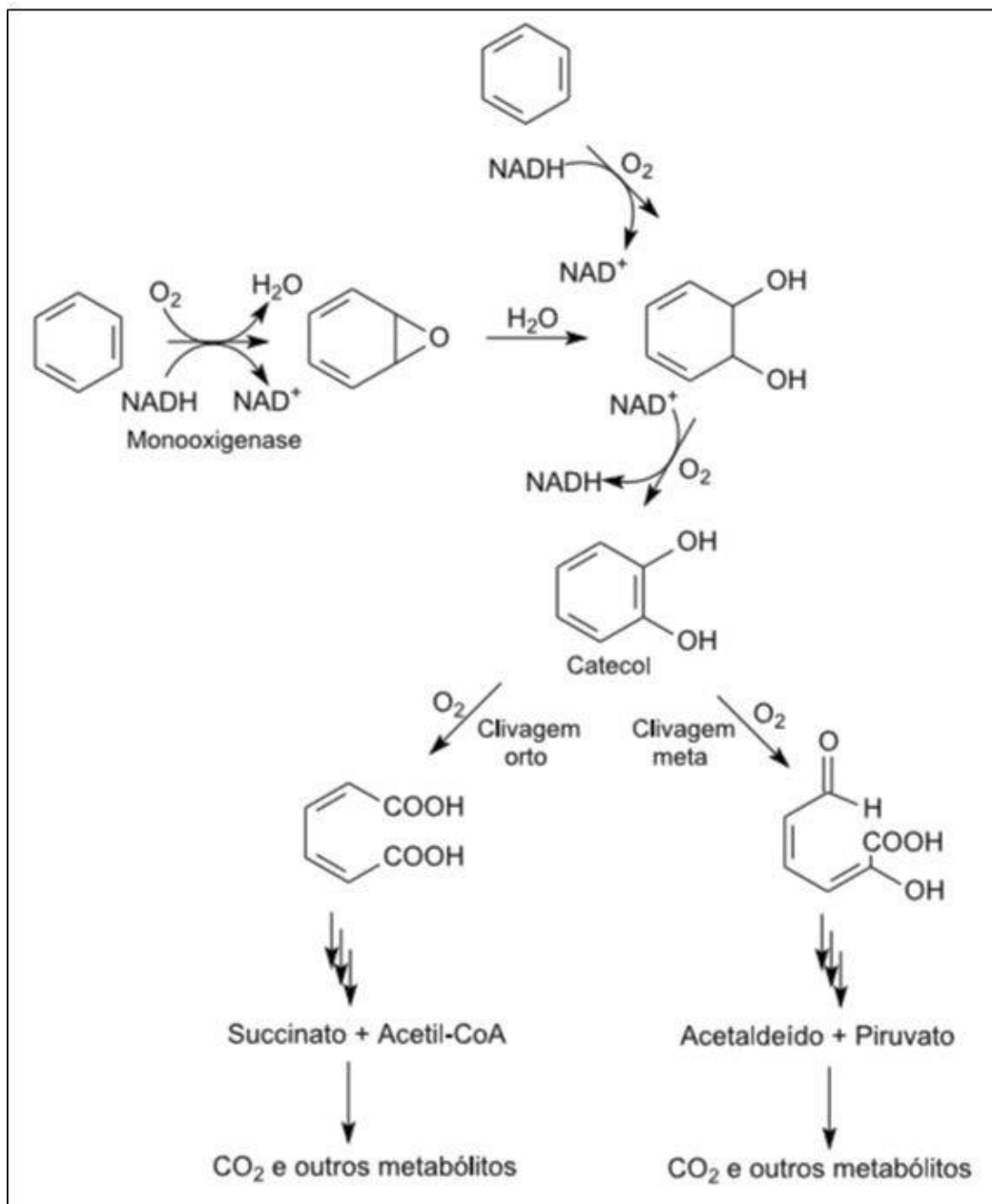


Figura 6. Esquema geral do metabolismo aeróbio de degradação de compostos aromáticos (Fonte: Cruz & Marsairole, 2012).

3.4.3.3 Enzimas de degradação de hidrocarbonetos

As enzimas oxigenases e hidroxilases desempenham um papel importante nas rotas do catabolismo de hidrocarbonetos em condições aeróbicas, pois catalizam a inserção de átomo(s) de oxigênio(s) ao substrato orgânico utilizando oxigênio molecular como doador. Assim, as monooxigenases utilizam apenas um átomo de oxigênio ao substrato orgânico e catalisam principalmente a oxidação das cadeias mais lábeis de hidrocarbonetos (alcanos). O oxigênio molecular, utilizado como doador, é ativado por meio da geração de um intermediário peroxi que realiza a reação

de monoxigenação. De forma geral, as monoxigenases utilizam um co-fator (íons heme, flavina, pterina ou metal) para facilitar a ativação do oxigênio molecular ou ainda podem se ligar somente a um substrato. A partir da formação do intermediário peroxi, as enzimas são capazes de catalisar uma grande variedade de oxidações (Pazmino et al., 2010). Já as enzimas dioxigenases catalizam a inserção de dois átomos de oxigênio ao substrato orgânico utilizando oxigênio molecular como doador, responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Solano-Serena et al., 2008). Assim essas enzimas de fissão servem para abrir o anel aromático via *orto* (intradiol dioxigenases) e *meta* (extradiol dioxigenase) conforme mencionado anteriormente (Vandecasteele & Monot, 2008).

O citocromo P450 é uma heme monoxigenase encontrado em todos os microrganismos aeróbios (bactérias, fungos, leveduras) e outros organismos (plantas e mamíferos) (Solano-Serena et al., 2008) e está envolvido em uma série de reações de oxidação (hidroxilações, epoxidações, heteroátomo-dealquilação, de halogenação, desidrogenação e oxidação de heteroátomos) (Pazmino et al., 2010) e principalmente envolvido na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Especialmente os fungos utilizam hidrocarbonetos alifáticos como fonte de carbono e energia mediados pelo complexo microsomal do Citocromo P450 (Das & Chandran, 2011).

3.4.3.4 Biodegradação do biodiesel

Enquanto o diesel é quimicamente mais complexo que o biodiesel, por possuir uma mistura de alcanos, olefinas, compostos aromáticos e policíclicos o biodiesel é mais homogêneo por conter somente ésteres metílicos de diferentes ácidos graxos. Assim, as diferenças na composição dos combustíveis também influenciam na sua biodegradabilidade (Mariano et al., 2008; Restrepo-Florez et al., 2013).

A biodegradação do biodiesel inicia com a clivagem do metil ou etil éster, pelas enzimas esterases ou lipases, produzindo um ácido graxo e um álcool associado (Figura 7). O ácido graxo é metabolizado no ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) e, após oxidado (via β -oxidação) a ácido acético e um ácido graxo sem a presença de dois carbonos (Vieira et al., 2006; Zhang et al., 1998). Posteriormente o ácido graxo é convertido a éster coenzima A (CoA), sendo oxidado na posição beta para a produção do acetil-CoA, a partir da clivagem de dois átomos de carbono presentes no final da molécula. Esse processo é realizado sucessivamente até a degradação completa do ácido graxo inicial a acetil-CoA (Chapelle, 2001).

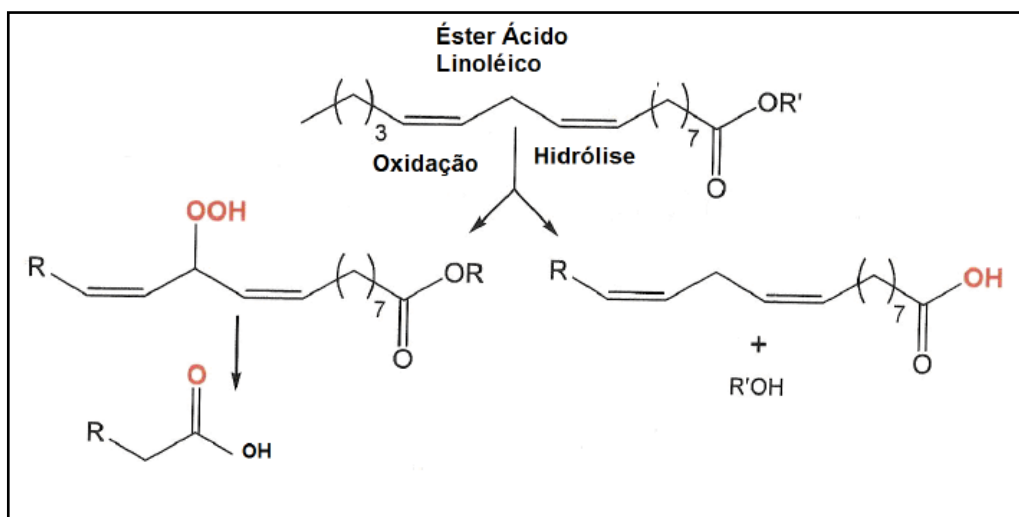


Figura 7. Esquema geral do metabolismo de degradação do biodiesel (hidrólise do éster ácido linoléico) (Fonte: Cooper, 2000 *apud* Bücker, 2009).

Alguns estudos demonstram que a adição de biodiesel ou de suas misturas com diesel pode acelerar o processo de biodegradação por ser mais facilmente biodegradado e menos tóxico que o óleo diesel (Zhang et al., 1998; Pasqualino et al., 2006; Bücker et al., 2011; Cyplik et al., 2011; Yassine et al., 2013). Além disso, alguns desses trabalhos também mostraram que o biodiesel pode promover e acelerar a biodegradação do diesel por co-metabolismo. A biodegradação mais acentuada de combustíveis contendo biodiesel pode ser atribuída à presença de ácidos graxos, que são considerados uma fonte de carbono mais acessível para os microrganismos se comparada aos hidrocarbonetos de petróleo (Sørensen et al., 2011). Por outro lado, alguns autores mencionam que, dependendo da concentração das misturas de biodiesel no diesel, a decomposição de *n*-alcanos e aromáticos é aproximadamente a mesma que a dos ésteres metílicos de ácidos graxos (De Mello et al., 2007; Lisiecki et al., 2014).

3.5 Técnicas de identificação de microrganismos degradadores de combustível

Genericamente, as comunidades microbianas podem ser estudadas utilizando três estratégias diferentes: cultivo tradicional de microrganismos em meios seletivos, análises do perfil fisiológico ou ainda análises de dados a partir dos genes 16S/18S rRNA (Restrepo-Florez et al., 2013). Baseado em diferentes técnicas de identificação, centenas de espécies de bactérias, fungos e leveduras, capazes de degradar hidrocarbonetos e ésteres de ácidos graxos, além de outras espécies que

utilizam os metabólitos de outros microrganismos já foram isoladas de amostras de combustíveis (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 1996, 2001; Bento et al., 2005; Lee et al., 2010; Rajasekar et al., 2010; Sørensen et al., 2011; White et al., 2011; Suflita et al., 2012; Aktas et al., 2013; Bucker et al., 2014). Sendo assim, algumas das principais técnicas dependentes e independentes de cultivo para identificação da microbiota ambiental, com ênfase nos deteriorogênicos de combustíveis, serão abordadas a seguir.

3.5.1 Métodos dependentes de cultivo

Grande parte das contaminações microbianas em óleo bruto e derivados é proveniente do contato com a água livre e/ou dissolvida, encontrada principalmente, durante a estocagem. Os estudos de investigação da contaminação microbiana em tanques armazenadores podem ser conduzidos pela prospecção na fase óleo, fase água ou da interface óleo/água conforme preconizado na Norma da ASTM 6469-99 - Guia para Contaminação Microbiana em Combustíveis e Sistemas de combustível (Passman, 2003).

Dentre os métodos clássicos de prospecção e cultivo podemos citar o crescimento em meio sólido, avaliação das células viáveis pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), diluições seriadas em meio líquido seletivo pela técnica do Número Mais Provável (NMP), técnica da membrana filtrante (porosidade de 0,22 µm) com quantificação pelo microscópio, determinação do peso seco, métodos colorimétricos e turbidimétricos, entre outros métodos (Hill, 2003; Yemashova et al., 2007). Esses métodos (isolamento e cultivo laboratorial) são recomendados pela Norma da ASTM 6469-99 como mencionada anteriormente e pelo Instituto de Petróleo (IP) diretrizes para a investigação de contaminação microbiana no combustível com ponto de ebulição abaixo de 390 °C e água associada (Hill, 2003).

Tais abordagens têm oferecido informações valiosas sobre a fisiologia dos microrganismos e suas interações com hidrocarbonetos no ambiente (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001). Porém, o estudo de um determinado microrganismo em cultura pura pode subestimar o número de espécies presentes nas amostras prejudicando a identificação de grupos microbianos e não revelando, necessariamente, o seu papel na comunidade e contribuição para o ecossistema (Van Hamme et al., 2003; White et al., 2011). Da mesma forma, a identificação fenotípica apresenta limitações devido à dificuldade de distinguir caracteres específicos em muitas espécies impedindo uma adequada classificação taxonômica e a criação de

um banco de dados de microrganismos associados à contaminação dos combustíveis (White et al., 2011). Alguns métodos indiretos, como por exemplo, a turbidimetria, são difíceis de ser aplicados em função do sistema óleo/água prejudicando a sua leitura (Yemashova et al., 2007).

3.5.1.1 Métodos diretos

Entre os métodos dependentes de cultivo muito utilizados na estimativa de microrganismos deteriorantes de combustíveis podemos destacar métodos diretos como a contagem de microrganismos viáveis em placas com meios de cultura (UFC) e em laminocultivos (*dip-slides*). Como métodos indiretos, a técnica do Número Mais Provável (NMP) e do ATP.

O método de contagem em placas é utilizado para detecção e enumeração de microrganismos viáveis deteriorantes de combustíveis. Pode ser realizado em placas de Petri contendo meio de cultivo que recria as condições ótimas do microrganismo para o crescimento em laboratório. Os microrganismos são inoculados (diretamente ou diluídos serialmente), na superfície ou profundidade do meio e após a correta incubação, as colônias são contabilizadas como unidades formadoras de colônias (UFC) nas suas respectivas diluições (Allsopp et al., 2004). Como mencionado anteriormente, este método (dependente de cultivo) apresenta algumas limitações em função de subestimar a população microbiana ou ainda limitar o crescimento ao meio de cultivo ou condições laboratoriais impostas. De qualquer forma, alguns trabalhos utilizam este método como comparativo ou complementar a outras técnicas de quantificação. Passman e Dobranic (2005) comparam o método de cultivo tradicional com semeadura em superfície para bactérias (ágar triptona de soja - TSA) e fungos (ágar malte dextrose - MDA) e o método do ATP, em amostras de fase aquosa e oleosa de biodiesel de coco com diferentes teores de enxofre. Tais autores atribuíram uma maior sensibilidade ao teste do ATP indicando a incapacidade de alguns microrganismos em crescer no meio de cultivo utilizado. Rajasekar et al. (2010), utilizaram meios de cultivo seletivo para isolar bactérias aeróbias (bactérias heterotróficas, ferroxidantes, produtoras de ácidos e oxidantes de manganês) e bactéria anaeróbias (BRS), além de enumeração por NMP, aliado aos métodos bioquímicos e moleculares para complementar a identificação de microrganismos obtidos a partir de produtos de corrosão. Bucker et al. (2011), utilizaram a técnica de UFC como teste preliminar para acompanhar a curva de crescimento da levedura *Candida silvicola* na fase aquosa dos combustíveis avaliados.

Um método alternativo à contagem de microrganismos em placas foi publicado por Hill et al., (1997) e Hill (1998). Este método se propõe a analisar amostras tanto da fase aquosa quanto da fase oleosa, que até então eram quantificadas pela filtração em membrana e disposição em placas contendo meio ágar nutritivo, conforme a norma IP385/95 ou ainda pelo procedimento de emulsificação, conforme AFNOR M07070/92. A metodologia descrita foi uma proposta para ser utilizada diretamente no local da contaminação em resposta a necessidade de ser desenvolver um teste rápido, quantitativo e sensível de detecção de microrganismos presentes em combustíveis. O teste é composto por uma solução nutritiva com a adição de agente solidificante sobre uma superfície plástica, nos dois lados e colocada dentro de um recipiente plástico, conhecida como laminocultivo ou *dip slides*. Durante a incubação a presença do indicador redox evidencia o crescimento das colônias comparáveis aos métodos recomendados nas normas IP385/95 e AFNOR M07070/92 (Hill et al., 1997; Hill, 1998). Variações desse kit surgiam no mercado como um método de enumeração e detecção rápido de microrganismos economicamente importantes na biodeterioração de combustíveis a partir de meios de cultivo seletivos. Apesar da praticidade mencionada apresentam uma baixa sensibilidade (Allsopp et al., 2004). Nesse sentido, Dodos et al. (2011) utilizou dois métodos (*dip-slides* e ATP bioluminescente) para quantificação da contaminação microbiana em misturas de diesel B5, B10 e B20 com diferentes teores de enxofre (ULSD e LSD) e observaram maior sensibilidade no método do ATP comparado ao *dip-slides*.

3.5.1.2 Métodos indiretos

O CLPP (*Community Level Physiological Profiles*) é uma técnica que utiliza uma micro-placa contendo diferentes fontes de carbono onde a comunidade microbiana é inoculada diretamente na placa e as diferenças entre elas são determinadas com base nos padrões de utilização de fontes diferentes de carbono. Embora dependa do crescimento microbiano em meio de cultivo essa técnica fornece um bom resultado nas mudanças dos perfis das populações microbianas como resultados das perturbações ecológicas, porém não indica qual microrganismo está presente na população (Restrepo-Florez et al., 2013). Uma variação desse teste, porém com propósito semelhante, foi proposta por Braddock e Catterall (1999). Tal técnica consiste em utilizar o método estatístico do NMP para estimar populações de microrganismos degradadores e heterotróficos de gasolina e diesel. O ensaio é fácil, acessível economicamente e fornece um indicativo de potenciais microrganismos

para degradação de áreas impactadas com petróleo ou derivados. Lutterbach et al. (2011) utilizaram o NMP para estimar a população de BRS presentes na fase aquosa em contato com diesel contendo S50, S500 e S1800 ppm de enxofre e Colla et al. (2014) utilizaram esta técnica para estimar microrganismos degradadores e heterotróficos, presentes em amostras de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Tais trabalhos exemplificam os diferentes perfis fisiológicos que podem ser estimados pela técnica.

Um método que pode ser utilizado para detectar a contaminação microbiana na fase aquosa de combustíveis armazenados é o método do ATP (ASTM D 4012-81/2002). Esse sistema detecta o ATP (Adenosina Tri-Fosfato) de todas as células vivas numa dada amostra através de uma reação bioquímica que emite luz (liciferase) e medida por unidade relativa de luz (RLU). O conhecimento da concentração de ATP pode ser relacionado com a biomassa viável ou atividade metabólica, ou através da utilização de uma média da concentração (ou quantidade) de ATP por célula, ou ainda, uma contagem estimada de microrganismos no caso de culturas axênicas (Dodos et al., 2011). Muitos autores vêm utilizando esta técnica em conjunto de outras para enumerar microrganismos deteriorantes de combustíveis (Passman & Dobranic, 2005; Passman, 2009; Passman et al. 2009; Dodos et al., 2011). No entanto para utilizar este teste deve ser realizado um pré-tratamento da amostra na fase óleo utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio para libertar o ATP intracelular e evitar perdas ou subextração do ATP. Tal método apresenta alta sensibilidade e rapidez, porém como desvantagem é sensível a inibidores de luciferase e síntese de enzimas da amostra teste que possa hidrolisar o ATP (Yemashova et al., 2007).

3.5.2 Métodos independentes de cultivo

Sabemos que somente cerca de 1 % dos microrganismos são cultivados em condições laboratoriais. Em função disso, muitas informações não são acessadas pelas limitações dessa abordagem. Quando utilizamos métodos independentes de cultivo uma imensa quantidade de informações contida dentro do genoma de organismos não cultiváveis fica disponível e a abordagem de metagenômica é um dos avanços tecnológicos para acessar e investigar este potencial (Steele & Streit, 2006).

O termo metagenoma foi definido inicialmente por Handelsman et al. (1998) como o conteúdo genômico total de determinada microbiota num dado ambiente, diferentemente da genômica que se aplica a análise do genoma completo só que no

sequenciamento de organismos individuais. A metagenômica inclui análise de um componente genético inteiro de um habitat, permitindo a investigação de uma grande diversidade de genes individuais e seus produtos, assim como análises de um operon inteiro codificando rotas biosintéticas ou degradativas incluindo tanto os microrganismos facilmente cultiváveis quanto os não cultiváveis (Handelsman et al., 1998; Steele & Streit, 2006; Xu, 2006).

Estudos de metatranscriptômica (expressão gênica a partir de mRNA) estão sendo desenvolvidos em paralelo com métodos de sequenciamento de alto rendimento e micro-arranjos. Adicionalmente, outras “ômicas” como proteômica (estudo das proteínas) e metabolômica (estudo dos metabólitos celulares) também são ferramentas valiosas para descrever as interações entre organismos (Figura 8), porém apresentam algumas restrições nas técnicas (Hirsch et al., 2010).

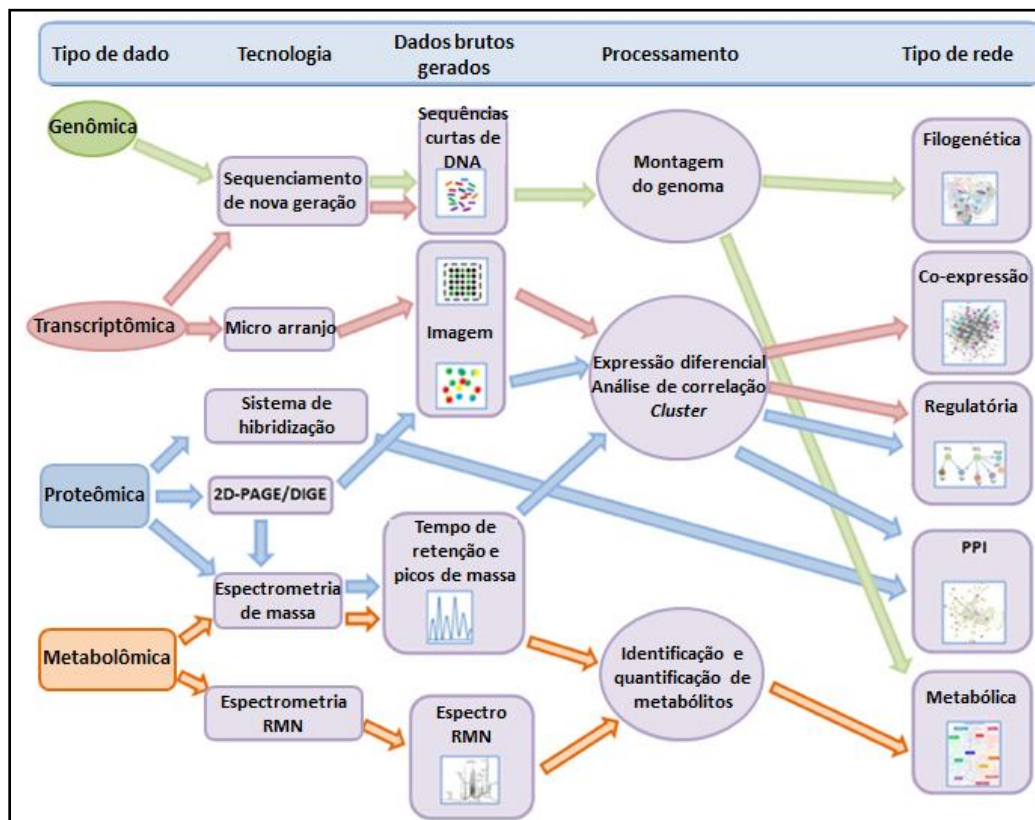


Figura 8. Desenho esquemático representando a integração das meta-ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) gerando diferentes redes de informações. 2D- PAGE: gel bidimensional; DIGE: eletroforese em gel diferencial; NMR: ressonância magnética nuclear; PPI: interação proteína-proteína (Fonte: Hernández-Prieto et al., 2014).

Por exemplo, o mRNA possui meia vida de segundos a minutos, além de estar presente, em quantidades reduzidas (100-300 mRNA por célula). Por outro lado,

as proteínas apresentam maior estabilidade (várias horas ou dias) refletindo diretamente a atividade catabólica das células, além de ter um elevado número de moléculas por célula (10^6) (Moran et al., 2012). De qualquer forma, as “ômicas” são ferramentas complementares da atividade *in situ* das comunidades microbianas atuando em diferentes macromoléculas (Figura 8).

Nesse sentido, podemos destacar o trabalho de Urich et al., (2013), os quais estudaram a estrutura e o funcionamento de comunidades microbianas presentes em sedimentos de duas fontes hidrotermais distintas, empregando a metagênica integrada (metatranscriptômica, metaproteômica e metagenômica). Reações independentes da PCR para os três Domínios (*Bacteria*, *Eucaria* e *Archaea*) mostraram um perfil de comunidades semelhantes nos dois tipos de sedimentos representados por *Epsilonproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, além de ciliados, nematoides e arqueas. Eles identificaram rotas metabólicas ativas, através de peptídeos transcritos, com genes para oxidação de enxofre e metano, um aumento na expressão das rotas de fixação de carbono, como também genes envolvidos na cadeia respiratória de aeróbios e anaeróbios (nitrito e sulfato). A elevada expressão de genes de quimiotaxia e flagelos refletiu o estilo de vida num habitat dinâmico rico em gradientes físico-químicos. Urich et al., (2013), mencionaram as principais vias metabólicas que poderiam ser atribuídas a grupos taxonômicos distintos, levantando hipóteses sobre a função dos diferentes táxons de Procariotos e Eucariotos, auxiliando, assim, na compreensão do funcionamento das comunidades microbianas presentes nestes ecossistemas.

Em outro trabalho, Masson e colaboradores (2012), investigaram a comunidade microbiana degradadora de hidrocarbonetos após derramamento de óleo no Golfo do México. Eles utilizaram *Oceanospirillales* e outros membros ativos da comunidade indígena para investigações metagenômica, metatranscriptômica e célula única (*single cell*). Metagenômica e metatranscriptômica por *shotgun* revelaram que os genes para motilidade, quimiotaxia e degradação de alifáticos estavam presentes nas amostras contaminadas com a pluma. Porém, embora identificados genes para compostos recalcitrantes, como por exemplo, HPAs, eles foram expressos em baixos níveis na transcriptômica. Na tecnologia de célula única, usando *Oceanospirillales*, eles elucidaram e complementaram os dados obtidos com metagenoma e metatranscriptoma. Dessa forma, a utilização de mais de um tipo de tecnologia torna-se fundamental para resultados mais confiáveis.

Os ácidos ribonucleicos (RNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade, pois seus genes (rDNA) estão distribuídos entre os mais variados grupos de organismos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente (Junior et al., 2002). Baseado na diferença entre os tamanhos, os rRNA foram denominados como subunidade menor SSU 16S (exclusivo de procariotos), 18S (exclusivo de eucariotos) e subunidade maior LSU (23S/ 25S/ 28S). Em eucariotos as sub-unidades são justapostas e separadas pelo espaçador transcrito interno (ITS). A região ITS é composta por dois espaçadores altamente variáveis, ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S intercalado (Lindahl et al., 2013). Nos estudos filogenéticos as regiões conservadas devem conter uma variabilidade suficiente para se tornar informativa. Por isso, a região ITS é muito estudada em fungos em virtude de que não codifica componentes do ribossomo sendo altamente variável, porém a variação intra-específica é muito baixa. Em procariotos a pequena subunidade 16S tem sido o principal alvo para filogenia (como a LSU para fungos) e análise da comunidade (Hirsch et al., 2010; Lemos et al., 2011; Lindahl et al., 2013). As sequências que codificam o rDNA são dotadas de regiões conservadas alternando com 9 regiões variáveis (V1 a V9). Algumas dessas regiões podem ser representativas de todas as espécies, bem como algumas regiões são pertencentes a espécies únicas, fornecendo assim, a “impressão digital” da comunidade microbiana (Quadros, 2013).

O sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rDNA é o método mais eficaz para acessar a diversidade microbiana em amostras naturais. A partir da PCR, fragmentos do gene 16S DNA de interesse são amplificados produzindo a biblioteca genômica e, após conter os fragmentos definidos, são sequenciados. Após o sequenciamento as informações sobre as sequências do rRNA estão disponíveis na base de dados eletrônicas (Gen Bank, *European Molecular Biology Laboratory* - EMBL, entre outros). Essas bases de dados contêm informações para a identificação de bactérias, arqueas e fungos em nível de gênero, espécies e algumas sub-espécies. As sequências podem ser identificadas por comparação utilizando uma família de programas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), como outros programas de alinhamento mais recentes (Hirsch et al., 2010). Muitos *softwares* têm sido desenvolvidos com distintos propósitos (análise de sequências procarióticas, genes representativos para acessar a diversidade local, comparação entre bibliotecas 16S rRNA, etc.) em resposta aos dados gerados na pesquisa metagenômica,

possibilitando a comunidade científica uma melhor compreensão da complexa comunidade microbiana (Steele & Streit, 2006).

Como mencionado anteriormente, o sequenciamento de ácidos nucleicos fornece valiosas informações filogenéticas sobre microrganismos específicos inseridos em complexas comunidades comparando a outros grupos microbianos conhecidos. Dessa forma, podemos conhecer a abundância, composição e diversidade microbiana de vários ambientes, como, por exemplo, em sistemas agrícolas de cultivo convencional e direto (Quadros et al., 2012), em combustível diesel (Suflita et al., 2012; Bücken et al., 2014), como indicadores de saúde animal em baleias jubarte (Apprill et al., 2014); endosimbiontes oxidantes de enxofre em fontes hidrotermais (Zimmermann et al., 2014), em sistemas de aquacultura ecológica (Kandel et al., 2014) e até mesmo em registros fósseis (Sarkissian et al., 2014). Assim, os métodos independentes de cultivo têm revolucionado a ecologia microbiana, e entre a mais diversas técnicas moleculares existentes, podemos destacar a PCR (qPCR), DGGE e o sequenciamento do 16/18S rRNA.

3.5.2.1 PCR e variantes da técnica

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi descrita por Saiki et al. (1985) e representou um grande impulso nos métodos moleculares de identificação de microrganismos (Godfrey & Jackson, 2006). Genericamente a PCR possibilita a síntese de fragmentos do DNA utilizando a DNA polimerase para produzir uma sequência complementar a fita molde a partir de um iniciador ligado em uma região específica, definindo a sequência a ser replicada resultando em bilhões de cópias do DNA alvo (Novais et al., 2004). Modificações na técnica padrão da PCR vêm sendo realizadas a fim de aprimorar a caracterização de microrganismos, entre elas incluem a Transcriptase Reversa (RT-PCR), *Nested PCR*, *Multiplex PCR* e Quantitativo PCR (qPCR).

3.5.2.2 DGGE

A técnica da Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE*) permite estimar o perfil da comunidade (diversidade) com várias amostras de forma relativamente fácil e com baixo custo, através da análise e comparação dos perfis de bandas entre as amostras (White et al., 2011). Essa técnica promove a separação dos produtos amplificados por PCR (*amplicons* entre 200 e 500 pb) de mesmo tamanho, ou seja, mesmo número de pares de bases (pb), gerando um perfil de bandas (*fingerprint*) ou a “impressão “digital” da

comunidade. A separação dos fragmentos do DNA ocorre a partir das diferenças e distribuição do conteúdo G-C que afetam os movimentos dos fragmentos por gradiente desnaturante químico (uréia e formamida) linear (Ranjard et al., 2000; O'callaghan et al., 2006). Cada banda presente no gel corresponde a uma única espécie de microrganismo e a técnica apresenta sensibilidade para identificar diferenças nas sequências de apenas um nucleotídeo (Muysers et al., 1993). O perfil das diferentes amostras pode ser comparado entre tratamentos para determinar o nível de similaridade ou mudanças na composição da comunidade. Além disso, os *amplicons* podem ser isolados e selecionados para posterior sequenciamento para a identificação de filogenia das espécies (Godfrey & Jackson, 2006) ou ainda utilizando sondas para a identificação taxonômica de uma população específica dentro da comunidade (Ranjard et al., 2000). Por outro lado, o DGGE apresenta algumas limitações como não fornecer uma informação filogenética explícita, sendo necessário, muitas vezes, aliar a outros métodos de identificação, como por exemplo, o sequenciamento que podem auxiliar na identificação de bandas desconhecidas no gel de DGGE (Taylor et al., 2008). O tamanho das sequências amplificadas também pode representar uma limitação da técnica, pois não permite separações eficientes além de 500 pb e a resolução dos perfis obtidos (em termos de números de bandas) nem sempre é suficiente para ilustrar a considerável diversidade microbiana a partir de fragmentos de diferentes sequências que podem migrar na mesma posição (Ranjard et al., 2000).

3.5.2.3 Sequenciamento genético

A tecnologia de sequenciamento de DNA surgiu em 1977 por Fredrick Sanger a partir do método de terminação da cadeia (dideoxirribonucleotídeos), e no mesmo período, Walter Gilbert desenvolveu o método químico (modificações químicas do DNA e clivagem em bases específicas). Desde então, o método foi sendo aprimorado até o surgimento do sequenciamento automático utilizando a eletroforese capilar, e aliado a *softwares* específicos, promoveu agilidade e precisão, auxiliando na conclusão do projeto Genoma Humano em 2001. Além de auxiliar nesse importante projeto, serviu de referência para o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS). Essas tecnologias diferem do método Sanger, de “primeira geração”, por análises massivas paralelas, alto rendimento e custo reduzido, no entanto, a análise dos dados gerados ainda representa limitações nesses sistemas (Liu et al., 2012).

3.5.2.3.1 Sequenciamento de nova geração - NGS

Os NGS promovem o sequenciamento do DNA em plataformas capazes de gerar informações sobre milhões de pares de base em uma única corrida. Os sistemas de sequenciamento NGS de segunda geração são tipicamente representados pelo pirosequenciamento (Roche 454), Illumina (GAIIx/HiSeq/MiSeq), Solid (AB SOLiD) e Ion Torrent (Íon PGM). Novos métodos de sequenciamento estão sendo desenvolvidos, como por exemplo, a tecnologia de célula única (*single-molecule real-time sequencing* - SMRT), Nanopore e Pacbio (terceira geração) (Hirsch et al., 2010; Liu et al., 2012; Buermans & Den Dunnen, 2014; Steinbock & Radenovic, 2015).

Entre as tecnologias de segunda geração, a plataforma 454 (pirosequenciamento) e a Illumina tem sido as mais utilizadas em todo o mundo. As distintas plataformas de segunda geração possuem como características comuns o poder de gerar informações muitas vezes maiores que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Essa maior eficiência advém do uso da construção de bibliotecas em sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis (Carvalho & Silva, 2010; Hirsch et al., 2010).

Comparando os principais sistemas de sequenciamento a plataforma 454 fornece um perfil filogenético composto por longas sequências de leitura (~ 700 pb), já o Illumina apresenta sequências mais curtas (~ 100 pb). A versão HiSeq X MiSeq apresentam sistemas com a mesma funcionalidade, porém variam conforme a geração de número de sequências lidas, comprimento do fragmento e tempo de corrida. O Illumina MiSeq é mais adequado na redução de custos e genomas menores, além de maior rapidez nas análises (Caporaso et al., 2012).

Em relação ao sequenciamento de fungos, a plataforma 454 é a mais adequada em função do comprimento de leitura das bases (400 - 500 pb) ideais para cobrir a região ITS1 ou ITS2 (Lindahl et al., 2013). *Ion Personal Genome Machine* (PGM) da Ion Torrent e MiSeq da Illumina são para sequenciamento de genomas pequenos com elevada rapidez (Liu et al., 2012).

De qualquer forma, comparando-se as três plataformas, o Illumina HiSeq 2000 apresenta o maior rendimento, maior profundidade e menor custo de reagentes.

O sistema Solid tem maior precisão e o 454 tem o maior comprimento de leitura, entre diversos parâmetros avaliados por Liu et al. (2012).

Na plataforma da Illumina, as bibliotecas são fixadas a adaptadores sendo desnaturadas em cadeias simples e inseridas na plataforma sólida seguindo da amplificação em “ponte” com a formação de *clusters* que contém os fragmentos de DNA clonados. Antes do sequenciamento, as bibliotecas, em cadeia simples, são submetidas às enzimas de linearização para inserir os quatro tipos de nucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), os quais contém um fluoróforo (clivável) e um bloqueador do sinal (removível) para complementar uma base de cada vez, e o sinal ser captado por um CCD (*charge-coupled device*) (Liu et al., 2012). Na Figura 9 pode ser visualizada as etapas do princípio dessa técnica.

Muitos trabalhos tem utilizado as técnicas de sequenciamento do gene 16S rRNA para auxiliar na compreensão de comunidade microbianas presentes em sistemas de armazenamento de diesel, biodiesel e suas misturas, além de uma ampla comunidade envolvida em processos de biorremediação por derivados de petróleo, além de bactérias e biofilmes relacionadas aos processos de corrosão de tanques e oleodutos (Rajasekar et al., 2010; Lee et al., 2012; Restrepo-Florez et al., 2013; Viggor et al., 2013; Wang et al., 2013; Bücken et al., 2014).

Recentemente estudos envolvendo a relação de microrganismos aeróbios e anaeróbios com diesel e misturas de biodiesel com distintos teores de enxofre vêm sendo investigada (Passman & Dobranic 2005; Lee et al., 2010; Dodos et al., 2011; Dunn, 2011; Passman, 2012; Srivastava & Nandan, 2012; Lyles et al., 2013). Desta forma, na literatura tem-se observado o uso tanto de técnicas dependentes como independentes de cultivo, na tentativa de obtermos informações (fenotípicas, metabólicas, genéticas, filogenéticas, etc.) dos consórcios microbianos, quanto a sua composição, função e comportamento. De posse do levantamento de quem esta compondo o consórcio e de seu papel neste nicho ecológico especial, poderemos estabelecer metodologias de controle do seu crescimento nos tanques de estocagem e em programas de biorremediação de ambientes contaminados por combustíveis (Van Hamme et al., 2003; White et al., 2011).

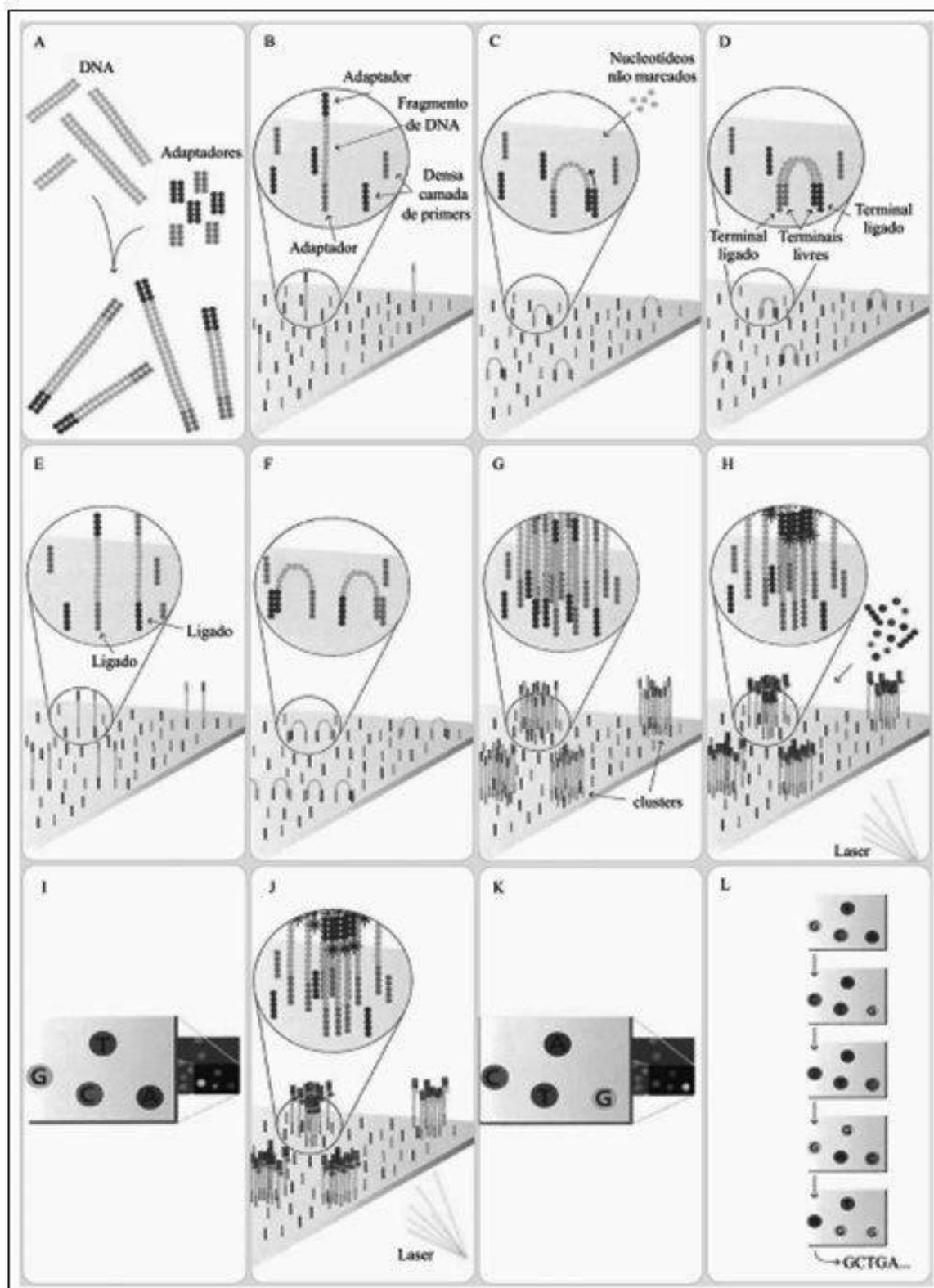


Figura 9. Representação esquemática das etapas do sequenciamento utilizado na plataforma Illumina.

(A) Etapa de fragmentação: o DNA é fragmentado e ligado aos adaptadores em ambas às extremidades. **(B)** Etapa de adesão ao suporte: as moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido contendo oligonucleotídeos de alta densidade complementares aos adaptadores. **(C)** Etapa de anelamento: no primeiro ciclo de amplificação o adaptador da extremidade livre da molécula aderida

ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte formando uma estrutura em ponte. **(D)** Etapa de extensão: com adição dos reagentes a PCR inicia com a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como *primer*. **(E)** Etapa de desnaturação: com a elevação da temperatura a "ponte" é desfeita. **(F)** Etapa de repetição do anelamento: sucessivos anelamentos formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. **(G)** Etapa de obtenção dos *clusters*: após sucessivos ciclos são obtidos *clusters* de moléculas idênticas ligadas ao suporte. **(H)** Etapa de adição dos nucleotídeos marcados e excitação: incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser gerando um sinal. **(I)** Etapa de leitura dos nucleotídeos: o sinal é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia. **(J, K)** Etapa de repetição dos nucleotídeos marcados, excitação e leitura: o processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura são repetidos para cada nucleotídeo componente da sequência. **(L)** Montagem das sequências: a leitura é feita de forma sequencial permitindo a montagem das sequências completas de cada *cluster* (Fonte: modificado de Carvalho & Silva, 2010).

REFERÊNCIAS

- AFNOR M07070-92 - Association Française de Normalisation. **Combustibles pour moteurs Diesel et pour installations de chauffage domestique - Recherche des microorganismes par tests sur gélose**. 4th edn. 1992.
- Abbad-Andaloussi S, Warzywoda M, Monot F. 2003. Microbial Desulfurization of Diesel Oils by Selected Bacterial Strains. *Oil gas sci. technol.* 58(4):505-13.
- Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Duncan KE, Perez-Ibarra BM, Suflita JM. 2013. Effects of oxygen on biodegradation of fuels in a corroding environment. *Int Biodeter Biodegr.* 81:114-26.
- Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Ray RY, Davidova IA, Lyles CN, Suflita JM. 2010. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. *Energy Fuels.* 24:2924-28.
- Al-degs Y, Al-ghoute M. 2015. Influence of diesel acidification on dibenzothiophene removal: a new desulfurization practice. *Sep Purif Technol.* 139:1-4.
- Alsopp D, Sealk K, Gaylarde CC. 2004. **Introduction to Biodeterioration**, University Press/Cambridge. 273 p.
- Alves L, Mesquita E, Gírio FM. 1999. Dessulfurização Bacteriana de Combustíveis Fósseis. *Bol Biotechnol.* 62:8p.
- APHA - American Public Health Association. 1992. Iron and Sulfur bacteria. In: **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**, APHA/ Washington. p. 9240B.
- Apprill A, Robbins J, Eren AM, Pack AA, Reveillaud J, Mattila D, Moore M, Niemeyer M, Moore KMT, Mincer TJ. 2014. Humpback Whale Populations Share a Core Skin Bacterial Community: Towards a Health Index for Marine Mammals? *Plos One.* 9(3):17p.
- ASTM D4012 - 81(2002) - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water**. 2002. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2002. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D4012>. Acesso em: 05 Jan 2016.
- ASTM D 6469-99 - American Society for Testing and Materials. **Standard Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems**. 1999. West Conshohocken, PA: ASTM International; 1999. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D6469>. Acesso em: 05 Jan 2016.
- Bamforth S, Singleton I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol.* 80(7):723-36.

- Barbosa AM, Geise EC, Covizzi LG. 2008. Biodegradação de Compostos Aromáticos. In: **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA/Jaguariúna. p. 261-280.
- Bento FM, Beech IB, Gaylard CC, Englert GE, Muller IL. 2005. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World J Microbiol Biotechnol.* 21(2):135-42.
- Bento FM, Bücken F, Santestevan N, Cavalcanti EHS, Zimmer A, Gaylarde C, Camargo F. 2010. Impacto da adição de biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: um enfoque microbiológico e controle. *Revista Biodiesel.* 47(14):24-9.
- Bento FM, Camargo FAO, Gaylarde CC, Viscardi SL, Menendez A, Daroda R. 2006. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel.* 4:24-6.
- Bento FM, Gaylarde CC. 1996. Microbial contamination of stored diesel oil. *Braz J Microbiol.* 27:71-75.
- Bento FM, Gaylarde CC. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. *Int Biodeter Biodegr.* 47:107-12.
- Bouchez-Naitali M, Vandecasteele JP. 2008. Microbial physiology and ecology. In: **Petroleum Microbiology – Concepts, Environmental implications, Industrial applications**, Editions Technip/Paris. p. 1-38.
- Braddock JF, Catterall PH. 1999. A simple method of enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. *Bioremediation J.* 3:81-84.
- Bücken F. 2009. **Biodeterioração de Misturas de Diesel e Biodiesel e seu Controle com Biocidas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Bücken F, Barbosa CS, Quadros PD, Bueno MK, Fiori P, Huang C, Frazzon APG, Ferrão MF, Camargo FAO, Bento FM. 2014. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int Biodeter Biodegr.* Doi 10.1016/j.ibiod.2014.05.030.
- Bücken F, Santestevan N, Jacques RJS, Peralba MCR, Camargo FAO, Gaylarde CC, Bento FM. 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int Biodeter Biodegr.* 65(1):172-78.
- Buermans HPJ, Den Dunnen JT. 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta.* 1842: 1932-41. Doi 10.1016/j.bbadis.2014.06.015.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6:1621-24.

- Carvalho MCG, Silva DCG. 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Cienc Rural*. 40(3):735-44.
- Cazarolli JC, Bucker F, Manique MC, Krause LC, Maciel JPS, Onorevoli B, Caramão EB, Cavalcanti EHS, Samios D, Peralba MCR, Bento FB. 2012. Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*. *R bras Bioci*. 10(3):251-57.
- Cazarolli JC, Guzatto R, Samios D, Peralba MCR, Cavalcanti EHS, Bento FM. 2014. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int Biodeter Biodegr*. 95:1-9. Doi 10.1016/j.ibiod.2013.09.025.
- Chapelle FH. 2001. **Ground-water microbiology and geochemistry**, John Wiley & Sons/New York. 477 p.
- Chapman RL. 2011. ULSD corrosion e finally, an answer? **PEI J Second Quarter**. p. 61-3.
- Colla TS, Andrezza R, Bucker F, Souza MM, Tramontini L, Prado GR, Frazzon APG, Camargo FAO, Bento FM. 2014. Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environ Sci Pollut Res*. 21:2592–2602.
- Cooper MG. 2000. **The Cell a Molecular Approach**, A.S.M. Press/ Washington. 713 p.
- Cruz GF, Marsaioli AJ. 2012. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. *Quim Nova*. 35(8):1628-34.
- Cyplik P, Schmidt M, Szulc A, Marecik R, Lisiecki P, Heipieper HJ, Owsianiak M, Vainshtein M, Chrzanowski L. 2011. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresour Technol*. 102:4347-52.
- Das N, Chandran P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int*. Article ID 941810. 13p. Doi 10.4061/2011/941810.
- De Mello J A, Carmichael CA, Peacock EE, Nelson RK, Arey JS, Reddy CM. 2007. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. *Mar Pollut Bull*. 54:894-904.
- Dodos GS, Konstantakos T, Longinos S, Zannikos F. 2011. Effects os microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Proceedings of the 12th International Conference Science and Technology**, 8-10 September. Rhodes/Greece. p. A431-39.

- Dunn RO. 2011. Fuel Properties of Biodiesel/Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) lends. J Am Oil Chem Soc. 88:1977-87.
- Ford T, Maki J, Mitchell R. 1995. Metal-microbe interactions. In: **Bioextraction and biodeterioration of metals**, Cambridge/USA. p. 1-23.
- Gaylarde CC, Bento F, Kelley J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. Braz J Microbiol. 30:1-10.
- Godfrey SA, Jackson RW. 2006. Molecular Characterization of Bacterial Plant Pathogens. In: **Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis**, CABI Publishing/Cambridge. p. 272-91.
- Grishin DF, Zinina ND. 2015. Review: Environmentally Friendly Diesel Fuels with Low and Ultralow Sulfur Content and Additives to Them. Russ J Appl Chem. 88(7):1106-21.
- Grossman MJ, Lee MK, Prince RC, Garrett KK, George GN, Pickering IJ. 1999. Microbial Desulfurization of a Crude Oil Middle-Distillate Fraction: Analysis of the Extent of Sulfur Removal and the Effect of Removal on Remaining Sulfur. Appl Environ Microbiol. 65(1):181-88.
- Hadder GR, Das S, Lee R. 1991. Ultra low sulphur diesel fuel impacts on availability of other Fuels. Energy Pol. 488-93. Doi 0301-4215/91/050488-06.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol. 5:245-49.
- Hernández-Prieto MA, Semeniuk TA, Futschik ME. 2014. Toward a systems level understanding of gene regulatory, protein interaction, and metabolic networks in cyanobacteria. Front Genet. 5(191):1-18.
- Hill EC. 1998. Use of thixotropic biopolymers as an alternative to agar for the cultivation of microorganisms on solid media. Polym Degrad Stab. 59:121-28.
- Hill EC, Hill GC, Collins D. 1977. A new on-site quantitative test for microorganisms in fuel. **6th International Conference on Stability and Handling of Liquid Fuels**, Vancouver/Canada. p. 777-88.
- Hill GC. 2003. Sampling Methods for Detecting Microbial Contamination in Fuel Tanks and Systems. In: **Fuel and fuel system microbiology: fundamentals, diagnosis, and contamination control**, ASTM manual/USA, n. MNL47. p. 14-23.
- Hirsch PR, Mauchline TH, Clark IM. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. Soil Biol Biochem. 42:878-87.
- IP 385-99 - Institute of Petroleum - International Standard Test Methods. **Determination of the viable aerobic microbial content of fuels and fuel components boiling below 390 °C - filtration and culture method**. 1999.

Copyright by ASTM: www.astm.org (all rights reserved); Acesso: 30 Nov 2015.

Jacques RJS, Silva KJ, Bento FM, Camargo FAO. 2010. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Cienc Rural*. 40(2):310-17.

Jakeria MR, Fazal MA, Haseeb ASMA. 2014. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renew Sustainable Energy Rev*. 30: 154-63.

Junior FBR, Mendes IC, Teixeira KRS, Reis VM. 2002. **Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo**, EMBRAPA Cerrados/Planaltina. Documento 51. 33 p.

Kandel PP, Pasternak Z, Van Rijn J, Nahum O, Jurkevitch E. 2014. Abundance, diversity and seasonal dynamics of predatory bacteria in aquaculture zero discharge systems. *FEMS Microbiol Ecol*. Doi 10.1111/1574-6941.123421.

Khan MR, Saha ML, Begum N, Mohammad NI, Hoque S. 2010. Isolation and characterization of bacteria from rusted iron materials. *Bangladesh J Bot*. 39(2):185-91.

Knothe G. 2010. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Prog Energy Combust Sci*. 36:364-73.

Knothe G, Dunn RO. 2001. Biofuels derived from vegetable oils and fats. In: **Oleochemical manufacture and applications**, Academic Press/ Sheffield. p. 106–63.

Knothe G, Gerpen JV, Kral J, Ramos LP (Eds). 2006. *Manual do Biodiesel*, Editora Blucher/São Paulo. 340 p.

Knothe G, Steidley KR. 2005. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity. *Energ Fuel*. 19:1192-1200.

Lee JS, Ray RI, Little BJ. 2010. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling*. 26(6):623-35.

Lee JS, Ray RI, Little BJ, Duncan KE, Oldhan AL, Davidova IA, Suflita JM. 2012. Sulfide production and corrosion in seawaters during exposure to FAME diesel. *Biofouling*. 28(6):623-35.

Lei 11.097. 2005. DOU 14.1.2005. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml?f=templates\\$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml?f=templates$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu). Acesso em: 13 fev. 2016.

Lei 13.263. 2016. DOU 24.03.2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=24/03/2016>. Acesso em: 27 maio 2016.

- Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. 2011. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J Microbiol Methods*. 86:42-51.
- Lindahl BD, Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Carlsen T, Kjøller R, Kõljalg U, Pennanen T, Rosendahl S, Stenlid J, Kauserud H. 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. *New Phytol*. 199:288-99.
- Lisiecki P, Chrzanowski L, Szulc A, Lawniczak L, Białas W, Dziadas M, Owsianiak M, Staniewski J, Cyplik P, Marecik R, Jelen H, Heipieper HJ. 2014. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel*. 116:321-27.
- Little B, Lee J. 2014. Microbiologically influenced corrosion: an update. *Int Mater Rev*. 59(7):384-93.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*. Article ID 251364:11 p.
- Lôbo IP, Ferreira SLC. 2009. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim Nova*. 32(6):1596-608.
- Londry KL, Suflita JM. 1998. Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism. *Environ Toxicol Chem*. 17(7):1119-1206.
- Lutterbach MTS, Galvão MM. 2014. Application of the qPCR Technique for SRB Quantification in Samples from the Oil and Gas Industries. In: **Applications of Molecular Microbiological Methods**. p. 69-75.
- Lutterbach MTS, Galvão MM, Araújo M, Contador LS, Oliveira V, Pimenta, GS. 2011. Real-time PCR Applied to Quantification of SRB in Bottom Water from Fuel Tanks. **NACE International Corrosion Conference & Expo**, n. 11233. 9 p.
- Lyles CN, Aktas DF, Duncan KE, Callaghan EV, Stevenson BS, Suflita JM. 2013. Impact of Organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environ Sci Technol*. 47:6052-62.
- Mariano AP, Tomasella RC, Oliveira LM, Contiero J, Angelis DF. 2008. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African J Biotechnol*. 7(9):1323-28.
- Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PSG, Dubinsky EA, Fortney JL, et al. 2012. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J*. 6:1715-27.
- Moran MA, Satinsky B, Gifford SM, Luo H, Rivers A, Chan LK. 2012. Sizing up metatranscriptomics. *ISME J*. 7:237-43.
- Moser BR. 2014. Impact of fatty ester composition on low temperature properties of biodiesel–petroleum diesel blends. 2014. *Fuel*. 115:500-06.

- Muyzer G, De Waal EC, Uitierlinden AG. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb.* 59(3):695-700.
- Novais CM, Alves MP, Silva FF. 2004. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da Reação e Cadeia da Polimerase (PCR). *Biotecnologia Cienc Desenvolv.* 33:11-13.
- O'Callaghan M, Lorenz N, Gerard EM. 2006. Molecular Characterization of Phylloplane and Rhizosphere Microbial Populations Using PCR and Dnaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: **Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis.** CABI Publishing Cambridge/MA, p. 99-115.
- Ohshiro T, Izumi Y. 1999. Review: Microbial Desulfurization of Organic Sulfur Compounds in Petroleum. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(1):1-9.
- Pasqualino JC, Montané D, Salvadó J. 2006. Syntetic effects os biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass Bioenerg.* 30:874-79.
- Passman FJ. 2003. ASTM International. **Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**, Manual 47. 113 p.
- Passman FJ. 2009. Using Adenosine Triphosphate to Quantify Bioburdens in Various Liquid Fuels. **Presented at 7th International Colloquium Fuels**, Technische Akadamie Esslingen, 14-15 January. Ostfildern/Germany.
- Passman FJ. 2012. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - A review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 81:88-104.
- Passman FJ, Dobranick JK. 2005. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. **Proceedings of the 9th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels - IASH.** Sidges/Spain. p. 18-22.
- Passman FJ, Egger GL, Hallahan S, Skinner BW, Deschepper M. 2009. Real-Time Testing of Bioburdens in Metalworking Fluids Using Adenosine Triphosphate as a Biomass Indicator. *Tribol T.* 52:788-92.
- Pawelec B, Navarro RM, Campos-Martin JM, Fierro JLG. 2011. Towards near zero-sulfur liquid fuels: a perspective review. *Catal Sci Technol.* 1:23-42.
- Pazmiño DET, Winklerb M, Gliederb A, Fraaije MW. 2010. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *J Biotechnol.* 146:9-24.
- Portal ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Produção Nacional de biodiesel Puro - B100 (metros cúbicos).** 2015. ANP. Disponível em: www.anp.gov.br/?dw=8740>. Acesso em: 09 dez.2015.

- Portaria INMETRO 389. 2013. **Portaria do Instituto Nacional de Metrologia - INMETRO 389 de 6.8.2013.** DOU 8.8.2013. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_portarias/portarias_inmetro/2013/pinmetro%20389%20-%202013.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_portarias/portarias_inmetro/2013/pinmetro%20389%20-%202013.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=). Acesso em: 22 Nov. 2015.
- Quadros PD. 2013. **Diversity and composition of soil microbial communities in constructed soils after coal mining, and under agricultural management.** Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Quadros PD, Zhalnina K, Davis-Richardson A, Fagen JR, Drew J, Bayer C, Camargo FAO, Triplett EW. 2012. The Effect of Tillage System and Crop Rotation on Soil Microbial Diversity and Composition in a Subtropical Acrisol. *Diversity*. 4:375-95.
- Rajasekar A, Anandkumar B, Maruthamuthu S, Ting YP, Rahman PKSM. 2010. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85:1175-88.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol*. 151:167-77.
- Resolução ANP 45. 2014. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo – ANP 45 de 25.8.2014.** DOU 26.8.2014. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.
- Resolução ANP 50. 2013. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 50 de 23.12.2013.** DOU 24.12.2013. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.
- Resolução ANP 65. 2011. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 65 de 9.12.2011.** DOU 12.12.2011. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.
- Restrepo-Florez JM, Bassi A, Rehmann L, Thompson MR. 2013. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. *Bioresource Technol*. 147:456-63.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Rodríguez E, Blanco R, Cordero I, Segura D. 2010. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. *J Environ Sci*. 22(10):1595-601.

- Saiki RK, Scarf F, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplifications of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-54.
- Sarkissian CD, Ermini L, Onsson HJ, Alekseev AN, Crubezy E, Shapiro B, Orlando L. 2014. Shotgun microbial profiling of fossil remains. *Mol Ecol*. 23:1780-98.
- Seabra PN. 2008. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados. In: **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA, Jaguariúna/SP. p. 547-70.
- Sharma YC, Singh B, Upadhyay SN. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*. 87:2355-73.
- Siegert W. 2009. Microbial Contamination in Diesel Fuel - Are new problems arising from biodiesel blends? **Proceedings of the 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels - IASH**. 18-22 October. Prague/Czech Republic.
- Sobolev D, Roden EE. 2001. Suboxic deposition of iron by bacteria in opposing gradients of Fe (ii) and oxygen at circumneutral pH. *Appl Environ Microbiol*. 67(3):1328-34.
- Solano-Serena F, Marchal R, Vandecasteele JP. 2008. Biodegradation of aliphatic and alicyclic hydrocarbons. In: **Petroleum Microbiology - Concepts, Environmental implications, Industrial applications**, Editions Technip, Paris/France. p. 173-240.
- Sørensen G, Pedersen DV, Norgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. 2011. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresource Technol*. 102:5259-64.
- Srivastava NK, Nandan NK. 2012. Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. *IJEPR*. 1(1):119-25.
- Stanislaus A, Marafi A, Rana SM. 2010. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal Today*. 153:1-68.
- Steele HL, Streit WR. 2006. Metagenomics for the Study of Soil Microbial Communities. In: **Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis**. CABI Publishing Cambridge/MA, p. 42-54.
- Steinbock LJ, Radenovic A. 2015. The emergence of nanopores in next generation sequencing. *Nanotechnology*. 26(7):074003. Doi 10.1088/0957-4484/26/7/074003
- Suflita JM, Aktas DF, Oldham AL, Perez-Ibarra BM, Duncan K. 2012. Molecular tools to track bacteria responsible for fuel deterioration and microbiologically influenced corrosion. *Biofouling*. 28(9):1003-10.
- Suflita JM, Lyles CN, Aktas DF, Sunner J. 2014. Biocorrosion issues associated with the use of ultra-low sulfur diesel and biofuel blends in the energy infrastructure. In:

Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications. European of Corrosion (EFC), Elsevier Science. Web: 22 July 2015.

- Tang K, Baskaran V, Nemati M. 2009. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochem Eng J.* 44:73-94.
- Taylor DL, Booth MG, Mcfarland JW, Herriott IC, Lennon NJ, Nusbaum C, Marr TG. 2008. Increasing ecological inference from high throughputsequencing of fungi in the environment through atagging approach. *Mol Ecol Resour.* 8:742-52.
- Tyagi OS, Atray N, Kumar B, Datta A. 2010. Production, Characterization and Development of Standards for Biodiesel - A Review. *Mapan-J Metrol Soc I.* 25(3):197-218.
- Uchiyama T, Ito K, Mori K, Tsurumaru H, Harayama S. 2010. Iron-Corroding Methanogen Isolated from a Crude-Oil Storage Tank. *Appl Environ Microb.* 76(6):1783-88.
- Urich T, Lanzén A, Stokke R, Pedersen RB, Bayer C, Thorseth IH, Schleper C, Steen IH, Øvreas L. 2013. Microbial community structure and functioning in marine sediments associated with diffuse hydrothermal venting assessed by integrated meta-omics. *Environ Microbiol.* 16(9):2699-710. Doi 10.1111/1462-2920.12283.
- Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol R.* 67(4):503-49.
- Vandecasteele JP (Ed). 2008. Microbiology of methane and of C₁ compounds. In: **Petroleum Microbiology - Concepts, Environmental implications, Industrial applications**, Editions Technip/Paris. p. 79-171.
- Vandecasteele JP, Manot F. 2008. Biodegradation of monoaromatic and chloroaromatic hydrocarbons. In: **Petroleum Microbiology – Concepts, Environmental implications, Industrial applications**, Editions Technip/Paris. p. 241-339.
- Videla HA. 1995. Electrochemical aspects of biocorrosion. In: **Bioextraction and biodeterioration of metals**, Cambridge/USA. p. 85-127.
- Vieira TM, Silva EP, Antoniosi Filho NR, Vieira JDG. 2006. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma, **Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel. Artigos técnico-científico.** Estação Gráfica/Brasília. p. 218-22.
- Viggor S, Juhanson J, Jõesaar M, Mitt M, Truu J, Vedler E, Heinaru A. 2013. Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol Res.* 168:415-27.

- Wang H, Wang C, Lin M, Sun X, Wang C, Hu X. 2013. Phylogenetic diversity of bacterial communities associated with bioremediation of crude oil in microcosms. *Int Biodeter biodegr.* 85:400-06.
- White J, Gilbert J, Hill G, Hill ED, Huse S, Weightman A, Mahenthiralingam E. 2011. Culture-Independent Analysis of Bacterial Fuel Contamination Provides Insight into the Level of Concordance with the Standard Industry Practice of Aerobic Cultivation. *Appl Environ Microb.* 77(13):4527-38.
- Xu J. 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol.* 15:1713-31.
- Yang C, Lee S, Larsen S, Madsen M. 2008. ULSD/Biodiesel blend and its effect on fuel/water separation. **American Filtration & Separation Society Annual Conference.** 19-22 May. Valley Forge/PA.
- Yang Z, Hollebone BP, Wang Z, Yang C, Brown C, Landriault M. 2014. Storage stability of commercially available biodiesels and their blends under different storage conditions. *Fuel.* 115:366-77.
- Yassine MH, Wu S, Suidan MT, Venosa AD. 2013. Aerobic Biodegradation Kinetics and Mineralization of Six Petrodiesel/Soybean-Biodiesel Blends. *Environ Sci Technol.* 47:4619-27.
- Yemashova NA, Murygina VP, Zhukov DV, Zakharyantz AA, Gladchenko MA, Appanna V, Kalyuzhnyi SV. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 6:315-37.
- Zanaroli G, Toro SD, Todaro D, Varese GC, Bertolotto A, Fava F. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microb Cell Fact.* 9(10):1-13.
- Zhang X, Peterson CL, Reece D, Mbller G, Haws R. 1998. Biodegradability of biodiesel in the environment. *Trans ASAE.* 41:1423-30.
- Zimmer A, Cazarolli JC, Teixeira RM, Viscardi SLC, Cavalcanti EHS, Gerbase A, Ferrão FM, Piatnick CMS, Bento FM. 2013. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *Fuel.* 112:153-62.
- Zimmermann J, Lott C, Weber M, Ramette A, Bright M, Dubilier N, Petersen JM. 2014. Dual symbiosis with co-occurring sulfur-oxidizing symbionts in vestimentiferan tubeworms from a Mediterranean hydrothermal vent. *Environ Microbiol.* 16(12):3638-56. Doi 10.1111/1462-2920.12427.

4. CAPÍTULO 1.

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TEORES DE ENXOFRE NO DIESEL PURO (B0) E
NA MISTURA B10 NO CRESCIMENTO DE *Pseudallescheria boydii* E
Paecilomyces variotii.**

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TEORES DE ENXOFRE NO DIESEL PURO (B0) E NA MISTURA B10 NO CRESCIMENTO DE *Pseudallescheria boydii* E *Paecilomyces variotii*.

Aline Oliboni de Azambuja^{a*}; Andersen Langendorf da Silva^b; Camila Correa^b; Marco Flôres Ferrão^b; Fátima Menezes Bento^a

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LAB-BIO), RS - Brasil.

^bUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, RS - Brasil.

*autor correspondente

Tel: +55 51 91246674; fax:+55 51 3308 3665

E-mail: alineoliboni@gmail.com

Destaques

Pseudallescheria boydii apresentou valores superiores de biomassa na mistura B10 comparado ao fungo *Paecilomyces variotii*.

Os óleos dieseis com diferentes teores de enxofre apresentaram distintas características moleculares.

O diesel puro S1800 sofreu maior degradação do que S50 e S500.

Na análise de RMN H^1 foi verificado maior presença de cadeias ramificadas e teor de hidrocarbonetos aromáticos no diesel e mistura B10 S500 que no S50 e S1800.

Resumo

A redução do teor de enxofre no diesel é uma tendência mundial que visa minimizar o impacto ambiental proveniente da queima desse combustível. Os compostos sulfurados conferem algumas propriedades importantes no combustível, mas poucas são as informações sobre os efeitos da redução de enxofre na formação de biomassa microbiana em tanques de armazenamento e de veículos. O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e a produção de biomassa pelos fungos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no diesel puro e na mistura B10, confeccionada com diesel S50, S500 e S1800. A armazenagem foi simulada em frascos de vidro de 25 mL com o meio mineral Bushnell-Haas e o indicador redox DCPIP, mais 20 % de fase oleosa com diesel puro e a mistura B10 com diferentes teores de enxofre. Os fungos foram inoculados em 10^5 esporos mL^{-1} e incubados a 30 °C por 14 dias. *P. boydii* cresceu em todas as três concentrações de enxofre, enquanto *P. variotii* não cresceu em B10 S50 e nenhum dos fungos oxidou o diesel puro com diferentes teores de enxofre. *P. boydii* produziu significativa biomassa em B10 com os três teores de enxofre comparado ao fungo *P. variotii*. Na análise de infravermelho foram verificadas alterações moleculares em todos os tratamentos de acordo com os distintos teores de enxofre. O diesel S1800 foi mais degradado que os demais e o diesel S500 apresentou maior teor de ramificações e hidrocarbonetos aromáticos corroborando com a baixa biodegradabilidade apresentada.

Palavras-chave: fungos filamentosos, óleo diesel, biodegradação, mistura B10, indicador redox, teores de enxofre.

4.1 Introdução

A redução dos teores de enxofre no óleo diesel é uma tendência mundial que visa minimizar a poluição atmosférica. Durante a combustão, o enxofre promove a liberação de partículas tóxicas como os óxidos de nitrogênio (NOx) e óxidos de enxofre (SOx), além de provocar a oxidação catalítica dos veículos reduzindo a eficácia no tratamento de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e matéria orgânica volátil (Stanislaus et al., 2010). Para a produção de um diesel com baixo teor de enxofre é realizado um processo que remove os seus heteroátomos alterando algumas propriedades como lubrificidade, densidade, viscosidade e possível suscetibilidade a contaminação microbiana (Knothe & Steidley, 2005; Yemashova et al., 2007; Lee et al., 2010; Dodos et al., 2011; Dunn, 2011; Passman, 2012; Srivastava & Nandan, 2012; Lyles et al., 2013).

Em 2005 foi introduzido o biodiesel na matriz energética brasileira representando a possibilidade de um substituto natural para o diesel. O biodiesel é produzido a partir de matéria-prima renovável, pelo processo de transesterificação, gerando ésteres mono alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa e pode conter quantidades mínimas de enxofre residual, da catálise ácida do processo, porém apresenta baixa estabilidade química e capacidade de reter água estando mais sujeito a contaminação microbiana (Lôbo et al., 2009; Das & Chandran, 2011; Tyagi et al., 2010). Atualmente o mercado nacional utiliza a mistura B7 S10/S500, que contém 93 % de diesel mineral com 10 mg kg⁻¹ ou até 500 mg kg⁻¹ de enxofre e 7 % de biodiesel (Resolução ANP 50/2013; Lei 13.263, DOU 24.03.2016), porém tal formulação está sujeita a algumas vulnerabilidades. O biodiesel é mais facilmente metabolizado que o diesel devido a presença de cadeias de ácidos graxos com dois oxigênios situados na porção terminal sendo biologicamente ativo e facilmente reconhecido por muitos microrganismos (Zhang et al., 1998). Além disso, o biodiesel pode promover o cometabolismo, no qual a biodegradabilidade do diesel se torna potencializada por microrganismos que utilizam um substrato prontamente biodegradável como fonte de carbono para degradar o substrato mais recalcitrante (Pasqualino et al., 2006). Recentemente alguns estudos têm abordado a contaminação microbiana em diesel e misturas de diesel/biodiesel contendo teores de enxofre reduzidos (Passman & Dobranic 2005; Lee et al., 2010; Dodos et al., 2011; Dunn, 2011; Passman, 2012; Srivastava & Nandan, 2012; Lyles et al., 2013). Diante desse cenário o objetivo deste

estudo foi verificar o crescimento e a produção de biomassa pelos fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no diesel puro S50, S500 e S1800 e nas blends confeccionados com 10 % de biodiesel v/v.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Combustíveis utilizados

Foram utilizados óleo diesel A (B0) com os seguintes teores de enxofre: S50, S500 e S1800 fornecidos pela empresa Ipiranga Produtos de Petróleo S/A, livre de aditivos e acompanhados de Certificado de Qualidade (ANEXOS 2, 3 e 4, respectivamente) em consonância para o diesel (Regulamento Técnico ANP 08/2011). O biodiesel metílico de soja (B100) foi fornecido pela empresa Granol composto por 80:20 soja/sebo bovino, respectivamente (ANEXO 5), de acordo com as especificações contidas no Regulamento Técnico ANP 04/2012. A mistura B10 foi confeccionada em laboratório contendo 10 % de biodiesel e 90 % de diesel A com os diferentes teores de enxofre. O óleo diesel (B0), o biodiesel (B100) e as misturas (B10) foram analisados quanto aos teores máximos de enxofre (mg kg^{-1}) por distintas empresas, conforme mostra a Tabela 1. Todos os combustíveis foram esterilizados utilizando membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,22 micra (Millipore).

Tabela 1. Combustíveis utilizados no experimento e teores de enxofre avaliados pelas distintas empresas.

Combustíveis	Empresas		
	A*	B	C
		(ASTM D5453)	(ASTM D5453)
	Teores máximos de enxofre mg kg^{-1} (ppm)		
Diesel B0 S50	7	7,1	10
Diesel B0 S500	435	408	442
Diesel B0 1800	1530	1366	1304
Biodiesel (B100)	3,2	5,2	-
Mistura B10 S50	-	6,2	-
Mistura B10 S500	-	381	-
Mistura B10 S1800	-	1146	-

*Empresa que utilizou a norma ASTM D7039 (S50) e ASTM D4294 (S500 e S1800) para avaliação do teor de enxofre. Laudos no ANEXOS 2, 3 e 4 respectivamente.

Normas:

ASTM 7039 enxofre total na gasolina e diesel. Utiliza a espectrometria de fluorescência de raios X - MWDXRF (*Monochromatic Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry*). Concentração da amostra: 2 a 500 mg kg⁻¹.

ASTM D4294 enxofre total no petróleo e produtos de petróleo. Utiliza a espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva. Concentração da amostra: 0.0150 a 5.00% _{massa} (150 a 50 000 mg kg⁻¹).

ASTM D5453 para hidrocarbonetos, combustíveis automotivos e óleos. Utiliza a fluorescência ultravioleta para detectar o enxofre total referente a concentração de dióxido de enxofre (SO₂) presente na amostra. Concentração da amostra: 0.0001 a 0.8% _{massa} (1.0 a 8000 mg kg⁻¹). Norma padrão ouro.

4.2.2 Microrganismos deteriogênicos

Neste estudo foram utilizados dois fungos filamentosos com comprovada capacidade deteriogênica em diversos trabalhos do grupo de pesquisa em Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis LAB-BIO – UFRGS (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2004; Bento et al., 2005; Bücken et al., 2011; Cazarolli et al., 2012, 2014; Gassen et al., 2015). *Pseudallescheria boydii* foi isolado de solo de *landfarming* impactado com resíduos oleosos por 27 anos (Cazarolli et al., 2014) e *Paecilomyces variotii* foi isolado de tanques de estocagem de diesel metropolitano S500 (Bento & Gaylarde, 2001).

4.2.3 Condições de cultivo

Os fungos filamentosos *P. boydii* e *P. variotii* foram cultivados em meio Ágar Malte e Ágar Sabouraud (Himedia), respectivamente e incubados a 30 °C por 5 dias. Após o período de crescimento foi adicionado 2 mL do surfactante Tween 80 (Sigma-Aldrich) a 0,01 % e 2 mL de solução salina (0,85 %) sobre as culturas para a remoção dos esporos, sendo mantida em incubador rotativo a 120 r.p.m., 30 °C por 24 horas com o objetivo de esgotar as reservas energéticas. A solução de esporos foi diluída serialmente em solução salina (0,85 %) e contada em Câmara de Neubauer ajustando-se a concentração em 10⁵ esporos mL⁻¹ para o experimento.

4.2.4 Ensaio de biodegradabilidade preliminar

A biodegradabilidade dos diései e das misturas B10 com diferentes teores de enxofre foi avaliada utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson et al., 1993). O princípio desta técnica está baseado na oxidação microbiana de uma fonte de carbono, onde os elétrons são transferidos para aceptores de elétrons tais como o oxigênio, nitrato e sulfato na cadeia respiratória. A partir da incorporação de um acceptor artificial de elétrons (DCPIP), no meio de cultura, é possível determinar a capacidade de um microrganismo em utilizar um substrato, na medida que ocorre a mudança de coloração do meio de azul (oxidado) para incolor (reduzido), devido ao

fluxo de elétrons oriundos da oxidação do hidrocarboneto pelo microrganismo. O experimento foi realizado em triplicata, em frascos de vidro tipo penicilina estéreis (25 mL), contendo as fases aquosa e oleosa, simulando o armazenamento. A fase aquosa foi composta de uma solução de 8 mL do meio mineral Bushnell & Haas (1941) (g L^{-1} : 1.0 KH_2PO_4 ; 1.0 K_2HPO_4 ; 1.0 NH_4NO_3 ; 0.2 MgSO_4 ; 0.05 FeCl_3 ; 0.02 CaCl_2 ; pH 7.2), com o indicador redox DCPIP ($0,25 \text{ g L}^{-1}$), esterilizados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. A fase oleosa foi composta por 2 mL do diesel puro (B0) ou da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800) estéreis. Os fungos deteriorogênicos *P. boydii* e *P. variotii* foram adicionados, individualmente no microcosmo, numa concentração final de 10^5 esporos mL^{-1} e incubados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 14 dias, protegidos da luz para evitar a fotoxidação. O tratamento controle recebeu as mesmas condições, sem a adição do inóculo fúngico e as avaliações visuais de degradação pela mudança de cor foram acompanhadas diariamente por até 7 dias.

4.2.5 Interface óleo/água

4.2.5.1 Crescimento fúngico

A biomassa dos fungos filamentosos *P. boydii* e *P. variotii* foi retirada da região interfacial óleo/água após 14 dias de experimento. Previamente, as membranas de papel filtro com porosidade de 14 micra (Marca Qualy) foram submetidas à secagem em estufa bacteriológica a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h e mantidas no dessecador por 24 h para posterior pesagem em balança de precisão, sendo armazenadas novamente em dessecador. Ao final do experimento, foi realizada a separação da fase oleosa e aquosa e a biomassa fúngica recuperada por filtração adicionando-se 2 mL de hexano para remoção dos resíduos oleosos seguindo os mesmos procedimentos de secagem, remoção de umidade e pesagem acima mencionados. O peso seco da biomassa (mg) de cada triplicata foi obtido a partir da diferença entre o peso final e peso inicial das membranas.

4.2.6 Fase oleosa

4.2.6.1 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^{-1})

Alíquotas de 1 mL da fase oleosa de todos os tratamentos nos tempos zero e 14 dias foram coletadas e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até proceder as análises de espectroscopia no infravermelho (FTIR) para verificar a fração de ésteres (biodiesel), alifáticos e aromáticos (diesel) degradados. Os espectros FTIR foram obtidos usando o espectrofotômetro 400 Perkin Elmer equipado com detector de sulfato triglicina

deuterado (DTGS) e um acessório de refletância total atenuada horizontal (HATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros foram recolhidos em duplicatas 650-4000 cm^{-1} à temperatura ambiente. A resolução óptica do infravermelho foi de 4 cm^{-1} e 16 varreduras acumuladas para cada espectro. Esses foram obtidos para cada amostra subtraindo o *background* (espectro de fundo) que foi realizado com o cristal limpo (sem amostra). Os dados espectrais obtidos foram centrados na média para realização das análises multivariadas. Os resultados do infravermelho foram subsequentemente submetidos a análise de agrupamento hierárquico (HCA) na região espectral de 1800-650 cm^{-1} utilizando o programa Matlab 7,11 (The Mathworks) e o programa PLS_Toolbox 6.0 (Eigenvector Research).

A partir dos resultados obtidos no infravermelho as amostras foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^{-1}) empregando um equipamento Varian- INOVA 300, 300 MHz. Uma alíquota de aproximadamente 15 mg de cada amostra foi solubilizada em 550 μL de clorofórmio-D 99,8 % (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) e os espectros foram adquiridos com pulso de 90° e tempo de relaxação de 10 s. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, etilênicos e metilênicos foram integrados e comparados.

4.2.7 Fase aquosa

4.2.7.1 pH

As medidas de pH foram tomadas da fase aquosa, no tempo zero e após 14 dias, de todos os tratamentos, utilizando fitas de pH universal (Marcherey-Nagel).

4.2.8 Análise estatística

O experimento foi conduzido em triplicatas e os dados de pH e biomassa fungica, obtidas nos diferentes tratamentos, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95 % e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p= 0,05$). A análise do componente principal (PCA) foi utilizada para determinar a relação entre biomassa, teor de enxofre e tipo de combustível (B0 e B10) e aplicado a correlação de Spearman para dados com distribuição não normal. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa XLSTAT 2015 versão 2.01.17318.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Degradação preliminar com teste colorimétrico

Os resultados demonstram que o fungo *P. boydii* apresentou crescimento nas três concentrações de enxofre avaliadas na mistura B10, o que pode ser observado através da viragem do indicador-redox DCPIP (frascos descoloridos), comprovando a oxidação do substrato (Figura 1A). O fungo *P. variotii* não cresceu somente na mistura B10 S50 permanecendo com a coloração original azul da fase aquosa contendo o meio mineral Bushnell-Haas e o DCPIP (Figura 1B).

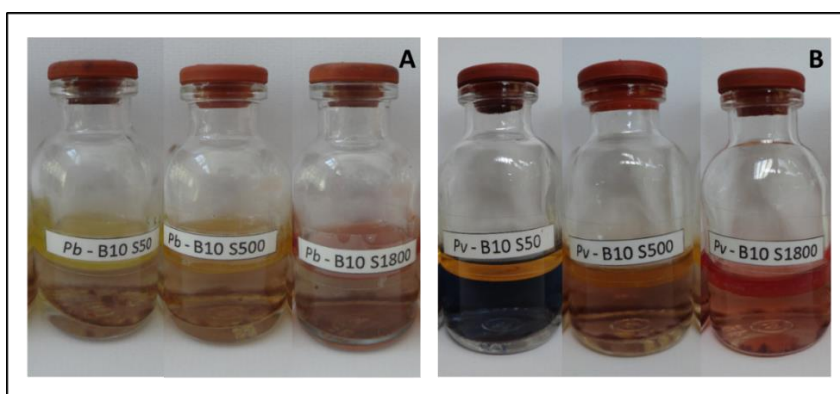


Figura 1. Teste de biodegradabilidade da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) para os fungos deteriorogênicos na fase aquosa contendo o meio mineral Bushnell-Haas e o indicador redox DCPIP. **A:** *Pseudallescheria boydii* (*Pb*); **B:** *Paecilomyces variotii* (*Pv*).

No diesel puro (B0), com os diferentes teores de enxofre S50, S500 e S1800, não foi visualizado crescimento fungico a partir da viragem do meio aquoso, conforme a técnica empregada. (Figura 2A e B).

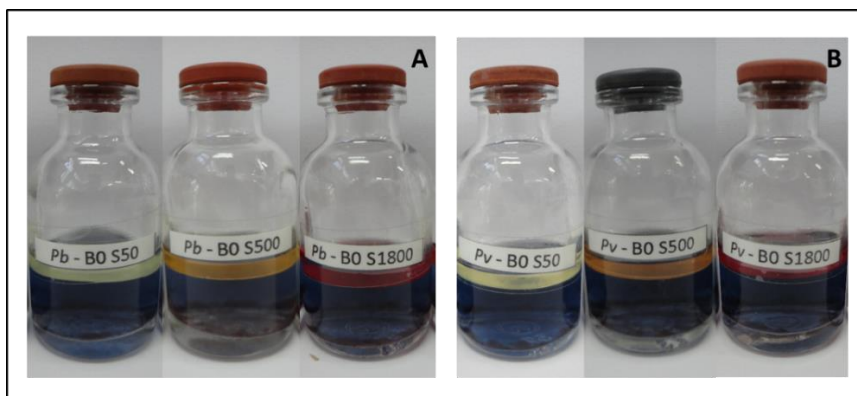


Figura 2. Teste de biodegradabilidade do diesel puro com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) para os fungos deteriorogênicos na fase aquosa contendo o meio mineral Bushnell-Haas e o indicador redox DCPIP. **A:** *Pseudallescheria boydii* (*Pb*); **B:** *Paecilomyces variotii* (*Pv*).

O tempo de viragem do indicador-redox, presente na fase aquosa, foi acompanhado durante o crescimento dos fungos no diesel puro e na mistura B10 com os diferentes teores de enxofre (Tabela 2). O tempo de viragem para *P. boydii* foi observado em 48 horas e para *P. variotii* após 96 horas na mistura B10 S500 e B10 S1800 para ambos os microrganismos. No diesel puro não foi verificada a viragem do indicador em nenhuma concentração de enxofre pelos fungos avaliados durante os 7 dias de avaliação.

Tabela 2. Tempo de viragem do indicador-redox (DCPIP) para *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* indicando a degradação do diesel puro (B0) e mistura B10 com diferentes teores de enxofre.

Tratamentos	Tempo (horas)					
	0	24	48	72	96	120
<i>P. boydii</i> B0-S50	-	-	-	-	-	-
<i>P. boydii</i> B0-S500	-	-	-	-	-	-
<i>P. boydii</i> B0-S1800	-	-	-	-	-	-
<i>P. variotii</i> B0-S50	-	-	-	-	-	-
<i>P. variotii</i> B0-S500	-	-	-	-	-	-
<i>P. variotii</i> B0-S1800	-	-	-	-	-	-
<i>P. boydii</i> B10-S50	-	-	-	+	+	+
<i>P. boydii</i> B10-S500	-	-	+	+	+	+
<i>P. boydii</i> B10-S1800	-	-	+	+	+	+
<i>P. variotii</i> B10-S50	-	-	-	-	-	-
<i>P. variotii</i> B10-S500	-	-	-	-	+	+
<i>P. variotii</i> B10-S1800	-	-	-	-	+	+

(+): viragem do indicador-redox de azul para incolor.

(-): sem viragem do indicador-redox, permanecendo azul.

4.3.2 Biomassa fúngica

Em relação à biomassa formada na interface óleo/água, ao final dos 14 dias de ensaio, foi verificado que no diesel puro os valores de biomassa para *P. boydii* foram 53 % (S50), 48 % (S500) e 39 % (S1800) maiores do que para *P. variotii*. Porém, apesar de *P. boydii* ter apresentado maior crescimento, esta diferença não foi

significativa ($p > 0,05$), quando comparado a *P. variotii*, para todos os teores de enxofre testados (Figura 3).

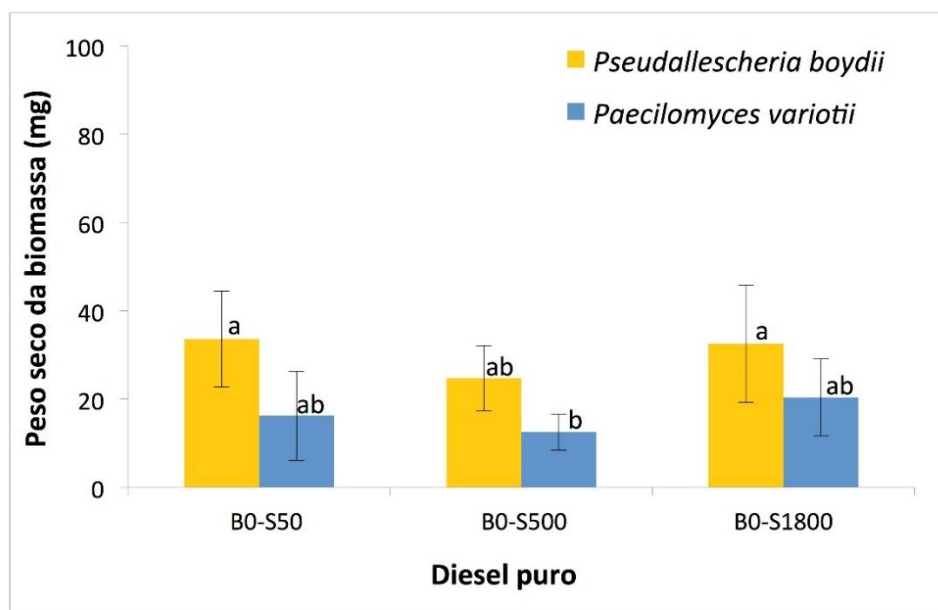


Figura 3. Valores do peso seco da biomassa (mg), formada na interface óleo/água, de *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no óleo diesel puro com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800), após 14 dias de experimento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

Na mistura B10 *P. boydii* produziu cerca de quatro vezes o valor de biomassa comparada a *P. variotii* ($p < 0,05$) (Figura 4). A maior biomassa foi registrada em B10 S50 (82 mg), seguido de B10 S500 (74 mg) e B10 S1800 (64 mg) para *P. boydii*. O fungo *P. variotii* produziu valores de biomassa na mistura B10 S50, S500 e S1800 (17, 19 e 22 mg, respectivamente) um pouco mais elevado que o diesel puro, porém sem estatística diferença entre os combustíveis e entre os teores de enxofre ($p > 0,05$). No entanto, para *P. boydii* houve significativa diferença na produção de biomassa na mistura B10 corroborando com os estudos de Cazarolli et al. (2014) que obtiveram elevada biomassa de *P. boydii* em biodiesel puro a base de linhaça, soja e oliva. Para *P. variotii* esses resultados diferem de outros trabalhos de pesquisa que relatam diferenças significativas do crescimento fúngico no diesel puro (Gassen et al., 2015) e quando inoculado na mistura de diesel / biodiesel 20 % e biodiesel 100 % (Bücker et al., 2011). Por outro lado, Bento & Gaylarde (2001) avaliaram o crescimento de *P. variotii* em diesel metropolitano (S500) e o meio mineral Bushnell-Haas e não

encontraram significativa diferença, assim como os resultados aqui obtidos, para o mesmo isolado fúngico do estudo citado.

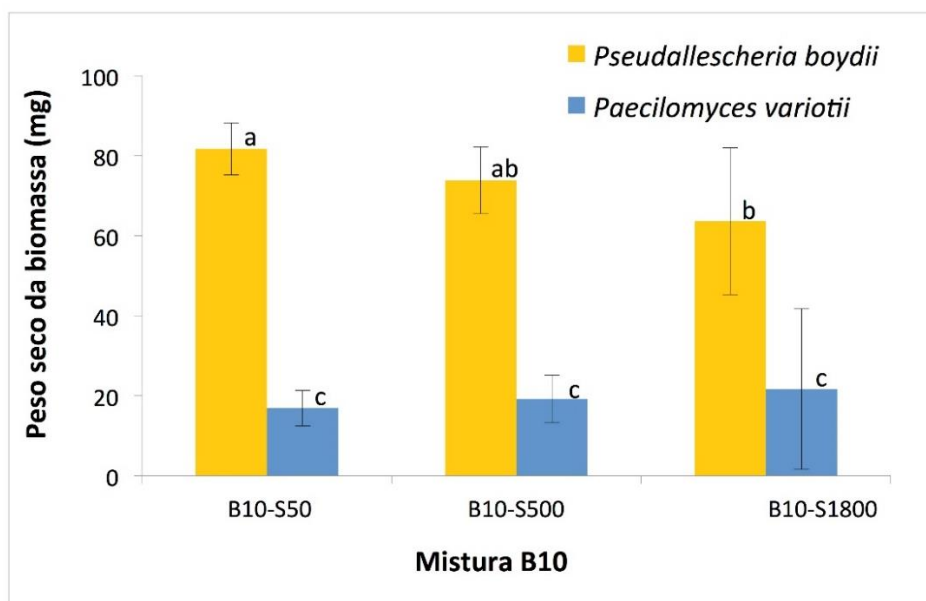


Figura 4. Valores do peso seco da biomassa (mg), formada na interface óleo/água, de *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* na mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800), após 14 dias de experimento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Dunca

As medidas de pH da fase aquosa ficaram entre 6 e 7 não sendo verificado significativa variação em 14 dias de experimento ($p > 0,05$), comparativamente ao meio mineral Bushnell-Haas, com pH inicial por volta de 7. O período de 14 dias pode ter sido o principal fator para que não fosse verificado alterações no pH, uma vez que a ácidos orgânicos derivados do metabolismo fúngico de degradação não foram suficientemente sintetizados. Além disso, a ação tamponante dos fosfatos (2 g L^{-1}), presentes no meio mineral Bushnell-Haas, pode dissimular pequenas variações de pH (Bento et al., 2005).

4.3.3 Degradação do diesel e biodiesel

Os resultados de espectroscopia em infravermelho no diesel puro revelaram que todos os tratamentos com diferentes teores de enxofre e os controles (estéril) apresentaram mudanças estruturais após 14 dias de avaliação, comparados ao tempo zero (Figura 5). Foi possível verificar uma distinta separação dos grupos de acordo com os teores de enxofre. O diesel S1800 foi o que apresentou maior tendência a degradação, enquanto que B0 S500 e S50 foram mais semelhantes aos controles.

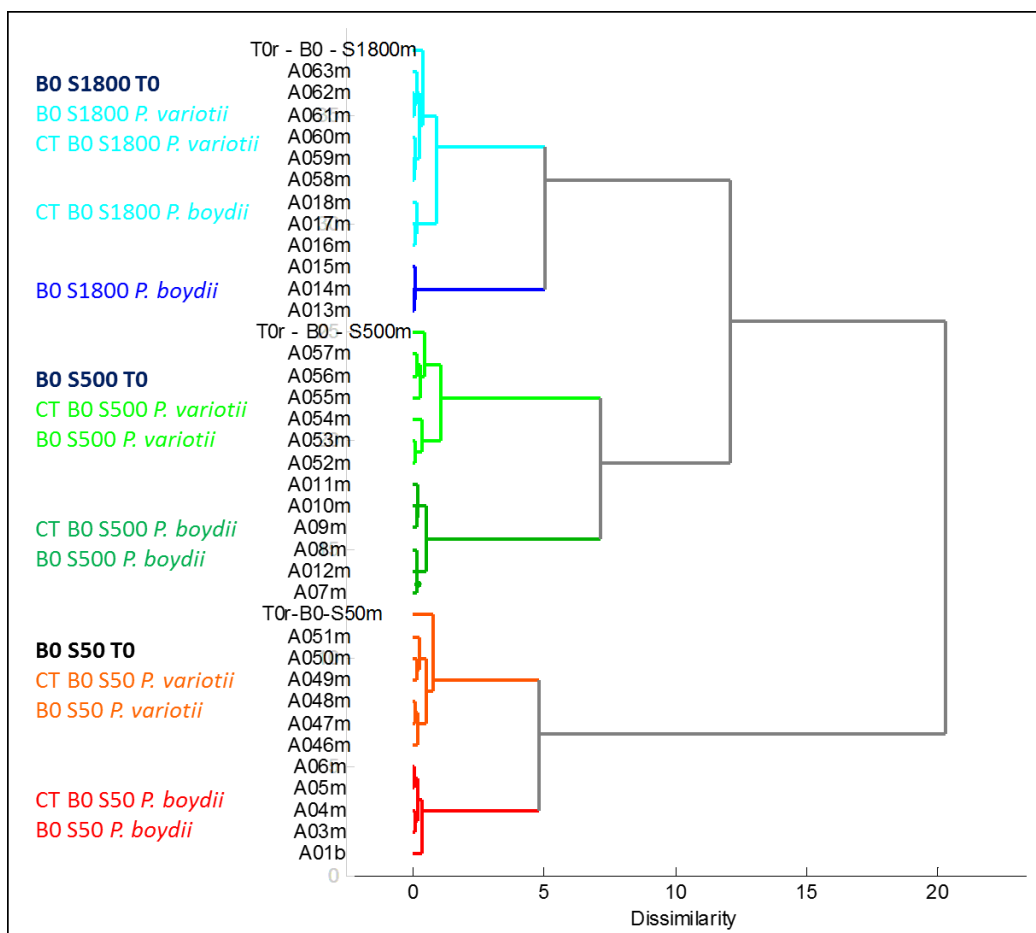


Figura 5. Dendrograma resultante dos espectros no infravermelho do diesel puro (B0) com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) com os fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* aos 14 dias de avaliação. T0: tempo zero; CT: controle estéril.

A degradação das cadeias carbônicas do diesel foi mais pronunciada pelo fungo *P. boydii* em todos os teores de enxofre corroborando com os resultados obtidos a partir do peso seco da biomassa (Figura 3), onde houve maior crescimento em relação a *P. variotii* embora essa diferença não tenha sido comprovada estatisticamente.

A partir dos dados obtidos no infravermelho foi realizado uma análise dos componentes principais (PCA) para verificar a tendência de degradação visualizada no dendrograma (Figura 5). Os resultados da PCA revelaram que o óleo diesel com S50, S500 e S1800 são de natureza molecular distintas, agrupando-se de acordo com o teor de enxofre (Figura 6). O óleo diesel com S50 e S500 mostrou um maior teor de cadeias ramificadas em função da similaridade com os controles (estéril) ou o diesel

puro no tempo zero. O óleo diesel S1800 apresenta produtos de degradação menos ramificados quanto *P. boydii* está presente no meio.

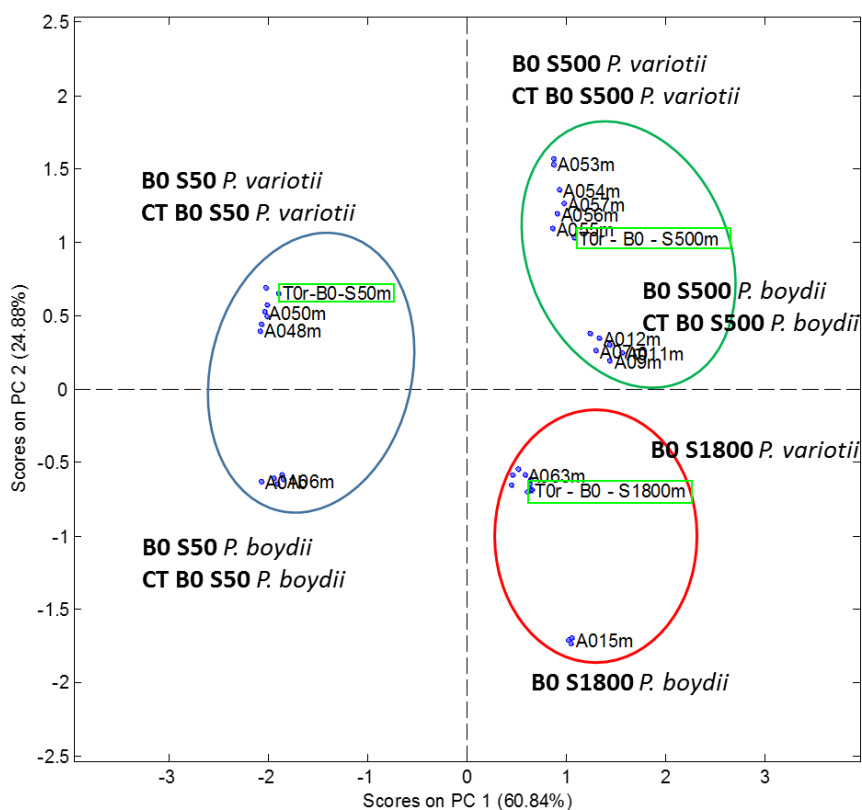


Figura 6. Análise do componente principal (PCA) obtido pela análise no infravermelho da fase oleosa do diesel puro (B0) com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800) e os fungos deteriorogênicos: *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* após o 14^o dia de armazenamento simulado. T0: tempo zero; CT controle estéril.

Nas análises de infravermelho para a mistura B10 foi verificado um padrão mais heterogêneo de distribuição dos grupos de acordo com o teor de enxofre comparados aos controles após 14 dias (Figura 7). No entanto, existe uma tendência de degradação de *P. boydii* em relação a *P. variotii* em todos os tratamentos, especialmente na mistura B10 S50. Esses resultados reafirmam o significativo crescimento de *P. boydii* observado na mistura B10 (Figura 4).

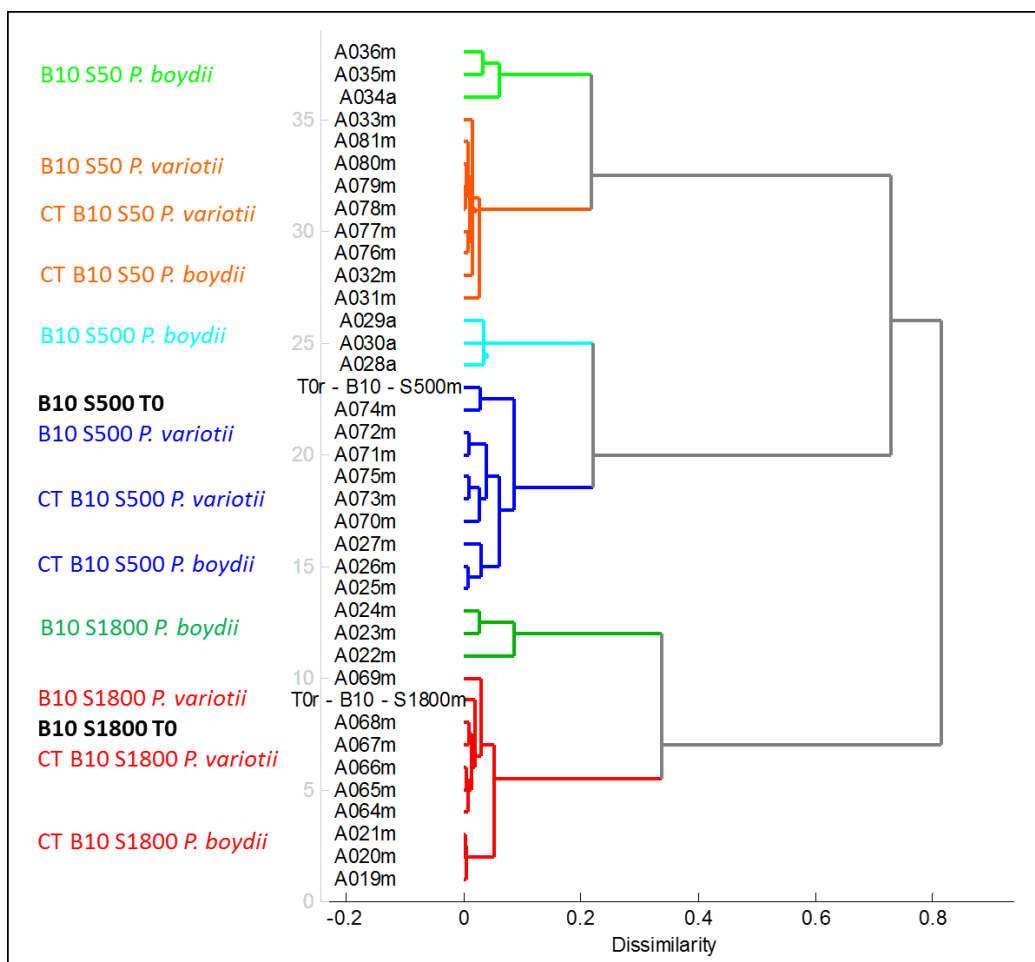


Figura 7. Dendrograma resultante dos espectros no infravermelho da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800) com os fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* aos 14 dias de avaliação. T0: tempo zero; CT controle estéril.

Na análise de PCA para as misturas B10 foram verificadas diferenças na composição molecular de acordo com os teores de enxofre (Figura 8) similarmente ao padrão observado no diesel puro (Figura 6). O fungo *P. boydii* mostrou potencial de biodegradação mais elevado em todos os teores de enxofre comparado a *P. variotii* que apresentou comportamento similar aos controles e a mistura B10 no tempo zero. Esses resultados complementam as análises de peso seco onde houve elevado crescimento de *P. boydii* (Figura 4).

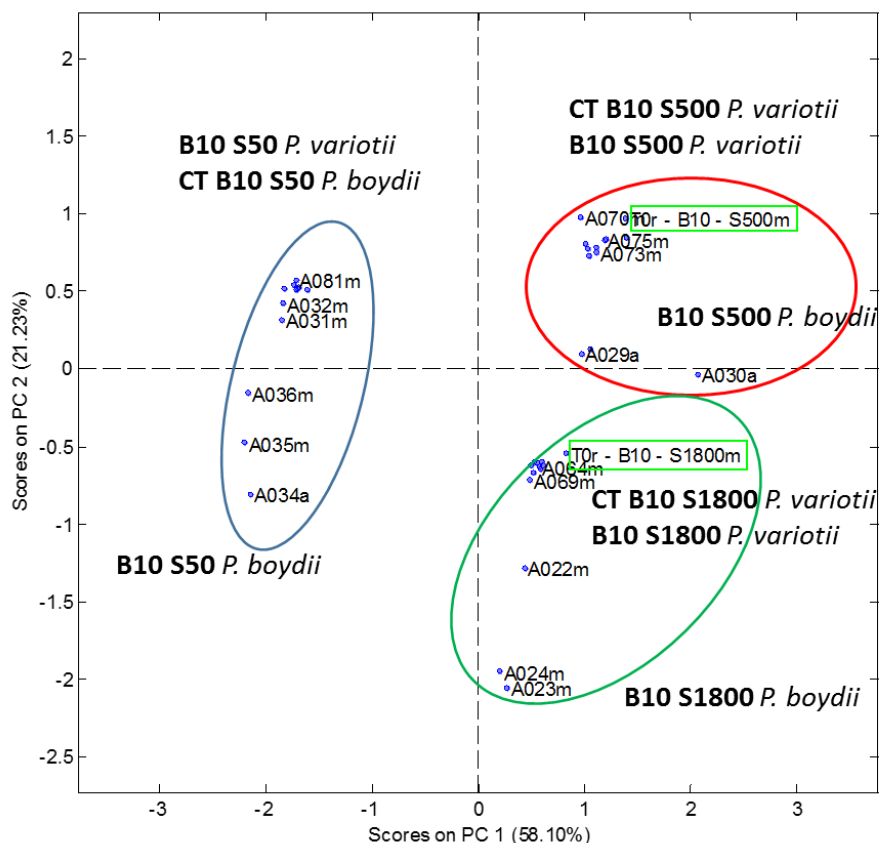


Figura 8. Análise do componente principal (PCA) obtido pela análise no infravermelho da fase oleosa da mistura B10 com diferentes teores de enxofre (S50, S500 e S1800) e os fungos deteriorogênicos: *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* no 14º dia de armazenamento simulado. T0: tempo zero; CT controle estéril.

A análise de RMN H^{-1} para o diesel puro e a mistura B10 evidenciou a presença de grupos etilênicos, metilênicos e aromáticos do diesel (Tabela 3). Foi possível identificar que, tanto no diesel puro quanto na mistura B10 com até 500 ppm de enxofre (S500), houve maior teor de compostos aromáticos comparados aos S50 e S1800. Esses resultados sugerem uma explicação para a baixa biodegradabilidade de S500 observada no diesel puro (Figura 5) e na mistura B10 (Figura 7), especialmente pelo fungo *P. variotii*.

Tabela 3. Áreas correspondentes aos distintos hidrogênios presentes no diesel puro e na mistura B10 com diferentes teores de enxofre após 14 dias.

Combustíveis	Áreas de hidrogênios aromáticos			
	E (-CH ₂ -)	M (-CH ₃)	Ar (A-H)	Ar/(M+E+A)
Diesel puro				
S50	0,4496	0,2991	0,0228	0,0295
S500	0,4363	0,2709	0,0275	0,0376
S1800	0,4687	0,2703	0,0203	0,0265
Mistura B10				
S50	0,4503	0,2791	0,0196	0,0260
S500	0,4325	0,2427	0,0256	0,0364
S1800	0,4379	0,2352	0,0161	0,0232

E, M e A representam os grupos etilênicos, metilênicos e aromáticos presentes no diesel.

É importante ressaltar que ambos os fungos foram inoculados sob as mesmas condições, em 10^5 esporos mL⁻¹, porém, apresentaram biomassas diferenciadas ao final de 14 dias de experimento (Figuras 3 e 4) sugerindo que a presença de biodiesel pode ter sido o responsável pelo aumento de biodegradabilidade da mistura B10. Sabe-se que o biodiesel é mais facilmente metabolizado que o diesel (Pasqualino et al., 2006; Sørensen et al., 2011; Bücken et al., 2014). A presença de ácidos graxos de cadeia longa e dois átomos de oxigênio ligados na porção terminal torna o biodiesel biologicamente ativo favorecendo o ataque de enzimas hidrolases (lipazes e esterases), as quais possuem um papel fundamental no início da degradação do biodiesel. Essas enzimas promovem a hidrólise do metil ou etil éster produzindo um ácido graxo e um álcool associado (Kouker & Jaeger, 1987; Zhang et al., 1998; Aarthy et al., 2014). Os ácidos graxos são prontamente oxidados durante a β -oxidação com sucessiva redução de dois átomos de carbono e incorporação no metabolismo respiratório ou nos lipídeos celulares. Por outro lado, a biodegradação do óleo diesel é mais complexa e distinta por ser constituído de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, sem o oxigênio

ligado a porção terminal, necessitando da expressão de enzimas como as oxigenases (mono e dioxigenases) (Zhang et al., 1998; Van Hamme, 2003).

A biodegradação em óleo diesel com diferentes teores de enxofre ainda é pouco abordada. De acordo com Londry & Suflita (1998), os compostos sulfurados podem inibir vários processos metabólicos nos microrganismos. A remoção desses compostos de enxofre no diesel pode facilitar o crescimento de bactérias responsáveis pela biocorrosão (Dodds et al., 2011; Srivastava & Nandan, 2012; Passman, 2012). Em outro trabalho, o metabolismo anaeróbio ocorreu independente da presença de enxofre no combustível naval (Lyles et al., 2013). Nesse estudo, foram avaliados fungos com comprovada capacidade deteriogênica em diesel (Bücker et al., 2011) e biodiesel (Cazarolli et al., 2014), os quais cresceram no microcosmos com o diesel puro e a mistura B10, mas sem diferença significativa entre os diferentes teores de enxofre, embora tenha sido observado pequenas variações de biomassa entre eles.

Srivastava & Nandan (2012), testaram diferentes concentrações de enxofre no diesel para verificar a influência na corrosão e no crescimento do fungo *Hormoconis resiniae*. O processo de remoção de enxofre remove compostos nitrogenados e oxigênio da molécula incorporando água. De acordo com os autores, esse processo facilita o desenvolvimento microbiano pela presença de partículas de água e redução da acidez. Da mesma forma, os níveis elevados de enxofre favorecem a acidez do combustível promovendo a corrosão ácida, porém limita o crescimento microbiano. Passman (2012), menciona que o processo de dessulfurização também diminui o conteúdo de aromáticos facilitando a biodegradabilidade do combustível. Em outro trabalho, a redução dos níveis de enxofre permitiu o aumento da atividade microbiana em misturas de diesel B5, B10 e B20 (Dodds et al., 2011).

As variações nos teores de enxofre, observadas nos combustíveis listados na Tabela 1, são resultantes do grau de dessulfurização requerida pela legislação e variam conforme a origem da matéria-prima. No entanto, mesmo com pequenas oscilações de valores pela análise das distintas empresas, todos os combustíveis encontram-se em conformidade com os valores máximos de enxofre para cada categoria, conformidadea resolução ANP 65/2011.

Os dados obtidos nesse trabalho fornecem indícios de que *P. boydii* pode ter sido favorecido pelo tipo de combustível avaliado. No diesel puro o valor da biomassa produzida por *P. boydii* foi cerca de duas vezes e na mistura B10 quatro vezes o valor de biomassa produzida por *P. variotij*, utilizando o mesmo número de

esporos iniciais. O fungo *P. variotii*, no entanto, produziu uma média de 20 mg mL⁻¹. Esses resultados sugerem que diferentes competências enzimáticas estão envolvidas na conversão dos substratos óleo diesel e biodiesel, pelos fungos avaliados, na medida em que a biomassa foi distinta para cada um deles e sem correlação com a presença de enxofre (Figuras 3 e 4). *P. boydii* apresentou significativa produção de biomassa na mistura B10 e maior tendência de degradação comparada a *P. variotii*, esse fato pode estar relacionado com a capacidade desse fungo em produzir a enzima lipase corroborando com os dados de Cazarolli e colaboradores (2014), que observaram a indução de atividade lipolítica de *P. boydii* em contato com biodiesel de diferentes matérias-primas.

O óleo diesel é mais complexo quimicamente que o biodiesel e a origem do petróleo, assim como o processo de refino influenciam na composição e propriedades de seus derivados fósseis (Srivastava & Nandan, 2012). De acordo com Mayer (2000), a estrutura e propriedades físico-químicas dos combustíveis podem ser determinantes no grau de biodegradabilidade, tais como os efeitos estéricos e eletrônicos. Os efeitos estéricos envolvem a extensão na qual os grupos substituintes ou a presença de ramificações na molécula do combustível pode comprometer o reconhecimento pelos sítios ativos das enzimas degradadoras e a velocidade da degradação.

Observando os nossos resultados de RMN H⁻¹ foi possível constatar diferenças nos combustíveis utilizados que foram classificados de acordo com os diferentes teores de enxofre. A condição que apresentou menor biodegradabilidade, devido às ramificações ou a presença de compostos aromáticos foi o diesel S500, seguido de S50 e S1800. A baixa produção de biomassa constatada no diesel puro S500 pode estar relacionada com a presença de moléculas com um maior número de ramificações. As ramificações ou grupos funcionais podem também afetar o transporte do substrato através da membrana celular, especialmente se o transporte é mediado por enzimas transmembrânicas (Maier, 2000). No caso de B10 S500, a adição do biodiesel pode ter facilitado a biodegradação da mistura por cometabolismo (Pasqualino et al., 2006).

4.4 Conclusões

Baseado no conjunto de análises obtidas a partir desse experimento de estocagem simulada com o diesel puro e a mistura B10 e os diferentes teores de enxofre (S50, S500, S1800), utilizando dois fungos deteriorogênicos, avaliados quanto a capacidade biodegradadora em 14 dias foi possível concluir que:

- *Pseudallescheria boydii* apresentou maior crescimento e capacidade biodegradadora que *Paecilomyces variotii* nas misturas B10.
- O diesel puro S1800 sofreu maior degradação do que S50 e S500.
- Tanto o diesel puro S500 quanto a mistura B10 S500 apresentaram menor biodegradabilidade, atribuída ao maior teor de cadeias ramificadas e teor de hidrocarbonetos aromáticos.
- Os diferentes teores de enxofre possuem distintas características moleculares que podem estar correlacionados com a origem da matéria-prima e o processo de dessulfurização, os quais podem definir o grau de biodegradação.

Agradecimentos

O financiamento desse projeto foi concedido pela CNPq e CAPES/FAPERGS. Agradecemos também a Ipiranga Produtos de Petróleo S/A pelo fornecimento dos combustíveis e suporte técnico.

Referências

- Aarthy M, Saravanan P, Gowthaman MK, Rose C, Kamini NR. 2014. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. Chem Eng Res Des. 92:1591-691.
- ASTM D5453-16 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Determination of Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Spark Ignition Engine Fuel, Diesel Engine Fuel, and Engine Oil by Ultraviolet Fluorescence**. 2016. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2016. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D5453>. Acesso em: 29 Ago 2016.
- ASTM D4294-16e1 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Sulfur in Petroleum and Petroleum Products by Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry**. 2016. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2016. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D4294>. Acesso em: 29 Ago 2016.

- ASTM D7039-15a - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Sulfur in Gasoline, Diesel Fuel, Jet Fuel, Kerosine, Biodiesel, Biodiesel Blends, and Gasoline-Ethanol Blends by Monochromatic Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry**. 2015. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2015. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D7039>. Acesso em: 29 Ago 2016.
- Bento FM, Beech IB, Gaylard CC, Englert GE, Muller IL. 2005. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World J Microbiol Biotechnol*. 21(2):135-42.
- Bento FM, Englert GE, Gaylarde CC, Muller IL. 2004. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. *Mater Corros*. 55(8): doi 10.1002/maco.200303772.
- Bento FM, Gaylarde CC. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. *Int Biodeter Biodegr*. 47:107-12.
- Bücker F, Barbosa CS, Quadros PD, Bueno MK, Fiori P, Huang C, Frazzon APG, Ferrão MF, Camargo FAO, Bento FM. 2014. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int Biodeter Biodegr*. Doi 10.1016/j.ibiod.2014.05.030.
- Bücker F, Santestevan N, Jacques RJS, Peralba MCR, Camargo FAO, Gaylarde CC, Bento FM. 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int Biodeter Biodegr*. 65(1):172-78.
- Bushnell LD, Haas HF. 1941. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *J Bacteriol*. 41(5):653-73.
- Cazarolli JC, Bücker F, Manique MC, Krause LC, Maciel JPS, Onorevoli B, Caramão EB, Cavalcanti EHS, Samios D, Peralba MCR, Bento FB. 2012. Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*. *R bras Bioci*. 10(3):251-57.
- Cazarolli JC, Guzatto R, Samios D, Peralba MCR, Cavalcanti EHS, Bento FM. 2014. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int Biodeter Biodegr*. 95:1-9. Doi 10.1016/j.ibiod.2013.09.025.
- Das N, Chandran P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int*. Article ID 941810. 13p. Doi 10.4061/2011/941810.
- Dodos GS, Konstantakos T, Longinos S, Zannikos F. 2011. Effects os microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Proceedings of the 12th International Conference Science and Technology**, 8-10 September. Rhodes/Greece. p. A431-39.

- Dunn RO. 2011. Fuel Properties of Biodiesel/Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) blends. *J Am Oil Chem Soc.* 88:1977-87.
- Gassen J, Bento FM, Frazzon APG, Ferrão MF, Marroni IV, Simonetti AB. 2015. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. *Braz J Biol.* 75(3):541-47.
- Gaylarde CC, Bento F, Kelley J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Braz J Microbiol.* 30:1-10.
- Hanson KG, Desai JD, Desai AJ. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol Tech.* 7(1):745-48.
- Knothe G, Steidley KR. 2005. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity. *Energ Fuel.* 19:1192-1200.
- Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Appl Environ Microb.* 53(1):211-13.
- Lee JS, Ray RI, Little BJ. 2010. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling.* 26(6):623-35.
- Lei 13.263.** 2016. DOU 24.03.2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=24/03/2016>. Acesso em: 27 maio 2016.
- Lôbo IP, Ferreira SLC. 2009. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim Nova.* 32(6):1596-608.
- Londry KL, Suflita JM. 1998. Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism. *Environ Toxicol Chem.* 17(7):1119-1206.
- Lyles CN, Aktas DF, Duncan KE, Callaghan EV, Stevenson BS, Suflita JM. 2013. Impact of Organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environ Sci Technol.* 47:6052-62.
- Maier RM. 2000. Microorganisms and Organic Pollutants. In: **Environmental Microbiology**, Academic Press/San Diego. p. 363-402.
- Pasqualino JC, Montané D, Salvadó J. 2006. Syntetic effects os biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass Bioenerg.* 30:874-79.
- Passman FJ. 2012. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - A review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 81:88-104.
- Passman FJ, Dobranick JK. 2005. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. **Proceedings of the 9th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels - IASH.** Sidges/Spain. p. 18-22.

Regulamento Técnico ANP 4/2012. **Parte integrante da Resolução 14 de 11.5.2012 da Agência Nacional do Petróleo - ANP.** DOU 18.5.2012. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Regulamento Técnico ANP 8/2011. **Parte integrante da Resolução 65 de 9.12.2011 da Agência Nacional do Petróleo - ANP.** DOU 12.12.2011. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 50. 2013. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 50 de 23.12.2013.** DOU 24.12.2013. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 65. 2011. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 65 de 9.12.2011.** DOU 12.12.2011. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Sørensen G, Pedersen DV, Norgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. 2011. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresource Technol.* 102:5259-64.

Srivastava NK, Nandan NK. 2012. Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. *IJEPR.* 1(1):119-25.

Stanislaus A, Marafi A, Rana SM. 2010. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal Today.* 153:1-68.

Tyagi OS, Atray N, Kumar B, Datta A. 2010. Production, Characterization and Development of Standards for Biodiesel - A Review. *Mapan-J Metrol Soc I.* 25(3):197-218.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol R.* 67(4):503-49.

Yemashova NA, Murygina VP, Zhukov DV, Zakharyantz AA, Gladchenko MA, Appanna V, Kalyuzhnyi SV. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 6:315-37.

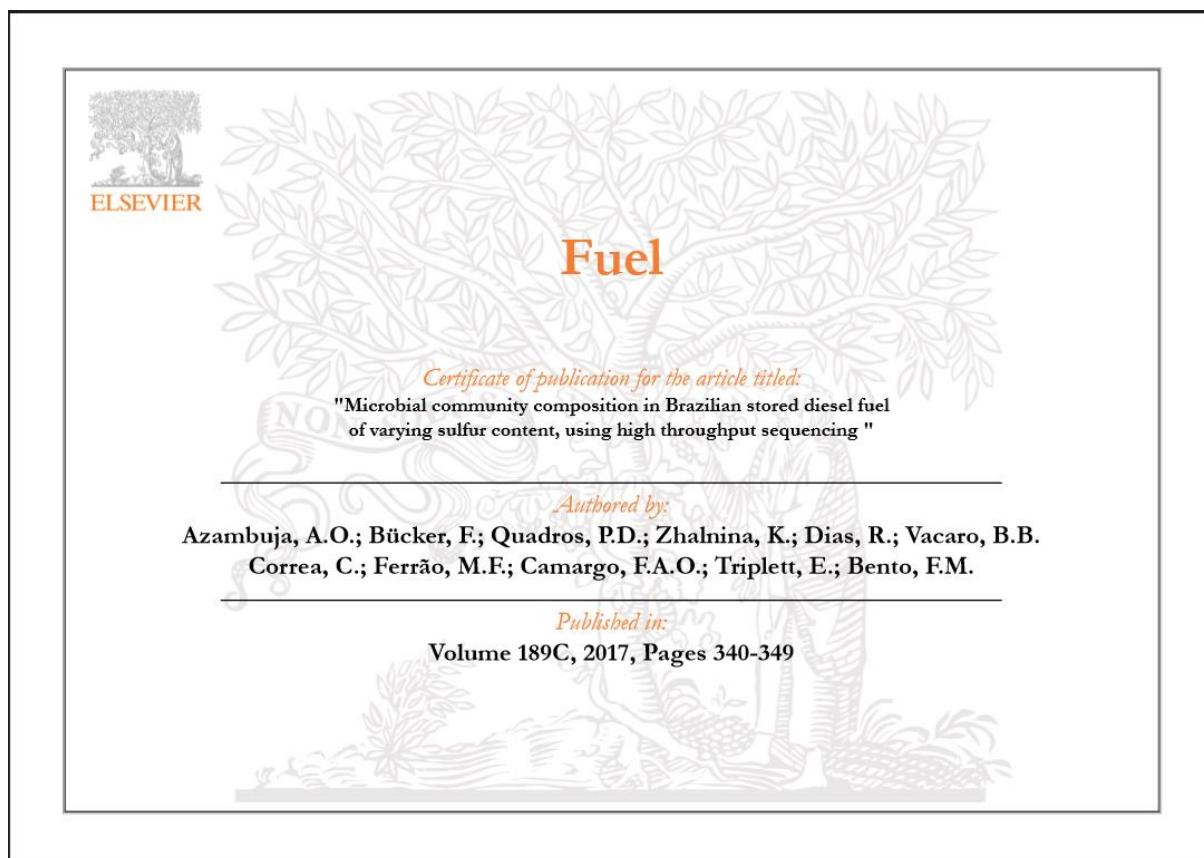
Zhang X, Peterson CL, Reece D, Mbller G, Haws R. 1998. Biodegradability of biodiesel in the environment. *Trans ASAE.* 41:1423-30.

5. CAPÍTULO 2.

MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION IN BRAZILIAN STORED DIESEL FUEL OF VARYING SULFUR CONTENT, USING HIGH THROUGHPUT SEQUENCING.

O artigo desse capítulo foi publicado na revista **Fuel** (ISSN 0016-2361) e está formatado conforme a suas normas.

DOI 10.1016/j.fuel.2016.10.108



MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION IN BRAZILIAN STORED DIESEL FUEL OF VARYING SULFUR CONTENT, USING HIGH THROUGHPUT SEQUENCING.

Aline Oliboni de Azambuja^{a*}; Francielle Bücken^a, Patrícia Dörr de Quadros^a, Kateryna Zhalnina^d; Raquel Dias^d; Bernardo Brito Vacaro^b; Camila Correa^b; Marco Flôres Ferrão^b, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo^c; Eric Triplett^d; Fátima Menezes Bento^a

^a Fuels and Biofuels Biodeterioration Laboratory (LAB-BIO), Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul. Sarmiento Leite # 500 Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Department of Inorganic Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves Avenue # 9500 Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Department of Soil Science, Federal University of Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves Avenue # 7712 Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Department of Microbiology and Cell Science, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, United States of America.

*corresponding author

Tel: +55 51 91246674

E-mail: alineoliboni@gmail.com

Highlights

The highest interfacial biomass was detected in UHSD during simulated storage.

Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Ascomycota were the most abundant phyla.

Bacterial diversity is inversely proportional to the sulfur content in diesel fuel.

NMR spectroscopy revealed higher branching in the hydrocarbon chains of ULSD.

Reduction of sulfur in diesel fuel per se do not increase microbial contamination.

Abstract

The reduction of sulfur content in diesel is a worldwide trend that seeks to minimize the environmental impact arising from the combustion of this fuel in large cities. However, there is no reliable information on the effect of such a reduction on the formation of mainly aerobic microbial biomass in vehicle and storage tanks. The objective of this study was to assess the microbial community structure using next generation sequencing technique, and to evaluate the microbial biomass in pure diesel containing various sulfur concentrations. Storage conditions were simulated in glass flasks containing mineral medium and pure diesel, with varying sulfur content: UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur); LSD (≤ 50 ppm sulfur) and ULSD (≤ 10 ppm sulfur). Were assessed two microbial contamination levels in the diesel: low contamination ($\sim 10^3$ CFU L⁻¹) and medium contamination ($\sim 10^5$ bacterial cells and fungal spores mL⁻¹). The flasks were incubated at 30 °C and monitored every 10 days over 40 days. Microbial biomass formation was observed in all microcosms, but the highest biomass level at all times was in UHSD with medium contamination ($p < 0.05$). Results from biomass production and proton nuclear magnetic resonance showed that the ULSD was not prone to microbial contamination probably because has highly branched carbon chain. Overall, 36 different phyla were identified by sequencing of 16S rDNA and four by 18S rDNA, with Firmicutes (~ 49 %), Bacteroidetes (~ 25 %), Actinobacteria (~ 17 %) and Ascomycota (> 99 %) being the most abundant. Results suggested that bacterial diversity is increased when low sulfur concentrations are present. Our results reveal a complex microbial diversity from 16S rDNA and confirm the existence of the major fungal Phyla (Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota and Glomeromycota) with a large fraction of microorganisms as yet undescribed, reinforcing the importance of understanding the fuel environment in establishing control methods of microbial growth in storage tanks and in bioremediation programs for environments contaminated by fuel.

Keywords: ULSD, sulfur content, storage, high-throughput sequencing analysis, microbial community.

5.1 Introduction

Over the last decades problems related to the deterioration of fuels and fuel systems have increased significantly [1-3]. Diesel oil has been found to suffer many alterations in fuel chemistry and the suppliers, distributors, filling stations and the final consumers have to learn how to deal with these problems. The introduction of biodiesel and the reduction in sulfur content have brought both benefits and challenges [1, 4, 5]. The sulfur content of diesel fuel has been reduced to ultra-low levels by environmental regulations in many countries (Japan, European Union, United States, Brazil). Regulations mandate that diesel fuels must contain ≤ 15 ppm of sulfur (ULSD), with the aim of reducing harmful emissions and improving air quality [1, 5-9].

The removal of sulfur (desulfurization) can cause other physical changes to the chemical composition and properties of the fuel. Removal of sulfur and other compounds decreases fuel conductivity, changing properties such as lubricity, density and viscosity [10, 11]. Additives are regularly used and recommended to improve fuel performance and the blending of ULSD with biodiesel to improve lubricity is common [1, 5, 8, 12]. Certain organosulfur compounds are known to have antimicrobial property [13], hence its presence can help to control the reproduction and growth of microorganisms in fuel storage tanks and systems. Londry & Suflita [14] found that thiophenes, thiols, thiophenic acids and aromatic sulfides, present in high sulfur diesels, could inhibit a variety of metabolic processes in anaerobic cultures enriched from an oily sludge. According to the literature, the desulfurization process alters the properties of diesel fuel in ways that could potentially impact its biological stability, increasing microbial contamination in tanks. It has been postulated that the removal of the sulfur and phenolic compounds may turn low sulfur diesel more biodegradable, producing an ideal condition for microbial growing [8, 12, 15-18]. Some studies using anaerobic microorganisms have been published, showing the relationship between diesel fuels, their biodegradation and sulfur content [5, 8, 19]. However, the impact of the aerobic microbial population (filamentous fungi, yeast and bacteria) on biodeterioration of diesel of varying sulfur content has been little investigated [15, 18]. We evaluated the susceptibility of pure diesel containing various sulfur contents: UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur); LSD (≤ 50 ppm sulfur) and ULSD (≤ 10 ppm sulfur) to microbial growth.

5.2. Materials and Methods

5.2.1 Fuels and sulfur content evaluation

Fuels were named according to sulfur content for each category: ultra high sulfur diesel - UHSD \leq 1800 ppm sulfur (actual level 1366 ppm S); high sulfur diesel - HSD \leq 500 ppm sulfur (actual level 408 ppm S); low sulfur diesel - LSD \leq 50 ppm sulfur (actual level 7.1 ppm S) and ultra low sulfur diesel - ULSD \leq 10 ppm sulfur (actual level 4.6 ppm S). Fuels, without additives, were provided by Ipiranga Petroleum Products (Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil). The sulfur content of each fuel at time zero was determined by three external laboratories in Brazil (Figure S1), using mainly the standard test method ASTM D5453 -12 [20] and after 40 days in all treatments with two microbial contamination levels (low and medium) and controls (Figure S2) were analyzed according to ASTM D5453 -12 [20].

5.2.2 Microbial contamination

Simulated storage conditions were evaluated at two microbial contamination levels. The **low level** of contamination was the fuel as received from the distributor without sterilization. This is considered as natural microbial contamination ($\sim 10^3$ CFU L⁻¹), as expected in a storage tank [21]. The **medium level** of contamination was produced by filter sterilization (Millipore, nitrocellulose filter, pore size 0.22 μ m) of the fuel and addition of a acclimated mixture of uncharacterized microorganisms obtained from diesel HSD (\leq 500 ppm sulfur) and blends of diesel and biodiesel B4 / B5, as detailed in ASTM E 1259-10 [22] with some modifications. Briefly, 5 mL of uncharacterized inoculum was added to 100 mL of Bushnell-Haas sterile mineral medium (g L⁻¹: 1.0 KH₂PO₄; 1.0 K₂HPO₄; 1.0 NH₄NO₃; 0.2 MgSO₄; 0.05 FeCl₃; 0.02 CaCl₂; pH 7.2) [23] supplemented with 2% of pure diesel \leq 50 ppm sulfur, and incubated at 30 ° C, 180 rpm for 7 days. The inoculum was diluted 1:100 in 0.85 % saline solution and adjusted to a final concentration of approximately 10⁵ bacterial cells and fungal spores mL⁻¹.

5.2.3 Simulated storage

The simulated storage was performed in 100 mL glass flasks, with plastic screw cap. In 40 mL of pure diesel with different sulfur contents, it was added 10 mL of sterile Bushnell-Haas mineral medium [23] to simulate the water phase (Figure 1). Destructive microcosms sampling was carried out in six replicates every 10 days, during 40 days for each sulfur content (ULSD; LSD; HSD, and UHSD) and each

contamination levels (low and medium), giving a total 144 experimental bottles including controls (sterile water and oil phase). The flasks were incubated at 30 °C in the dark, to prevent the fuel photo oxidation. Measurements for analyzing pH, microbial biomass and oil degradation were performed in triplicate. The other three replicates were used for DNA extraction.”

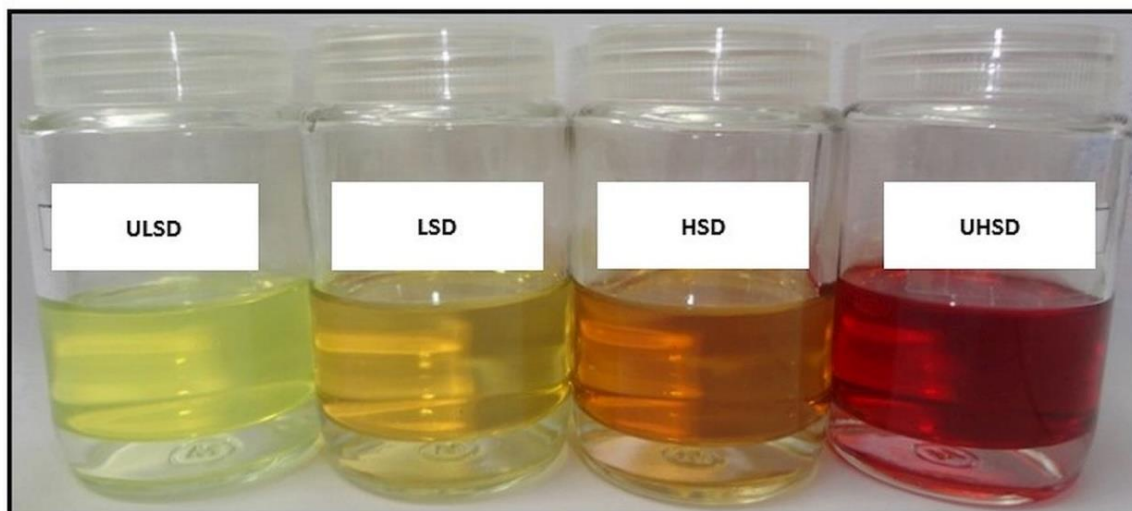


Figure 1. Microcosms simulating storage of diesel oil of varying sulfur content (ULSD \leq 10 ppm sulfur; LSD \leq 50 ppm sulfur; HSD \leq 500 ppm sulfur and UHSD \leq 1800*).

** In Brazil, in 2013 the UHSD was identified by addition of a red dye. Nowadays, HSD receives the red dye.*

5.2.4 Water phase analysis

The pH measurements were determined in the triplicates for each sulfur content and as received and contaminated treatments, as well controls at 10, 20, 30 and 40 days using universal pH strips (Marcherey-Nagel).

5.2.5 Oil-water interface analysis

5.2.5.1 Biomass

After 10, 20, 30 and 40 days, triplicates of the interfacial biomass from each sulfur content, as received and contaminated treatments, including the controls, was assessed by gravimetric measurements, filtering through previously weighed filter paper discs (Qualy, cellulose filter, 14 μ m pore size). To remove adhered fuel from the biomass, discs were washed with 4 mL of hexane. They were then placed at 30 °C for 48 h and transferred to a dehydrating chamber for 24 h to remove water and the dry weight was then recorded. Biomass was calculated as final weight minus initial weight (mg); triplicate values were averaged.

5.2.5.2 DNA extraction

Genomic DNA was extracted from microbial biomass. It was performed only in contaminated treatment ($\sim 10^5$ bacterial cells and fungal spores mL^{-1}), for all sulfur content from destructive triplicates at 10, 20, 30 and 40 days. The as received condition ($\sim 10^3$ CFU L^{-1}) did not produce enough biomass for DNA extraction, and the uncharacterized inoculum at time zero did not produce DNA of sufficient quality or quantity to be used on next generation sequencing. The biomass from the interfacial region was harvested by filtration (Qualy, cellulose filter, 14 μm pore size) and the biomass from the aqueous phase recovered on sterile nitrocellulose membranes (Millipore, 0.22 μm pore size). DNA was extracted using PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories, USA), according to the manufacturer's instructions, modified as described by Silva et al. [24]. Each triplicate was used to extract DNA and the resultant extracts pooled in a single tube for each time and for each sulfur content [25]. The purity of the extracted DNA was checked using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and quantified with a Qubit 2.0 fluorometer, using the dsDNA BR Assay kit (Invitrogen), according to the manual.

5.2.5.3 Analysis of the microbial community by high throughput sequencing

The bacterial and archaeal V4 region of 16S rRNA genes was amplified using the universal prokaryotic primers 515F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') [26] with the addition of a barcoded sequence and the required Illumina adapters. PCR reactions were carried out with the GoTaq PCR core system (Promega, Madison, WI, USA). The mixtures contained 5 μL of 10X PCR buffer, 200 mM dNTPs, 100 mM of each primer, 2.5 U of Taq polymerase and approximately 100 ng of DNA template in a final volume of 50 μL . The PCR was performed at an initial denaturation temperature of 94 °C for 3 min, followed by 20 cycles at 94 °C for 45 s, at 53 °C for 30 s, and at 65 °C for 90 s. A final elongation step at 65 °C was performed for 10 min.

Universal fungal primers were used nu-SSU-0817-5' (TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA) and nu-SSU-1196-3' (TCTGGACCTGGTGAGTTTCC) [27] with the addition of a barcoded sequence and the required Illumina adapters. PCR reactions for Fungi were carried out with the same

solution GoTaq PCR core system (Promega, Madison, WI, USA) and volumes used for 16S. The PCR was performed at an initial denaturation temperature of 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 45 s, 56 °C for 50 s, and 72 °C for 90 s. A final elongation step at 72 °C was run for 5 minutes. Sequencing was performed on a genome analyzer Illumina GAIIx (Illumina, Inc., CA, USA) with two paired-end read cycles of 101 bases each.

The raw reads were split by barcode and the first 12 bases corresponding to the barcode regions were trimmed using FASTX-Toolkit [28]. Paired reads were merged using a custom script (source available at https://github.com/Bioinfo-Tools/merge_fastq_files.pl). Reads were filtered by quality, using 70% as minimum percentage of bases with good quality, considering 20 as the minimum quality score in Phred + 33 encoding. Filtered reads were classified using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [29] against the SILVA ribosomal database (<http://www.arb-silva.de>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2175337/>). For performing this step, reads were converted from FASTQ to FASTA format using FASTX-Toolkit, and MPI-blastn, a parallel version of nucleotide BLAST, was used for minimizing the execution time [MPI-blastn and NCBI-TaxCollector] [30].

Full taxonomic descriptions based on the SILVA database were generated using SILVA-taxcollector (source available at https://github.com/Bioinfo-Tools/merge_fastq_files.pl). Matches were filtered at 80 % length fraction and classified at the 80 % identity level for Domain and Phylum; the 90 % identity level for Class, Order, and Family; the 95 % identity level for Genus; and the 99 % identity level for Species. The total number of pairs matching 16S and 18S rRNA sequences in the database at each level of similarity created an Operational Taxonomic Unit (OTU) abundance matrix for each level of taxonomy across samples. Filtered abundances and OTU abundance matrix were generated using modified Megaclust and Megaclustable scripts (source code available at <https://github.com/Bioinfo-Tools/PANGEA-plus>) [31].

Nucleotide Sequence Accession Numbers: The sequences obtained were deposited in the GenBank database with the following NCBI SRA Study accession: PRJNA294713.

5.2.6 Oil phase analysis

5.2.6.1 HATR-FTIR

Triplicate samples of the oil phase from each treatment were analyzed by FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). This standard method is based on the use of the band related to the vibrational mode of the carbonyl group in esters. As for diesel, FTIR spectra were obtained using the Spectrum 400 Perkin Elmer spectrophotometer equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector and a horizontal attenuated total reflectance (HATR) accessory with zinc selenide crystal (ZnSe). Duplicate spectra were collected from 650 to 4,000 cm^{-1} at room temperature. The optical resolution of the IR spectra was 4 cm^{-1} and 16 scans were accumulated for each spectrum. Background spectra in air were obtained for every sample immediately before collecting the sample spectrum. The data were pre-processed by the mean centering method. IR data were subsequently analyzed by Hierarchical Cluster Analysis (HCA) in the spectral region from 1800 to 650 cm^{-1} using MATLAB 7.11 (The Mathworks), and PLS-Toolbox 6.0 software (Eigenvector Research).

5.2.6.2 ^1H NMR

According to the results, triplicates of 40 days samples from the lower and upper limits of sulfur content were selected. ULSD and UHSD were analyzed using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) employing a device of variance INOVA 300, 300 MHz. An aliquot of approximately 15 mg of each diesel sample was solubilized in 550 μL chloroform -D 99.8 % (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), and spectra were acquired at 90° , and pulse time of 10 s relaxation. The signs referring to aromatic hydrogens, ethylene and methylene were integrated and compared.

5.2.7 Statistical analysis

The results of biomass were analyzed by ANOVA with a confidence level of 95 %, and, if they were significant, the Tukey test was applied using the program XLSTAT-Pro 2014. Principal component analysis (PCA) was used to determine the relationship between different sulfur contents, pH, biomass and OTU abundances. Spearman correlations for non-normally distributed data were used to evaluate the correlation between sulfur content and relative abundance of Phylum using the program XLSTAT-Pro 2014. The diversity of the microbial community was estimated by the Shannon diversity index (H') using the package R (version 3.1.1; 2014).

5.3. Results and Discussion

5.3.1 Microbial growth and sulfur content

Figure 2 presents the average weights of interfacial biomass produced during storage of diesel of varying sulfur content for 10, 20, 30 and 40 days. In as received condition (low number of native microorganisms), biomass values were lower than 12 mg at all times independent of sulfur content and there was no significant difference from controls ($p > 0.05$). However with the addition of the uncharacterized inoculum (medium level of contamination), the lowest biomass (day 10) was around 7 mg and at 40 days the highest value of 48 mg was recorded.

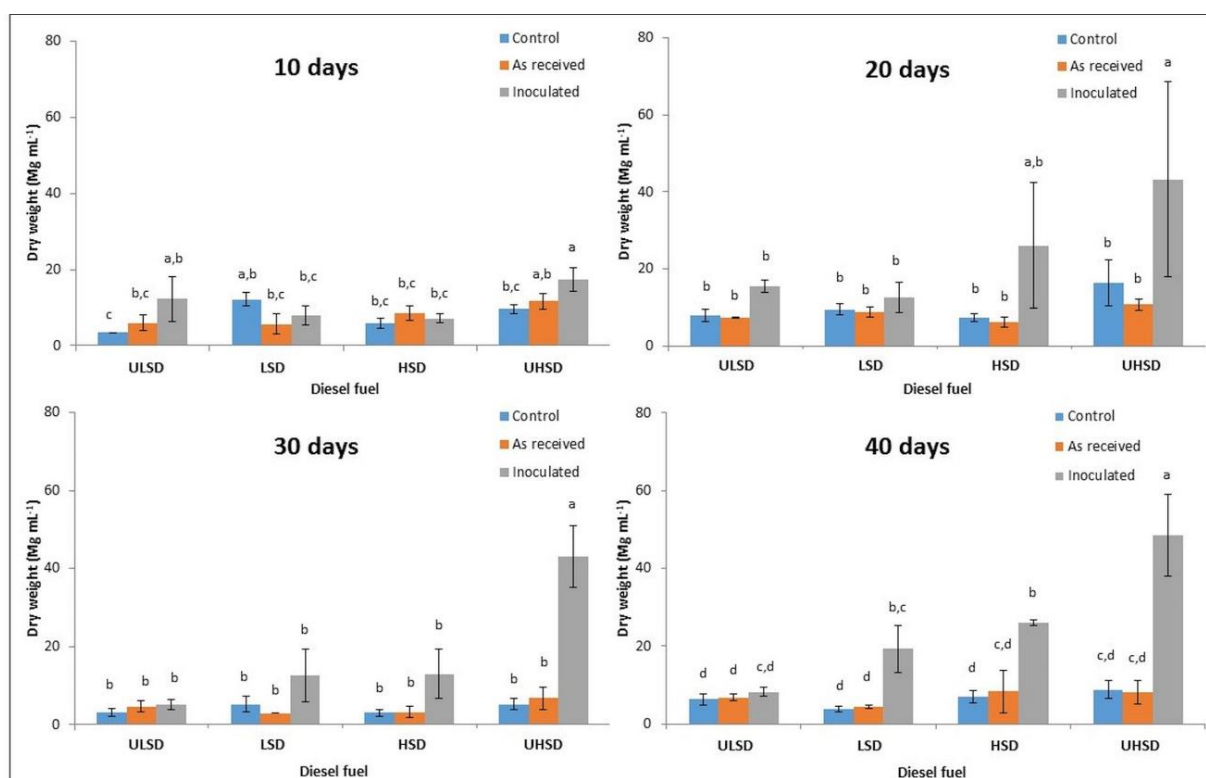


Figure 2. Interfacial biomass formed in diesel with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); LSD (≤ 50 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur), in the control (sterile), as received and inoculated (ASTM E1259-10) treatments during simulated storage for 10, 20, 30 and 40 days.

Means followed by the same letter do not differ at 5 % probability by Tukey test.

The greatest microbial biomass was formed in UHSD at all times and it was statistically significant compared to controls ($p < 0.05$). At 40 days, the sulfur content in diesel fuel were directly proportional to biomass production, where ULSD showed the lowest value (8 mg) followed by LSD, HSD and UHSD with 19 mg, 26 mg and 48 mg, respectively, these being significantly higher than the controls and as received

condition ($p < 0.05$). The dry weight was obtained by recovering all the biomass contained in the water phase and interface the microcosms in paper filter membranes (see Materials and Methods) followed by addition of hexane to remove residual oil phase. However a little oily residue could remain attached to the membranes. This may explain why some biomass values in controls were similar to those from as received samples, even though no turbidity (indicative of microbial growth) was observed in the water phase.

The pH of the water phase in as received and inoculated treatments were not significantly different ($p > 0.05$) between the diesel LSD, HSD and UHSD over time compared to controls (sterile); however inoculated ULSD showed a little variation of pH ($p < 0.05$) between days 10 and 40 (pH 6-5) compared to controls in the same period (pH 7-6).

5.3.2 Microbial community composition determined by high throughput sequencing analysis

The DNA of the biomass (~ 10 ng per DNA/ μ L) formed at the oil/water interface of all microcosms was sequenced. A total of 3,326,894 sequences of 16S rDNA and 3,469,796 sequences of 18S rDNA (raw reads) were obtained.

5.3.2.1 Analysis of 16S rRNA gene

The number of sequences obtained after sequence processing in each biomass formed at the oil-water interface and water phase from microcosms with diesel sulfur contents ULSD, LSD, HSD and UHSD can be visualized in the Table S1. Within the classified reads, a total of 36 Phyla; 44 Classes; 85 Orders; 182 Families and 1.157 Genera.

The 5 most represented phyla from 16S rDNA ($\geq 1\%$) profile were: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria and Armatimonadetes with over 97 % of the classified microbial community. Phyla with less than 1 % were classified as others and represented in a small portion (Figure 3). Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria contains microorganisms that have been isolated or described as diesel and biodiesel blends contaminants [1, 25, 32-36]. Armatimonadetes was considered as a novel Phylum, but also strongly correlated with Actinobacteria, Chloroflexi and Cyanobacteria phyla [37]. Representatives of this Phylum have various preferred habitats, but it also has been associated with soil affected by petroleum hydrocarbons [38].

The most prevalent phyla were found in all different sulfur contents treatments, but with some variations in relative abundance over time. The UHSD that showed significant microbial biomass ($p < 0.05$) compared to controls at all times (Figure 2), had the highest prevalence of Phylum Bacteroidetes (~ 45 %), Actinobacteria (~ 27 %) and Firmicutes (~ 17 %) in 40 days. However, at 10, 20 and 30 days of simulated storage, Firmicutes was the most abundant with relative abundance of ~ 60, ~ 39 and ~ 57 %, respectively (Figure 3). Contrasting with this data, ULSD was characterized in this study at 30 and 40 days as having the lowest biomass (Figure 2); the most representative Phyla in this diesel in 40 days were Firmicutes and Bacteroidetes, representing respectively ~ 66 % and ~ 26 % of relative abundance (Figure 3). Sequences from the archaeal phyla Euryarchaeota, Thaumarchaeota and Crenarchaeota were detected at all sulfur contents in diesel oil but in very low abundance (< 0.01 %). Euryarchaeota and Crenarchaeota were also described in the blend B10 [25].

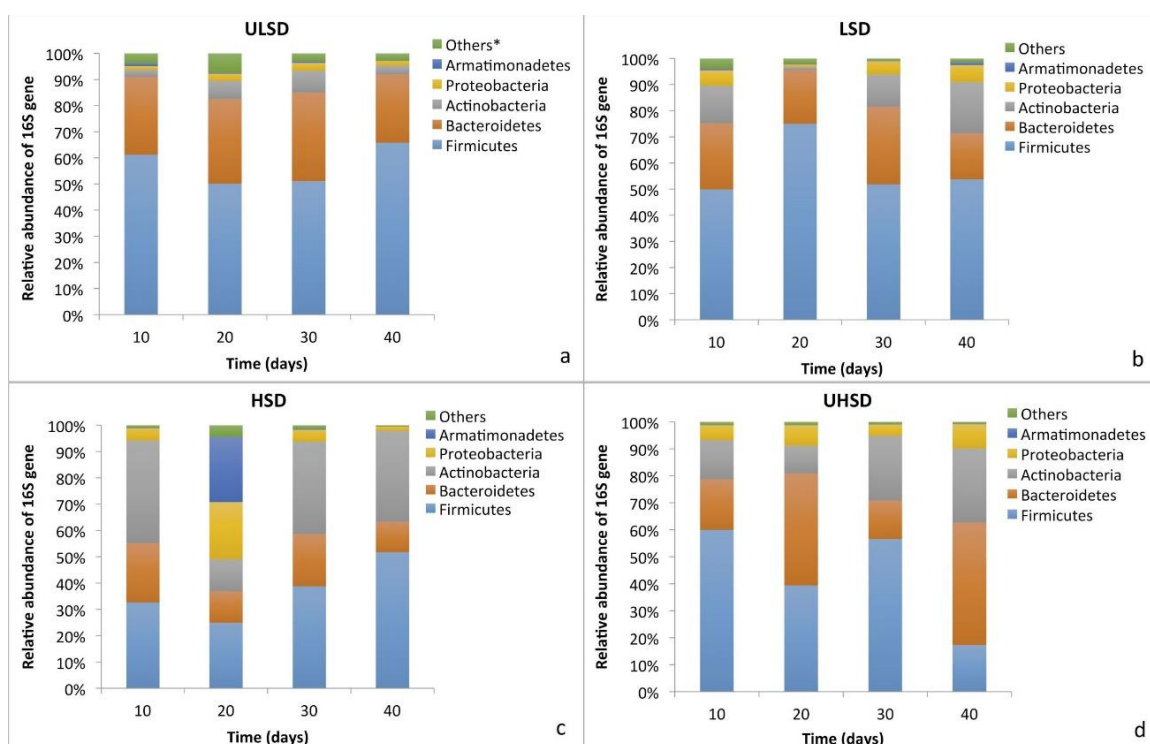


Figure 3. The relative abundance of Phyla (≥ 1 %), represented as a proportion of 16S rRNA gene reads of the total number of reads from simulated storage of diesel oil of varying sulfur content: **a:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur); **b:** LSD (≤ 50 ppm sulfur); **c:** HSD (≤ 500 ppm sulfur) and **d:** UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) for 10, 20, 30 and 40 days. Others*: Phyla < 1 %.

These results demonstrate a variation in the relative abundance of the major bacterial phyla detected throughout the experimental time in different sulfur contents,

but without a comparison with the original uncharacterized inoculum. This could be understood as a methodological limitation to comparison of changes in the DNA profiles between the different sulfur contents.

The characterizations of the microbial community and fluctuations arising from different sulfur contents have been little explored to date. Lee et al. [12] evaluated the extent of contamination and microbially induced corrosion potential (MIC) in HSD (> 150 ppm S), ULSD, B5, B20 and B100 with various metal coupons. They used DGGE with rRNA 16S and rRNA 28S gene primers to detect differences in microbial communities. *Niastella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodotorula* and *Mycosphaerella* were identified in the inoculum and biofouling occurred in all fuel / distilled water combinations. They concluded that inoculated microorganisms dominated in the fuels after 6 months and the diversity generally decreased during this period. The highest biomass was observed in B100, but ULSD and HSD (L100) exhibited the highest corrosion in carbon steel (C1020).

Lyles et al. [8] investigated the anaerobic microbial community from ballast tank water, ballast tank water incubated with ULSD, LSD, HSD and US Navy ship diesel, an unamended diesel control and biodiesel; their analyses were based on high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA and community structure confirmation by DGGE. In the initial community, the Phylum α -proteobacteria was dominant (> 60 % relative abundance), and after anaerobic incubation δ -proteobacteria, unclassified Bacteroidetes, and unclassified group became dominant. The main genera identified from the ULSD, LSD and HSD incubations were *Desulfotignum*, *Desulfobacterium*, *Pelobacter* and *Desulfosalina*. Lyles and coworkers (2013) [8] concluded that the community structure did not depend on sulfur content in the fuel.

5.3.2.2 Analysis of 18S rRNA gene

The number of sequences after processing for each of the various diesels and incubation times can be visualized on the Table S2. Within the classified reads, a total of 4 Phyla; 16 Classes; 49 Orders; 90 Families and 185 Genera were found in biomass from simulated storage of the diesel oils. The most represented Phylum was Ascomycota with a relative abundance over 99 %. Chytridiomycota, Basidiomycota and Glomeromycota presented abundance equal or lower than 0.1 %. Phylum Glomeromycota was removed from the polyphyletic Zygomycota, and placed into a new monophyletic phylum [39]. Taxa within the Glomeromycota cannot be cultivated at all without host plant roots (arbuscular mycorrhizal fungi) and it would represent

important information in the detection of non-cultivable microorganisms and adding information in the diesel fuel area. These results reflect the rDNA profile found in the fungal community. The small number of sequences obtained could be related to the use of an 18S biomarker that aimed to select major fungal phyla from environmental samples without interfering with the Eukarya domain [27]. There are limitations of this marker in fungal diversity studies compared to ribosomal ITS regions.

Among the 16 identified classes, Sordariomycetes (Ascomycota) was the most prevalent in all sulfur contents (< 98 %) and Saccharomycetes, Pezizomycetes, Eurotiomycetes (Ascomycota) showed very low relative abundance between treatments (0.32 to 0.01 %). The main classes that have been detected in this experiment were related to oil degradation. Sordariomycetes and Saccharomycetes in soils contaminated by hydrocarbons [40]; Sordariomycetes, Pezizomycetes and Eurotiomycetes as decomposers of benzopyrene [41] and Eurotiomycetes as degrading of phenanthrene [42].

Millions of different species of fungi have been described, but information is more restricted for fuel systems, especially in relation to different sulfur contents. Some of the most prevalent fungal genera described in fuel and storage tanks, such as *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium* and *Trichoderma*, [11, 33-35, 43-45] belong to the Phylum Ascomycota. Lee et al. [12] used DGGE to identify *Rhodotorula* (Basidiomycota) and *Mycosphaerella* (Ascomycota) genera in an initial inoculum, with *Paecilomyces* (Ascomycota) detected after 2 weeks of incubation in ULSD, but no fungi were detected in HSD. After 6 months of incubation, *Aureobasidium* (Ascomycota) appeared in ULSD and in HSD, *Hormoconis* and *Saccharomyces* (Ascomycota). The authors point out that carbon steel in both ULSD and HSD was more susceptible to corrosion. In our research, the different genera confirms the literature on fungi degrading hydrocarbons.

5.3.2.3 Responses of microbial community to sulfur content

To check the correlation between pH, biomass and sulfur content at relative abundance of 16S and 18S rRNA gene analysis after 40 days, a PCA was performed (Figure 4).

Results showed that pH and sulfur content were correlated with biomass and bacterial community composition (rRNA 16S) at 40 days (Figure 4A). Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria phyla were significantly and positively correlated with microbial biomass and sulfur content, indicating the

importance these groups in producing sludge in UHSD. A high correlation was observed between Bacteroidetes and UHSD as observed in relative abundance of phyla (Figure 3). UHSD was negatively correlated with Firmicutes, but it was most abundant in ULSD. On the 40th day, Armatimonadetes was closely correlated with LSD (Figure 4A). The pH was negatively correlated to ULSD. Probably the metabolites specially derived from the ULSD degradation metabolism may have promoted a slight change of pH of the water phase.

Figure 4B shows high biomass produced in the treatment UHSD is closely related to the presence of Phylum Ascomycota and negatively correlated to ULSD. The others phyla, Glomeromycota, Basidiomycota and Chytridiomycota are favored in small amounts of sulfur in diesel (LSD and ULSD). Following the same pattern seen in Figure 4A, perhaps the pH of ULSD was slightly modified by secretion of organic acids of low molecular weight and biosurfactants resulting from biodegradation activity of the Firmicutes (Bacteria) and Glomeromycota, Basidiomycota and Chytridiomycota (Fungi).

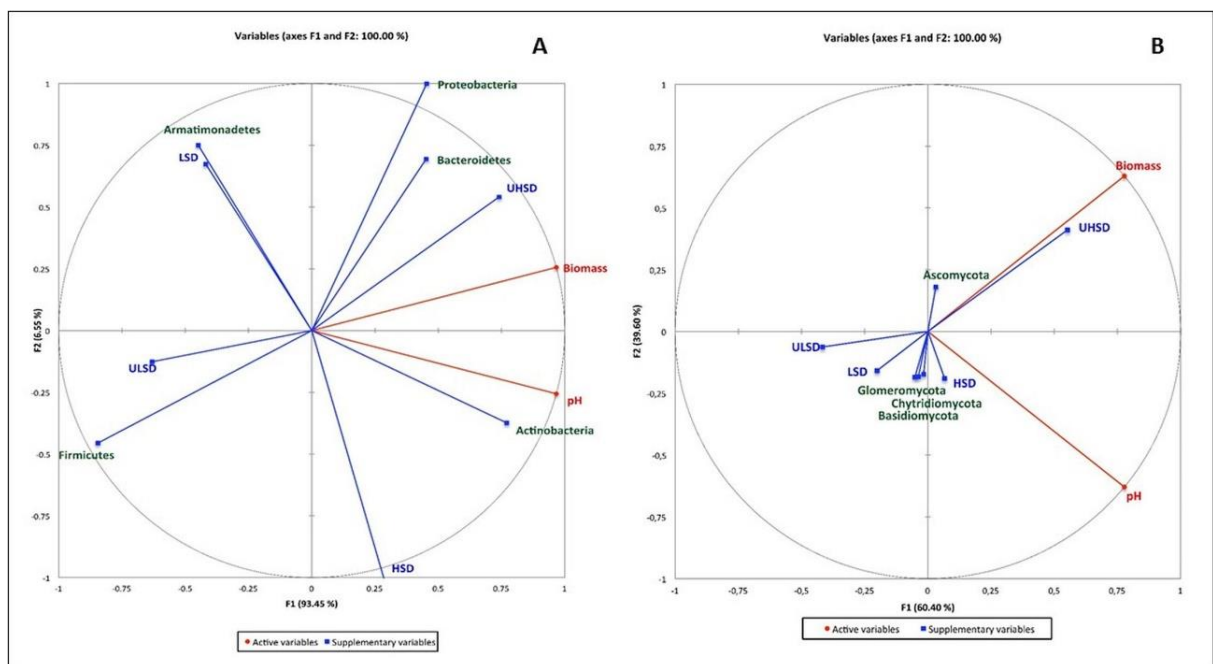


Figure 4. Principal component analysis (Spearman correlation-based PCA) of the results of biomass, pH and microbial relative abundance after 40 days' incubation. **A:** 16S rRNA gene analysis at the Phylum level. **B:** 18S rRNA gene analysis at the Phylum level. ULSD (≤ 10 ppm sulfur); LSD (≤ 50 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur).

The data of classified OTUs with relative abundance from rRNA 16S gene, over time, combined with Shannon Diversity Index (SDI) were used to determine how

rDNA bacterial diversity (Family level) could change during growth on diesel with varying sulfur content (Figure 5).

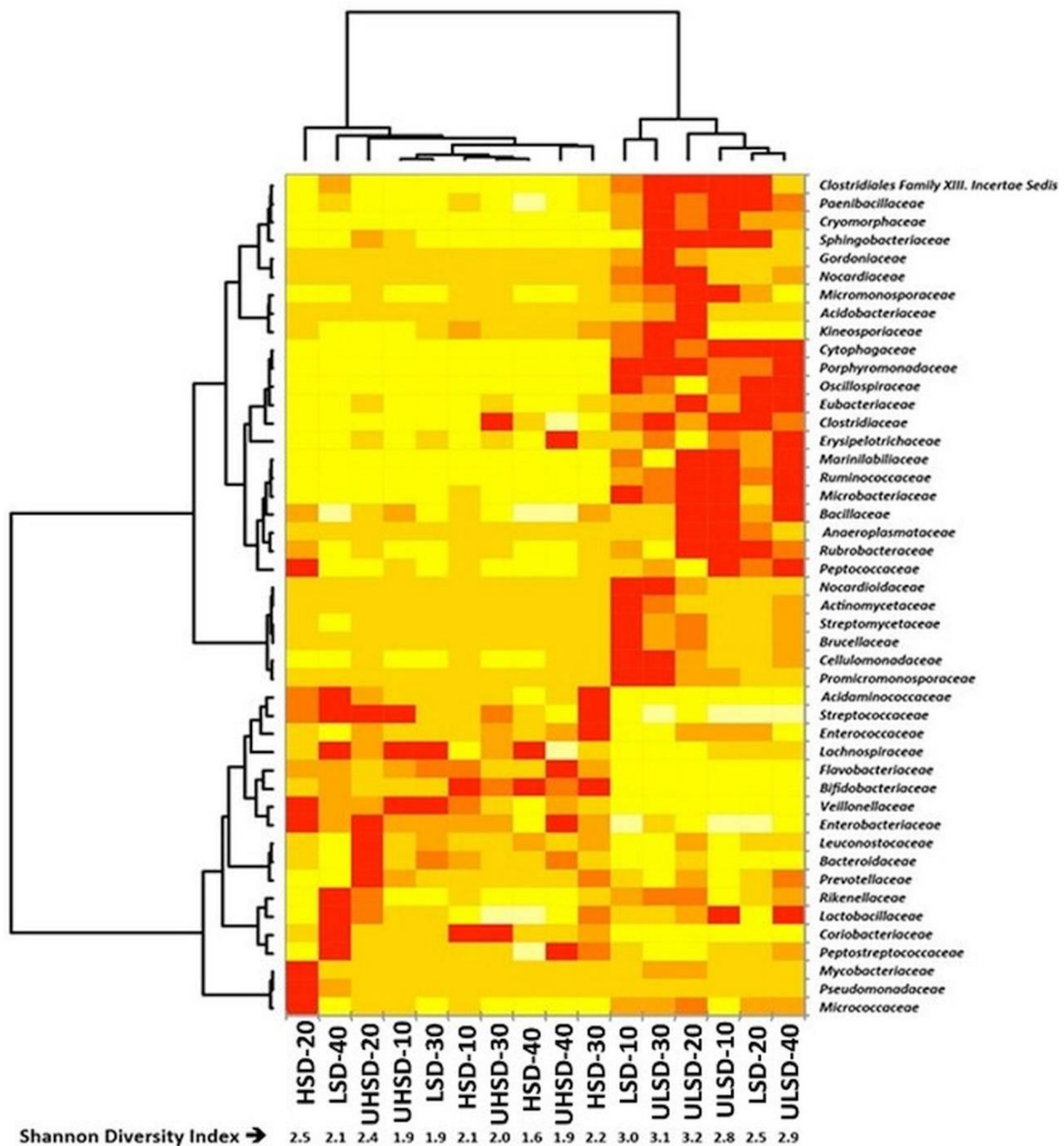


Figure 5. Heat map of the classified OTUs with relative abundance ($\geq 0.1\%$) from rRNA 16S gene, to Family level (ascendant hierarchical clustering based on Euclidian distances) and Shannon Diversity Index (SDI) for treatments with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); LSD (≤ 50 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) for 10, 20, 30 and 40 days. Similarity between treatments are characterized by horizontal rectangles of homogeneous color along the map. Similar individuals are characterized by vertical rectangles of homogeneous color along the map. From red to yellow = 1 to -1.

SDI showed a variation between 1.6 and 3.2 among the treatments. The smallest and largest number correspond to low and high range diversity, respectively.

In general, the profile of the community separation according to sulfur content over time was observed. SDI showed a pattern of greater bacterial diversity (2.5 - 3.2) in samples with low sulfur content (ULSD and LSD). Of the 46 selected families ($\geq 0.1\%$ relative abundance), 63 % were more abundant in this condition. In contrast, SDI showed a pattern of lower diversity (1.6 - 2.5) in the samples with high sulfur content (HSD and UHSD) and lower relative abundance (46 %) comparing to low sulfur content samples. The exception was for samples LSD at times 30 and 40 days, which were similarly pooled samples with high sulfur content and low diversity (SDI 1.9 - 2.1, respectively).

HCA showed a clear separation of the treatments with regard to sulfur content. ULSD has been grouped differently to LSD, HSD and UHSD (Figure 5). The UHSD at 40 days showed high abundance of *Peptostreptococcaceae* and *Erysipelotrichaceae* Families (Firmicutes), *Enterobacteriaceae* (Proteobacteria), *Flavobacteriaceae* (Bacteroidetes) related to the low diversity (SDI 1.9) and was the condition with higher microbial biomass (Figure 2). On the other hand, the ULSD in the same period, was what produced the lowest biomass (Figure 2), but with high diversity (SDI 2.9) related to high abundance of Families *Lactobacillaceae*, *Peptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oscillospiraceae* (Firmicutes), *Microbacteriaceae* (Actinobacteria), *Marinilabiliaceae*, *Porphyromonadaceae* and *Cytophagaceae* (Bacteroidetes). It seems that the lower sulfur concentration in the diesel, showed the highest microbial diversity, meanwhile that the higher concentration, presented the lower microbial diversity, with few group of microorganisms dominating the community, probably S cycle related bacteria. The Family *Peptococcaceae*, containing gram positive Genera belonging sulfate reducing bacteria (SRB) group. SRB are obligate anaerobes that use organic compounds or hydrogen the electron donor in reduction of sulphate to sulphide [46]. In our study we used the SDI that use richness, abundance and evenness of OTUs and not necessarily the most diverse community is the most abundant.

Many factors can be recognized as important in composition, rate and extent of microbial diversity in storage systems, mainly in tanks. It is a consensus that fuel composition is changed and that factors such as climate, fuel storage tank design, fuel chemistry (composition and presence of additives), fuel throughput rates, housekeeping and maintenance and antimicrobial control [1, 47] are determinants for the establishment of the microbial population. The natural capabilities (presence of

functional degrading genes) of the microbial population, including the nutrients which they can access, and the presence and availability of water, will in each case determine the succession of different microbial populations, and the opportunity to produce sludge.

5.3.3 HATR- FTIR and H¹NMR analysis

HATR–FTIR spectra of the fuel phase, analyzed using HCA, showed the degradation suffered by diesel comparing time zero and 40 days (Figure 6).

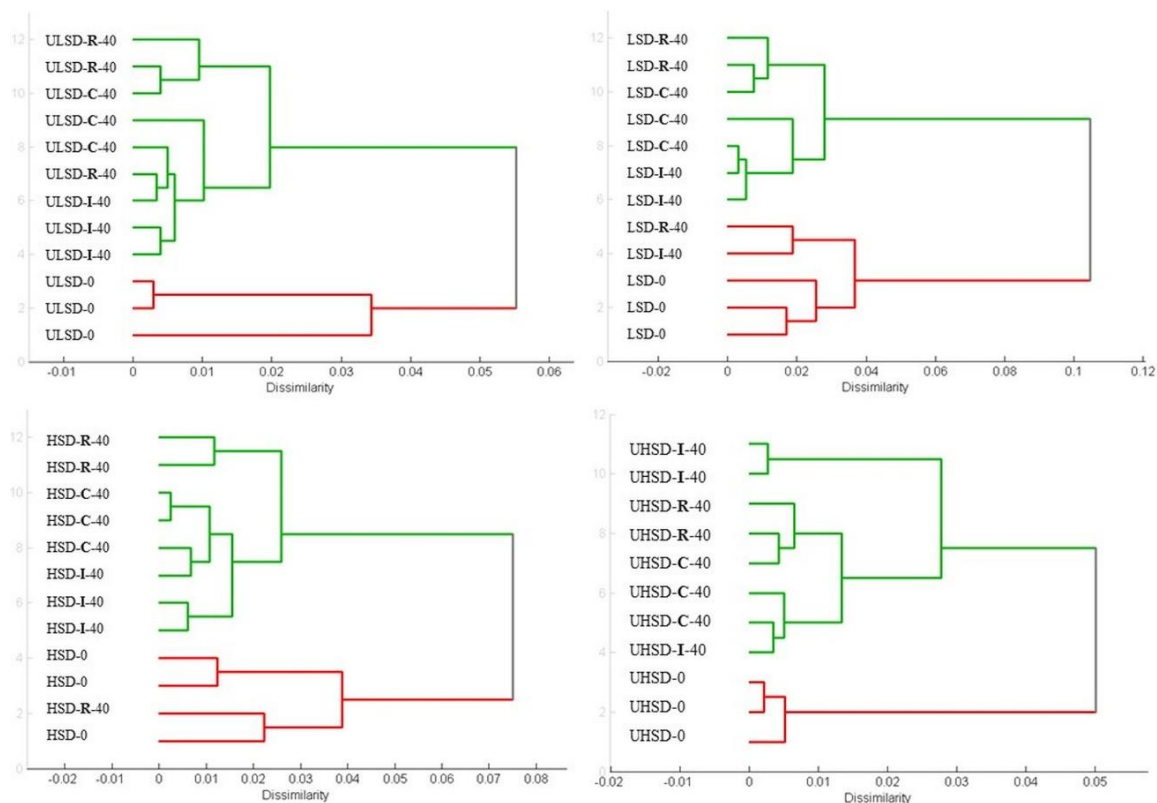


Figure 6. Dendrograms of infrared spectra of various sulfur content diesels: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); LSD (≤ 50 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) showing biodegradation in as received (R); non-characterized inoculum (I) and sterile control (C), at time zero and after 40 days.

The dendrograms showed there were modifications in carbon chains in all samples, suggesting that after 40 days the diesel hydrocarbon chains had been degraded. Such results suggest abiotic fuel degradation, which may be caused by light, evaporation or absorption of water, since the sterile control and as received fuel showed similar degradation results (Figure 6).

To confirm the changes of fuel carbonic chains HATR-FTIR spectra we made a H¹NMR. This analysis did not show any significant difference between the aromatics concentration for ULSD and UHSD at 40 days. However, ULSD contains a

higher percentage of methylene (chemical shift 0.90 ppm) than UHSD, which means this fuel contains a greater concentration of branching molecules and/or low weight chain molecules (Figure 7).

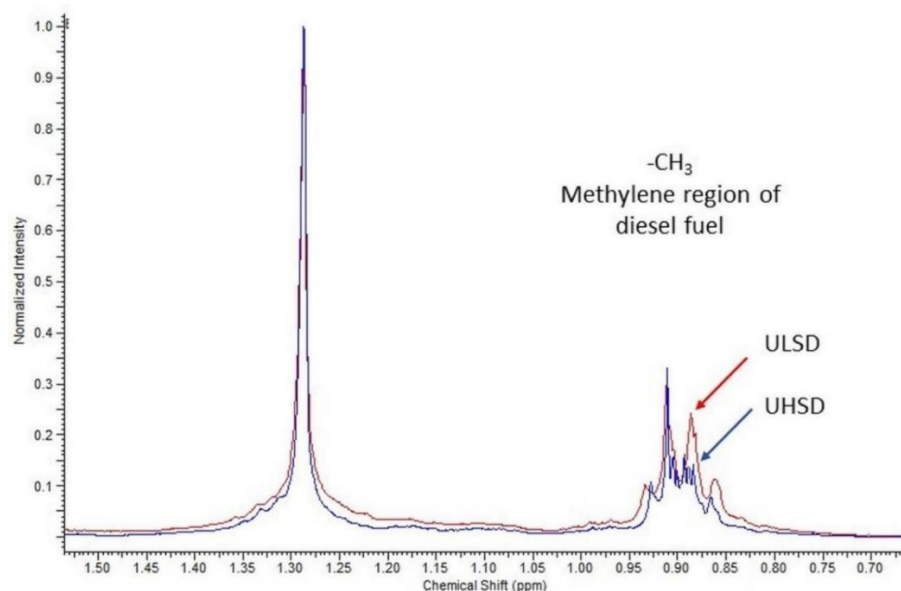


Figure 7. Proton nuclear magnetic resonance spectra (H^1NMR) of the oil phase of the inoculated treatment after 40 days. Red: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); Blue: UHSD (≤ 1800 ppm sulfur).

Similar results were obtained by Lyles et al. (2013) [8]. The authors used gas chromatographic profile of ULSD, LSD and HSD, and shipboard diesel to confirm these fuels were chemically similar. However ULSD showed a greater ratio of high molecular (C_{16} – C_{22}) to low molecular (C_{10} – C_{14}) alkanes compared to the other fuels. In our case H^1NMR showed that there was also a change in molecule of the ULSD comparing with UHSD.

Oil refiners are under tremendous pressure to bring the sulfur level in their product to almost zero to meet stringent emission standards stipulated by regulatory bodies [48]. The organosulfur content of diesel fuels reflects their crude oil origin and it ranges from 0.4 to 6 % (w/w) [5, 49, 50]. The existence of organosulfur compounds of higher molecular weight (OSC) in diesel can cause toxic emissions, including hard-to-remove dibenzo thiophene (DBT) and other derivatives [50]. The conventional process of hydrodesulfurization is indicated to reduce the concentration of OSC. To achieve < 15 ppm sulfur, diesel fuel is reacted with hydrogen under elevated temperature and pressure conditions in the presence of a catalyst. The intense nature of this process leads to the destruction of some hydrocarbon components and the production of residual lower- molecular weight by-products [8]. According to our

results, ULSD contains a high percentage of branching and lower- molecular weight compounds (Figure 7). However, the values of biomass recorded for ULSD were lower than UHSD at all sampling times. To address this issue, we are considering the aspects of hydrocarbon composition and the biodegradability of diesel oil. Diesel oil is a mixture of aliphatic and aromatic hydrocarbons that includes paraffin, naphthenes, aromatics, oleophins and dioleophins [11, 33, 51, 52]. Biodegradability, especially during storage, is related to many factors, including number of microbes, oxygen or nutrient levels and mainly availability of water. However microbial degradation activity also depends on several factors related to the structure and physical-chemical properties of the fuel. These factors include: genetic potential of detriogenic microbial populations such as presence and expression of catabolic genes; bioavailability (whether the fuel can taken up by the microbial cell) and the contaminant structure (including steric and electronic effects) [3, 5, 25, 53]. Steric effects involve the extent to which substitute groups or the presence of branching on a fuel molecule sterically hinder recognition by the active site of the degrading enzyme. It is the presence of branching and functional groups that often slows degradation by changing the chemistry of the degradation reaction site. According to our results from H^1 RMN, the low production of biomass may be related to the presence of highly branched molecules. When the reaction site is blocked by branching or by a functional group, the contact between the chemical and the enzyme at the reaction site is hindered [53]. Branching or functional groups can also affect transport of the substrate across the cell membrane, especially if the transport is enzyme-assisted [53].

Many studies have addressed the issue that the hydrotreatment used to reduce fuel sulfur content also reduces the aromatic content and thereby generally enhances fuel biodegradability [5, 8, 54]. In this scenario we must also consider the addition of biodiesel to diesel oil, which makes the fuel more susceptible to microbial contamination [3, 25, 45, 55]. Our results suggest that the reduction of sulfur content of diesel fuel by itself does not significantly impact its aerobic biodegradation susceptibility and consequent biodeterioration, but the desulfurization process is responsible for some changes in the carbon chains, such as branching and substitution of functional groups, that can facilitate or impair the biodegradability of hydrocarbons as a function of the bioavailability to microbial enzymatic machinery.

5.4 Conclusions

This study has revealed that microbial biomass in pure diesel varies with sulfur content. UHSD was the most susceptible diesel to biomass formation and the lowest biomass formation after 40 days of simulated storage was detected in ULSD. These results suggest that the removal of organosulfur compounds from diesel does not directly impact on the susceptibility of the resulting fuel to biodeterioration during storage. High throughput sequencing analysis showed that the microbial community in the diesel system includes Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria (Bacteria) and Ascomycota (Fungi) are the most abundant microorganisms and Archaea (Euryarchaeota, Thaumarchaeota and Crenarchaeota) was also detected in all sulfur contents, but the bacterial diversity is increased with the reduction of sulfur. Infrared analyses showed possible abiotic diesel degradation in all samples; however proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy revealed higher levels of branching in diesel ULSD than observed in UHSD, which may be related to the hydrotreatment process.

Acknowledgements

Funding for this project was supplied by CNPq and CAPES. We also thank Petroleum Products Ipiranga for providing the fuels and for technical support. The authors are grateful to Christine Gaylarde for reviewing the manuscript and Eric Triplett for performing Illumina analysis at the University of Florida, USA.

References

- [1] Passman FJ. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – A review. *Int Biodeterior Biodegrad* 2012; 81: 88–104.
- [2] Leuchtle B, Xie W, Zambanini T, Eiden S, et al. Critical factors for microbial contamination of domestic heating oil. *Energy Fuels* 2015; 29: 6394-6403.
- [3] Soriano AU, Martins LF, Ventura ESA, Landa FHTG, Valoni EA, Faria FRD, et al. Microbial aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int Biodeterior Biodegrad* 2015; 99: 102-14.
- [4] Suflita JM, Aktas DF, Oldham AL, Perez-Ibarra BM, Duncan K. Molecular tools to track bacteria responsible for fuel deterioration and microbiologically influenced corrosion. *Biofouling* 2012; 28(9):1003-10.
- [5] Suflita JM, Lyles CN, Aktas DF, Sunner J. Biocorrosion issues associated with the use of ultra-low sulfur diesel and biofuel blends in the energy infrastructure. In:

Liengen T, Feron D, Basseguy R, Beech IB, editors. Understanding biocorrosion: fundamentals and applications. European of Corrosion (EFC): Elsevier Science; v.66, 2014, p.313-328. [accessed 22.07.15]

- [6] Stanislaus A, Marafi A, Rana SM. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal Today* 2010; 153: 1-68.
- [7] Pawelec Navarro RM, Campos-Martin JM, Fierro JLG. Towards near zero-sulfur liquid fuels: a perspective review. *Catal Sci Technol* 2011; 1: 23–42.
- [8] Lyles CN, Aktas DF, Duncan KE, Callaghan EV, Stevenson BS, Suflita JM. Impact of Organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 6052–62.
- [9] Grishin DF, Zinina ND. Environmentally Friendly Diesel Fuels with Low and Ultralow Sulfur Content and Additives to Them. *Russ J Appl Chem* 2015; 88 (7): 1106–21.
- [10] Knothe G, Steidley KR. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity. *Energy Fuels* 2005; 19: 1192-1200.
- [11] Yemashova N, Murygina V, Zhukov D, Zakharyantz A, Gladchenko M, Appanna V, et al. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2007; 6: 315–37.
- [12] Lee JS, Ray RI, Little BJ. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling* 2010; 26 (6): 623-35.
- [13] Heldreth B, Turos E. Microbiological properties and modes of action of organosulfur-based anti-infectives. *Curr Med Chem: Antilfect Agents* 2005; 4(4): 295–315.
- [14] Londry KL, Suflita JM. Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism. *Environ Toxicol Chem* 1998; 17: 1119-1206.
- [15] Passman FJ, Dobranic J. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: Morris RE, Editor. *Proceedings of the Ninth International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels; International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels; 2005; Washington DC: 2005. p.18-22.*
- [16] Dodos GS, Konstantakos T, Longinos S, Zannikos F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. *Proceedings of the 12th International Conference Science and Technology; 2011 Sep 8-10; Rhodes, Greece: 2011. p. A 431-9.*
- [17] Dunn RO. Fuel Properties of Biodiesel/Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) Blends. *J Am Oil Chem Soc* 2011; 88: 1977–87.

- [18] Srivastava NK, Nandan NK. Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. IJEPR 2012; 1 (1): 119-25.
- [19] Lutterbach MTS, Galvão MM, Araújo M, Contador LS, Oliveira V, Pimenta GS. Real-time PCR Applied to Quantification of SRB in Bottom Water from Fuel Tanks. In: NACE - International Corrosion Conference & Expo; 2011; 11233: 9p.
- [20] ASTM Standard D5453 (2012). Determination of Total Sulphur in Light Hydrocarbons, Motor Fuels and Oils by Ultraviolet Fluorescence. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2012. Doi 10.1520/D5453-12 [www.astm.org].
- [21] Hill EC, Hill GC. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. In: IASH, The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels; 2009 Oct 18-22; Tucson, USA: 2009. 19p.
- [22] ASTM Standard E 1259, 2010. Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2010. Doi 10.1520/E1259-10 [www.astm.org].
- [23] Bushnell LD, Haas HF. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol 1941; 41: 653–73.
- [24] Silva TR, Verde LCL, Santos Neto EV, Oliveira, VM. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. Int Biodeterior Biodegrad 2013; 81 (0): 57–70.
- [25] Bücker F, Barbosa CS, Quadros PD, Bueno MK, Fiori P, Huang C, et al. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. Int Biodeterior Biodegrad 2014; 1-10: doi 10.1016/j.ibiod.2014.05.030
- [26] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2010; Mar 15; p. 108.
- [27] Borneman J, Jack Hartin R. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. Appl Environ Microbiol 2000; 66 (10): 4356.
- [28] Pearson WR, Wood T, Zhang Z, Miller W. Comparison of DNA Sequences with Protein Sequences. Genomics 1997; 46: 24-36.
- [29] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. "Basic local alignment search tool." J Mol Biol 1990; 215: 403-410.
- [30] Dias R, Xavier MG, Rossi FD, Neves M.V, Lange TAP, Giongo, A, et al. MPI-blastn and NCBI-TaxCollector: Improving metagenomic analysis with high performance

classification and wide taxonomic attachment. *J Bioinform Comput Biol* 2014; 12 (3): doi 10.1142/S0219720014500139

- [31] Giongo A, Crabb DB, Davis-Richardson AG, Chauliac D, Mobberley JM, Gano K, et al. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME J* 2010; 4 (7): 852-861. Doi 10.1038/ismej.2010.16.
- [32] Bento FM, Gaylarde CC. Microbial contamination of stored diesel oil. *Braz J Microbiol* 1996; 27: 71-5.
- [33] Gaylarde CC, Bento FM, Kelley J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev Microbiol* 1999; 30: 01–10.
- [34] Bento FM, Gaylarde C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *Int Biodeterior Biodegrad* 2001; 47: 107–112.
- [35] Bento F, Beech I, Gaylarde C, Englert G, Muller I. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. *World J Microb Biot* 2005; 21: 135–142.
- [36] White J, Gilbert J, Hill G, Hill ED, Huse S, Weightman A, et al. Culture-Independent Analysis of Bacterial Fuel Contamination Provides Insight into the Level of Concordance with the Standard Industry Practice of Aerobic Cultivation. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(13): 4527–38.
- [37] Hu ZY, Wang YZ, Im WT, Wang SY, Zhao GP, Zheng, HJ, et al. The First Complete Genome Sequence of the Class Fimbriimonadia in the Phylum Armatimonadetes. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e100794. Doi 10.1371/journal.pone.0100794
- [38] Liao J, Wang J, Jiang D, Wang MC, Huang Y. Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99: 10299–310. Doi 10.1007/s00253-015-6880-y
- [39] Schußler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 2001; 105(12): 1413-21. Doi 10.1017/S0953756201005196 P
- [40] Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, La Providencia IE, Yassimi AE, St-Arnaud, M.; Hijri M. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS ONE* 2015; 10(6): e0128272. Doi 10.1371/journal.pone.0128272
- [41] Hao DC, Song SM, Mu J, Hu WL, Xiao PG. Unearthing microbial diversity of *Taxus* rhizosphere via MiSeq highthroughput amplicon sequencing and isolate characterization. *Sci Rep* 2016; 6: 22006. Doi 10.1038/srep22006
- [42] De Menezes A, Clipson N, Doyle E. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ Microbiol* 2012; 14(9): 2577-88.

- [43] Passman FJ. Introduction to fuel microbiology. In: Passman FJ, editor. Manual 47- Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, West Conshohocken: ASTM International; 2003, p. 1-13.
- [44] Rodríguez-Rodríguez CE, Rodríguez E, Blanco R, Cordero I, Segura D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. *J Environ Sci* 2010; 22 (10):1595–1601.
- [45] Bücker F, Santestevan NA, Roesch LF, Jacques RJS, Peralba M do CR, Camargo FA de O, et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int Biodeterior Biodegrad* 2011; 65: 172–178.
- [46] Tang K, Baskaran V, Nemati M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochem Eng J* 2009; 44: 73–94.
- [47] Hill EC, Hill GC. Microbial contamination and associated corrosion in fuels during storage distribution and use. *Adv Mat Res* 2008; 38: 257-268.
- [48] Bandyopadhyay S, Chowdhury R, Bhattacharjee C, Pan S. Simultaneous production of biosurfactant and ULSD (ultra low sulfur diesel) using *Rhodococcus* sp. in a chemostat. *Fuel* 2013; 113: 107–112.
- [49] Abbad-Andaloussi S, Warzywoda M, Monot F. Microbial Desulfurization of Diesel Oils by Selected Bacterial Strains. *Oil Gas Sci Technol* 2003; 58 (4): 505-513.
- [50] Al-Degs, YS, Al-Ghoute MA. Influence of diesel acidification on dibenzothiophene removal: a new desulfurization practice. *Sep Purif Technol* 2015; 139: 1-4.
- [51] Batts BD, Fathoni AZ. A Literature Review on Fuel Stability Studies with Particular Emphasis on Diesel Oil. *Energ Fuel* 1991; 5: 2-21.
- [52] Viggor S, Juhanson J, Jõesaar M, Mitt M, Truu J, Vedler E, et al. Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol Res* 2013; 168: 415-427.
- [53] Maier R. Microorganisms and Organic Pollutants. In : Maier R, Pepper I, Gerba C, editors. *Environmental Microbiology*. Chapter 16; 2000, p. 363-402.
- [54] Passman FJ. Microbes and fuel retailing - The hidden costs of quality. *NPN* 1999; 91 (7): 20-22.
- [55] Sørensen G, Pedersen DV, Norgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresource Technol* 2011; 102: 5259–5264.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

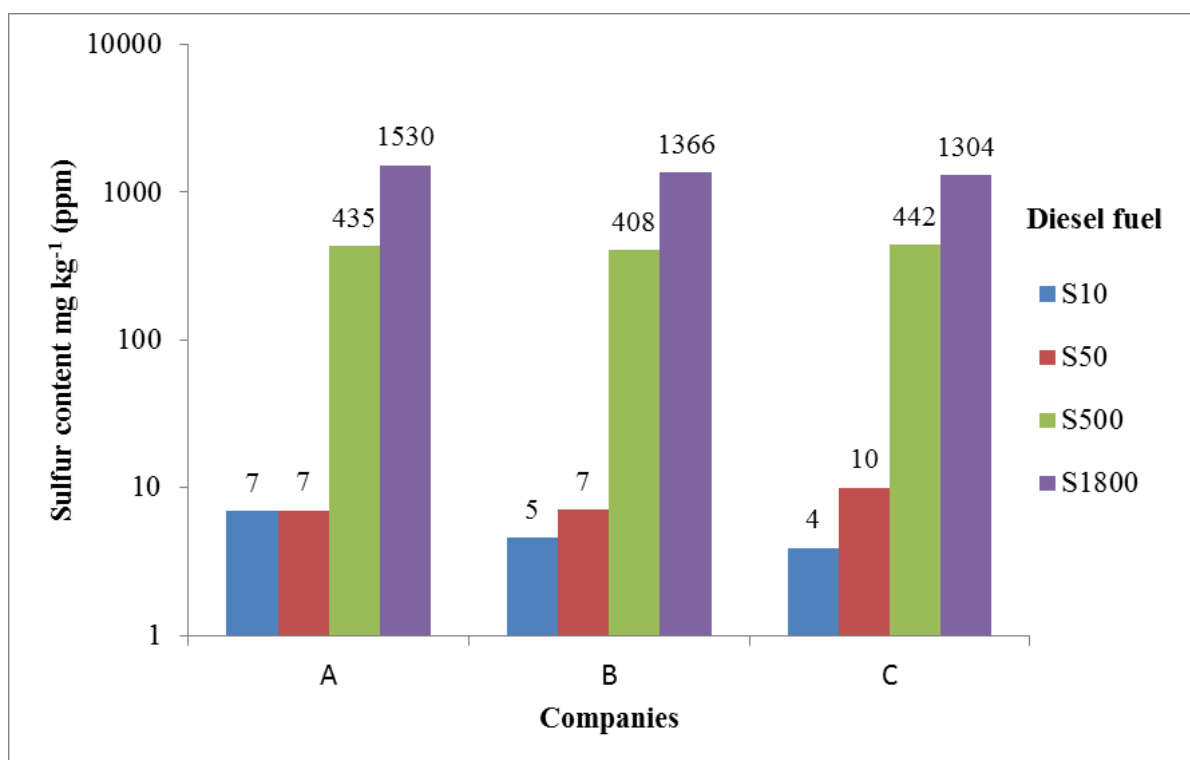


Figure S1. Analysis of sulfur contents in mg kg^{-1} (ppm) present in diesel used in the experiment at time zero, by different Companies. In this study it was selected the Company B as a parameter in the analysis of sulfur content.

A = The Company using the D7039 method to evaluate the diesels S10 and S50 and the D4294 method to evaluate the diesels S500 and S1800 (ANEXOS 1, 2, 3, 4, respectivamente).

B = Company using the D5453 method to evaluate the diesels S 10, S50, S500 and S1800.

C = Company using the D5453 method to evaluate the diesel S10, S50, S500 and S1800.

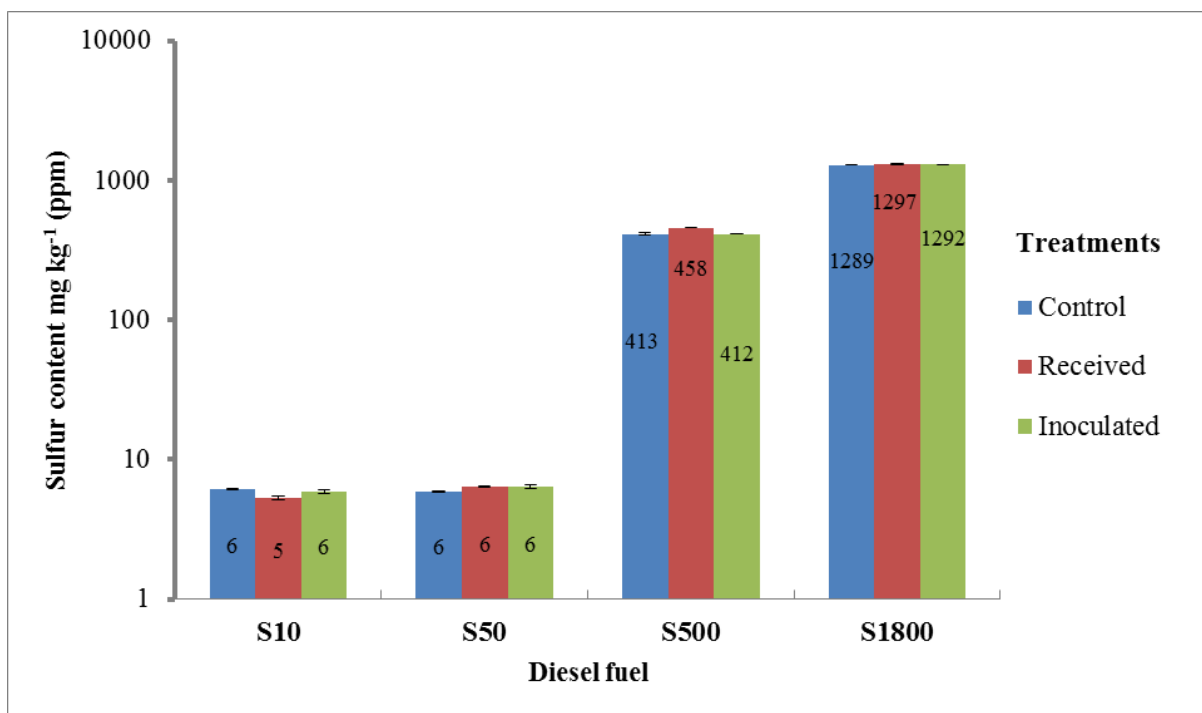


Figure S2. Sulfur content in mg kg⁻¹ (ppm) present in diesel for the controls, inoculated treatments and as received after 40 days of experiment. The values refer to the average of triplicates for each treatment.

Table S1. Number of reads obtained from 16S rRNA gene (Bacteria and Archaea) sequencing, and number of OTUs from Phylum to Genus level, detected in each microcosm with different sulfur content S1800, S500, S50 and S10 at 40, 30, 20 and 10 days.

SIMULATED STORAGE CONDITION	Total numbers of reads	Paired reads	NUMBER OF OPERATIONAL TAXONOMIC UNITS (OTUs)				
			Phylum	Class	Order	Family	Genus
Diesel S1800/ 40 days	348,502	222,129	20	21	27	57	78
Diesel S1800/ 30 days	309,458	190,475	19	23	35	63	88
Diesel S1800/ 20 days	124,558	74,059	17	19	27	50	81
Diesel S1800/ 10 days	101,721	54,011	21	25	39	62	98
Diesel S500/ 40 days	262,704	173,132	16	18	24	48	64
Diesel S500/ 30 days	75,979	40,688	19	22	33	67	108
Diesel S500/ 20 days	87,442	59,134	18	25	33	54	67
Diesel S500/ 10 days	677,586	403,021	21	26	37	75	101
Diesel S50/ 40 days	12,209	8,324	7	8	10	17	42
Diesel S50/ 30 days	381,579	244,386	23	26	37	63	69
Diesel S50/ 20 days	453,266	273,302	24	25	41	80	25
Diesel S50/ 10 days	90,298	44,991	22	23	32	68	73
Diesel S10/ 40 days	88,813	40,334	16	15	23	53	46
Diesel S10/ 30 days	86,563	37,796	18	19	21	49	48
Diesel S10/ 20 days	118,428	55,348	21	22	28	70	82
Diesel S10/ 10 days	107,788	52,482	20	21	32	61	57
TOTAL	3,326,894	1,973,612					

OTUs \geq 0.01 %

Table S2. Number of reads obtained from 18S rRNA gene (Eukarya) sequencing, and number of OTUs from Phylum to Genus level, detected in each microcosm with different sulfur content S1800, S500, S50 and S10 over 40 days.

SIMULATED STORAGE CONDITION	Total numbers of reads	Paired reads	NUMBER OF OPERATIONAL TAXONOMIC UNITS (OTUs)				
			Phylum	Class	Order	Family	Genus
Diesel S1800/ 40 days	318,911	193,630	3	4	5	7	12
Diesel S1800/ 30 days	306,426	189,286	1	3	3	2	4
Diesel S1800/ 20 days	120,609	66,671	3	5	7	8	12
Diesel S1800/ 10 days	89,599	43,759	1	3	3	3	4
Diesel S500/ 40 days	242,583	163,313	1	3	3	3	5
Diesel S500/ 30 days	283,409	127,000	1	1	1	1	2
Diesel S500/ 20 days	78,097	35,809	3	5	7	12	22
Diesel S500/ 10 days	54,217	29,214	4	15	38	66	120
Diesel S50/ 40 days	607,616	346,986	1	1	1	1	3
Diesel S50/ 30 days	11,467	7,734	1	1	1	1	2
Diesel S50/ 10 days	376,096	225,812	1	3	3	2	6
Diesel S10/ 40 days	440,631	274,268	1	2	2	2	3
Diesel S10/ 30 days	142,806	81,28	1	1	2	2	2
Diesel S10/ 20 days	99,771	50,244	1	1	1	1	2
Diesel S10/ 10 days	297,558	193,922	1	1	1	2	3
TOTAL	3,469,796	2,029,4					

OTUs \geq 0.01 %

6. CAPÍTULO 3.
**EFFECT OF SULFUR CONTENT ON MICROBIAL COMPOSITION AND
BIODEGRADATION OF BRAZILIAN FUEL BLEND B10.**

O artigo desse capítulo foi submetido para a revista ***Environmental Science & Technology (ES&T)*** (ISSN da Web: 1520-5851) e está formatado conforme a suas normas.

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Environmental Science & Technology

Manuscript ID
es-2017-03212h

Title
EFFECT OF SULFUR CONTENT ON MICROBIAL COMPOSITION AND BIODEGRADATION OF BRAZILIAN FUEL BLEND B10

Authors
Azambuja, Aline
Cazaroli, Juciana
de Quadros, Patricia
Bucker, Francielle
Correa, Camila
Casagrande, Juliano
Ferraio, Marco Flores
Celikkol-Aydin, Sukriye
Ogawa, Akiko
Bonifay, Vincent
Sunner, Jan
Beech, Iwona
Benito, Fatima

Date Submitted
23-Jun-2017

[Author Dashboard](#)

ACS Paragon Plus Environment. Copyright © 2017 American Chemical Society. All rights reserved.
[Privacy Statement](#) | [Ethical Guidelines](#) | [ACS Publications \(pubs.acs.org\)](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[Knowledgebase & My Requests](#) | [Get Help Now](#)

EFFECT OF SULFUR CONTENT ON MICROBIAL COMPOSITION AND BIODEGRADATION OF BRAZILIAN FUEL BLEND B10.

Aline O. de Azambuja^{a,c}; Juciana C. Cazarolli^a; Patrícia D. de Quadros^a; Francielle Bücken^a; Camila Correa^b; Juliano C. Casagrande^b; Marco F. Ferrão^b; Sukriye C. Aydin^c; Akiko Ogawa^c; Vincent Bonifay^c; Jan A. Sunner^c; Iwona B. Beech^c; Fátima M. Bento^a*

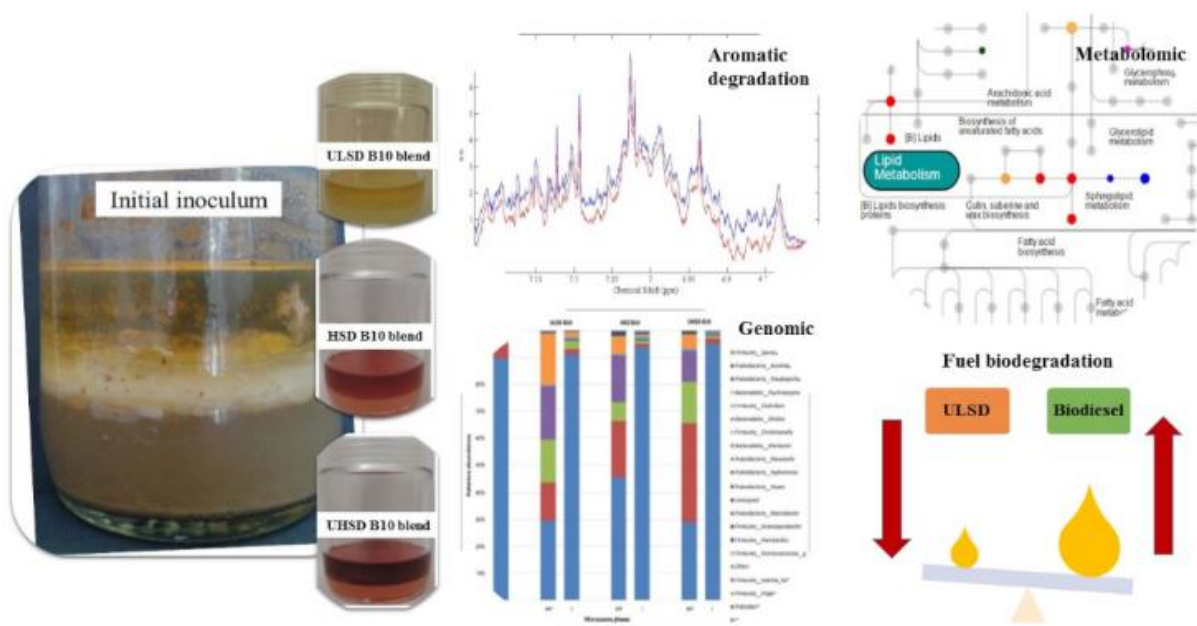
^a Fuels and Biofuels Biodeterioration Laboratory (LAB-BIO), Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul. 500 Sarmiento Leite, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Department of Inorganic Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul. 9500 Bento Gonçalves Avenue, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Department of Microbiology and Plant Biology, University of Oklahoma. 770 Van Vleet Oval, Norman, Oklahoma, 73019, United States.

Abstract

We evaluated the behavior of diesel oil with various sulfur levels, UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and ULSD (≤ 10 ppm sulfur), mixed with 10 % pure biodiesel with two levels of microbial contamination during simulated storage over 40 days. The results showed that biomass production was higher in the high contamination treatment, but there was no significant difference between the sulfur levels over time ($p > 0.05$). HSD B10 showed higher degradation of terminal methyl ester fraction, and aromatic compounds and ULSD B10 suffered the lowest degradation. *Pseudomonas* was the predominant bacterial genus at the interface, but in the water phase changes in abundance and development of *Pandora* and *Propionispora* were observed. Ascomycota and Basidiomycota were the most abundant fungal phyla. Putative fatty acids myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic and α -linolenic were detected in the water phase with high relative abundance at all sulfur levels compared to controls ($p < 0.05$), indicating degradation products of the fatty acid methyl esters present in soybean biodiesel. These results suggest that the reduction of sulfur content did not make diesel oil more susceptible to microbial contamination. The origin of the oil, the addition of biodiesel and correct maintenance routines during storage are the aspects that determine the final quality of the fuel.



Graphical abstract

6.1 Introduction

Over the last decade, Brazilian diesel oil, especially which used in road vehicles, has undergone important changes in its composition. Among them, the increasing percentage of biodiesel in diesel, with an aim of reaching 10 % or more by 2019 (13.263 Law, DOU 24.03.2016)¹ and the reduction of sulfur levels. The maximum limit for the latter in fuel for the road fleet is currently $\leq 500 \text{ mg kg}^{-1}$ (ppm) sulfur, although the value of $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$ (ppm) is being adopted in capitals and metropolitan regions.²

The reduction of sulfur levels is a worldwide trend brought about by strict environmental legislation for cleaner fuels. However, in order to achieve the required ultra-low levels (≤ 10 ppm sulfur), oil refining industries must conform to stringent operating conditions to produce a fuel that meets all quality parameters such as lubricity, density and viscosity.³⁻⁶ Some studies show that the removal of sulfur compounds changes the properties of diesel by reducing some important pattern, such as lubricity.^{4,7,8} In this case, the addition of biodiesel is considered beneficial because it restores the lubricity lost during the desulfurization process,^{7,9} but it may favor biodegradability of the mixture inside the tank both under aerobic¹⁰⁻²⁰ and anaerobic conditions.²¹⁻²⁴

The reduction of the sulfur content of diesel has also been suggested as a factor favoring the growth of microorganisms, since many sulfur compounds have an antimicrobial action^{25,26} and their reduced concentration could result in higher susceptibility to contamination, leading to problems of biocorrosion in ultra low sulfur diesel - ULSD and / or blends.²⁷⁻²⁹ However, other studies show that the desulfurization of diesel alone does not significantly impact the susceptibility to anaerobic³⁰ or aerobic biodegradation³¹ and consequent biocorrosion and biodeterioration processes.³² On the other hand, the presence of fatty acid methyl esters (FAMES), coupled with their inherent hygroscopicity, make biofuel a more readily available substrate for microorganisms by providing a labile carbon source to support the growth of various microbial groups, not only those unable to degrade fuel directly, but also those using co-metabolism. Such microbial activities produce metabolites such as organic acids, alcohols and growth factors that can contribute to fuel biodeterioration and biocorrosion of storage tanks, causing great economic losses.³³ Metabolites associated with hydrocarbon / ester degradation mechanisms can be detected using metabolic profiling

/ metabolomics approaches and may lead to the definition of a metabolic signature, revealing the overall behavior of microbial communities.³⁴

In this study we used ultra-high performance liquid chromatography coupled high resolution mass spectrometry (UPLC / HRMS) to quantify and characterize the metabolic pathways and putative microbial metabolites resulting from hydrocarbon and FAME degradation metabolism providing a biological fingerprint of the behavior of microbial community degrading fuel. In addition, the microbial community profile was determined by high throughput sequencing and degradation of diesel oils of various sulfur contents mixed with 10% pure biodiesel was determined by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)/ Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) analyses during simulated storage for 40 days.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Fuels

The fuels used were: ultra low sulfur diesel - ULSD (≤ 10 ppm sulfur) (ANEXO 1A); high sulfur diesel - HSD (≤ 500 ppm sulfur) (ANEXO 3A); ultra high sulfur diesel - UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) (ANEXO 4A) and pure methyl biodiesel from soybean and animal fat (73:25) (ANEXO 5B), without additives, provided by Distribuidora Ipiranga Produtos de Petróleo S / A (Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil). The B10 blend (10 % pure biodiesel and 90% diesel oil) was produced in the laboratory. Water content (ASTM D6304)³⁵, total sulfur (ASTM D5453)³⁶ and biodiesel content (EN 14078)³⁷ of the fuels are shown in Table S1 of Supporting Information (SI).

6.2.2 Microbial contamination levels

Low contamination: fuel as received from the distributor without sterilization. This is considered as natural microbial contamination ($\sim 10^3$ CFU L⁻¹), as would be expected in a storage tank.³⁸

High contamination: fuel previously sterilized by filtration (Millipore, nitrocellulose filter, pore size 0.22 μ m) with an inoculum of $\sim 10^6$ bacterial cells and fungal spores mL⁻¹. The inoculum is a mixture of uncharacterized microorganisms obtained from storage tanks of HSD diesel (≤ 500 ppm sulfur) and blends of diesel and biodiesel B4 / B5 prepared according to ASTM E1259-10,³⁹ with some modifications as described by Azambuja et al.³¹ In this study the inoculum was acclimatized by incubation for 7 days in low sulfur B10 (≤ 50 ppm sulfur).

6.2.3 Simulated storage

Storage was simulated in 100 mL glass flasks with plastic screw caps containing 20 mL of oil phase (B10 with various sulfur contents) as carbon source and 10 mL of aqueous phase composed of Bushnell-Haas⁴⁰ sterile mineral medium (g L⁻¹: 1.0 KH₂PO₄; 1.0 K₂HPO₄; 1.0 NH₄NO₃; 0.2 MgSO₄; 0.05 FeCl₃; 0.02 CaCl₂; pH 7.2). The flasks, with or without inoculum, were stored in an incubator at 30 °C, in the dark, to prevent fuel photo oxidation. Destructive microcosm sampling was carried out every 10 days over 40 days. Controls consisted of sterile aqueous and oil phases.

6.2.4 Physical/chemical analysis

HATR-FTIR and ¹H NMR

Triplicates of the oil phase at time zero and 40 days were stored at 4 °C until the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses were performed. FTIR spectra were obtained using the Spectrum 400 Perkin Elmer spectrophotometer equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector and a horizontal attenuated total reflectance (HATR) accessory with zinc selenide crystal (ZnSe). Duplicate spectra were analyzed as previously described³¹ and infrared data were subjected to multivariate Hierarchical Clustering Analysis (HCA) in the spectral region 1800 - 650 cm⁻¹ using MATLAB 7.11 (The Mathworks) and PLS_Toolbox 6.0 software (Eigenvector Research). According to the results of the infrared analysis, the inoculated samples were selected for analysis by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) employing Varian- INOVA 300, 300 MHz equipment. The signals referring to the aromatic hydrogens, ethylene and methylene phases were integrated and compared.

6.2.5 Microbiological analysis

Biomass

After 10, 20, 30 and 40 days, triplicates of the interfacial biomass produced in the flasks were assessed gravimetrically, using previously weighed filter paper discs (Qualy, cellulose filter, 14 µm pore size), according to Azambuja et al.³¹ Results from biomass dry weight were analyzed using ANOVA with a 95% confidence interval and the means compared by the Tukey Test using the XLSTAT-Pro 2014 program.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from microbial biomass in the interfacial and water phase regions in the inoculated flasks (~ 10⁶ bacterial cells and fungal spores mL⁻¹), taking destructive quadruplicates at 10, 20, 30 and 40 days.

Oil-water interface region: DNA from the initial inoculum was extracted by collecting a loop of the biomass from the interfacial region and adding directly to tubes containing Powerbeats (PowerSoil DNA Isolation Kit), in duplicate. The microbial biomass from each replicate of the experiment was harvested by filtration (Qualy, cellulose filter, 14 μm pore size) and extracted using PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories, USA), according to the manufacturer's instructions, modified as described by Silva et al.⁴¹ and following the same specifications as previously described by Azambuja et al.³¹ The purity and quantity of the extracted DNA were verified by spectrophotometry in Biospec (Schimadzu, São Paulo, Brazil) equipment at 260/280 nm, according to the manual.

Water phase region: each replicate was extracted separately using the standard phenol/chloroform (Invitrogen) extraction and precipitation with ethanol (Pro-Analysis), according to Sambrook & Russell,⁴² with some changes. Briefly, 8 mL of the water phase were centrifuged at 10000 g for 5 min, the supernatant discarded and the pellet washed with 1 mL of 0.01% Tween 80 (Sigma-Aldrich) three times, finally washing with 1 / 4 Ringer's isotonic solution. The pellet was then resuspended with 100 μL of 1X TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA - pH 7.8) and 100 μL of lysis buffer [20 mM Tris-HCl (Invitrogen)] - pH 7.4 mM EDTA (Invitrogen), pH 8.0, and 200 mM NaCl (Nuclear)], 10% SDS (Promega) and 100 μg Proteinase K (USB Corporation) were added and incubated in a water bath at 55 °C for 1 hour. After this step the above protocol was followed⁴². DNA was resuspended in 100 μL TE (10 mM Tris - pH 7.4, 1 mM EDTA - pH 8.0), treated with 100 μg RNase (Vivantis Technologies) and incubated in a water bath at 37 °C for 30 min.

PCR conditions and high throughput sequencing

The microbial community composition of the water phase was evaluated from the V4 region of the 16S rRNA gene for Eubacteria and Archaea and from the V4 and V5 region of the 18S rRNA gene for Eukarya. For sequencing using the Illumina Platform, specific barcodes adhered to the M13 sequence were attached in the 5' region of the forward primer.

Prokaryotes: PCR amplifications occurred using universal primers 519F (5'CAGCMGCCGCGGTAA3') and 785R (5'TACNVGGGTATCTAATCC3'), with high potential coverage for Archaea.⁴³ The PCR reaction was performed in a final volume of 25 μL containing 1-10 ng / μL DNA, 12.5 μL Master Mix 2x PCR (Phusion high fidelity - BioLab) and 5 pmol of each primer. The amplification occurred with an initial

denaturation of 98 °C for 30 s, followed by 25 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 52 °C for 20 s, extension at 72 °C for 10 s and final extension at 72 °C for 5 min. The amplicons from each of the replicates were mixed and duplicates were withdrawn for each time and sulfur content for new barcode (10 pmol) addition by PCR. The volumes were duplicated and 10 µL of DNA and 10 pmol of primer 785R were used, reamplifying with a 10 cycle program.

Eukaryotes: universal primers selected were F566 (5'CAGCAGCCGCGGTAATTCC3') and R1200 (5'CCCGTGTTGAGTCAAATTAAGC3'), specially designed to access eukaryotic diversity.⁴⁴ PCR reactions for eukaryotes were conducted in a final volume of 25 µL, containing 2.5 µL of DNA, 12.5 µL of Master Mix PCR (Hot Start Taq - Qiagen) and 5 pmol of each primer. The amplifications occurred at 95 °C for 15 min, 35 cycles of 95 °C for 45 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and final extension at 72 °C for 10 min. Duplicates assembled from the PCR products of each treatment were subjected to a new PCR for addition of barcodes (10 pmol). The volume of Master Mix PCR was duplicated and 10 µL of DNA and 10 pmol of primer R1200 were added to 50 µL final volume and reamplified with a 10 cycle program. The amplicons were visualized on agarose gel (1 %), stained with SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA), compared to the 1500 bp molecular weight marker (FastRuler LR - Fermentas) and the images visualized on the Gel Logic 112 Imaging photodocumentator System with Molecular Imaging software v5 (Carestream, Woodbridge, CT). Both barcode PCR products (Prokaryotes and Eukaryotes) were purified using Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) and quantified using spectrophotometry with Nanodrop (Thermo) equipment at 260/280 nm according to the manufacturer's instructions. The amplicons were mixed and adjusted to the same concentration for high throughput sequencing using the Illumina MiSeq, paired end (2x250) sequencer at the Oklahoma Medical Research Foundation (Oklahoma City, OK, USA).

Bioinformatics

The sequenced 16S rRNA and 18S rRNA gene libraries were analyzed using the QIIME software version 1.9 bioinformatics package developed for analysis and comparison of microbial communities.⁴⁵ Briefly, after sequencing, the libraries were joined (forward and reverse sequences) using as a parameter 3% difference and minimum size of 50nt fragment⁴⁶ with the software USEARCH 6.1.⁴⁷ The barcodes were removed and the remaining sequences selected and grouped into Operational

Taxonomic Units (OTUs) with 97% similarity.⁴⁷ Sequences were aligned using the Silva 111 database following standard QIIME formatting⁴⁸ and taxonomic identification was performed through the Ribosomal Database Project (RDP Naive Bayesian classifier).⁴⁹ PCR chimeras were identified and removed using UCHIME (USEARCH 6.1) and the representative non-chimeric sequences were pooled into OTUs with 97% similarity using UCLUST.⁴⁷ As the number of reading sequences varies among the samples, the rarefaction calculation was applied to determine beta diversity using EMPEROR⁵⁰ and principal coordinates analysis (PCA) was performed from weighted and unweighted UNIFRAC calculations.⁵¹ Abundances of OTUs were analyzed using ANOVA with a 95% confidence interval and the means compared by the Tukey Test using the XLSTAT-Pro 2014 program.

Nucleotide Sequence Accession Numbers: the sequences obtained were deposited in the GenBank database with the NCBI SRA Study accession number SRP100655 under Bioproject number PRJNA353038 and Submission number according biomarker experiment SUB2085290 (16S rRNA) and SUB2441092 (18S rRNA).

UPLC-HRMS

Triplicates of the water phase of the inoculated treatment were mixed and a composite mixture for each storage time and sulfur content produced. Aliquots of 2.4 mL were acidified with 10 μ L of 4M HCl and the organic phase extracted twice with 3 mL of ethyl acetate (HPLC grade, Sigma Aldrich). The organic phase was dried under constant evaporation using a ultrapure stream of N₂ and the final residues were suspended in 100 μ L of isopropanol (Sigma Aldrich).

To identify microbial metabolites indicative of hydrocarbon and ester degradation, UPLC / HRMS was used, composed of an Agilent 1290 Infinity UPLC chromatograph coupled to a mass spectrometer (MS) Agilent 6538 with Q-ToF detector of quadrupole time of flight with a double electrospray ion source. 5 μ L of each sample was injected and these were processed in the positive ion mode according to the following MS parameters: 350 °C gaseous ion source temperature; 3500V capillary voltage; 160V shredder voltage; 50-1100 m / z range; 4 GHz data acquisition rate and 1 spectrum per second. Positive ion mode MS parameters were a SeQuant RZIC R-HILIC (5 μ m, 150 \times 4.6 mm, The Nest Group, Inc., Mass., USA) column with flow rate of 0.3 mL / min. Acetonitrile linear gradient from 80 to 20 % was used for the first 30 min, followed by 5 % acetonitrile for an additional 8 min. In order to promote the

formation of the electrospray positive ion, solvents containing 0.1 % formic acid were used.

Metabolomics identification

The raw data obtained from the mass spectrometer were processed using the IDEOM version 19 application.⁵² IDEOM uses advanced processing tools for peak detection and peak alignment between triplicates, such as XCMS Centwave⁵³; filtering and data storage (peakML format) use mzMatch.⁵⁴ Alignment of the compounds was performed with a retention time of 0.5 min and the mass error interval was 5 ppm according to the statistics R program.⁵⁵

Alignment of the peaks was performed separately for each sulfur content. The different peaks were determined to be formed from the same compound based on the molecular mass. After identification of the isotope peaks and assignment to the reference peak, a list of compounds is obtained from the molecular weight. The compounds detected in the IDEOM database were compared with the metabolites of the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG).⁵⁶ The putative metabolites identified via IDEOM were compared with the Pathos database of Pathoshttp://motif.gla.ac.uk/Pathos/pathos.html⁵⁷ and interactive pathways plot (TOC Abstract art) was used by Interactive Pathways Explorer (iPath) v2.⁵⁸⁻⁵⁹ Principal Components Analysis (PCA) and HCA combined with heat mapping were used to correlate the likely metabolites with sulfur content using MetaboAnalyst 3.0 web server.⁶⁰

6.3 Results

6.3.1 Microbial growth

Dry weights of the biomass formed at the interface over time in the B10 blends are shown in Figure 1. In the low contamination treatment (as-received), the resident microbial population was low from the beginning, similar to the controls (sterile oil and water phase), independent of sulfur content ($p < 0.05$). The exception occurred at 20 days when ULSD presented high microbial biomass. This may be related to occasional contamination of the microcosm since we work with destructive repetitions and this isolated fact does not represent the totality of the results. In general, the high contamination (inoculated) treatment produced higher biomass compared to controls over time. At the initial time (10 days), UHSD produced the highest biomass (~ 11 mg) and was significantly higher than ULSD and HSD ($p < 0.05$). However, over time no

differences were observed in biomass production between the different sulfur contents ($p > 0.05$). At the end of 40 days, HSD had the highest production of microbial biomass (~ 12 mg).

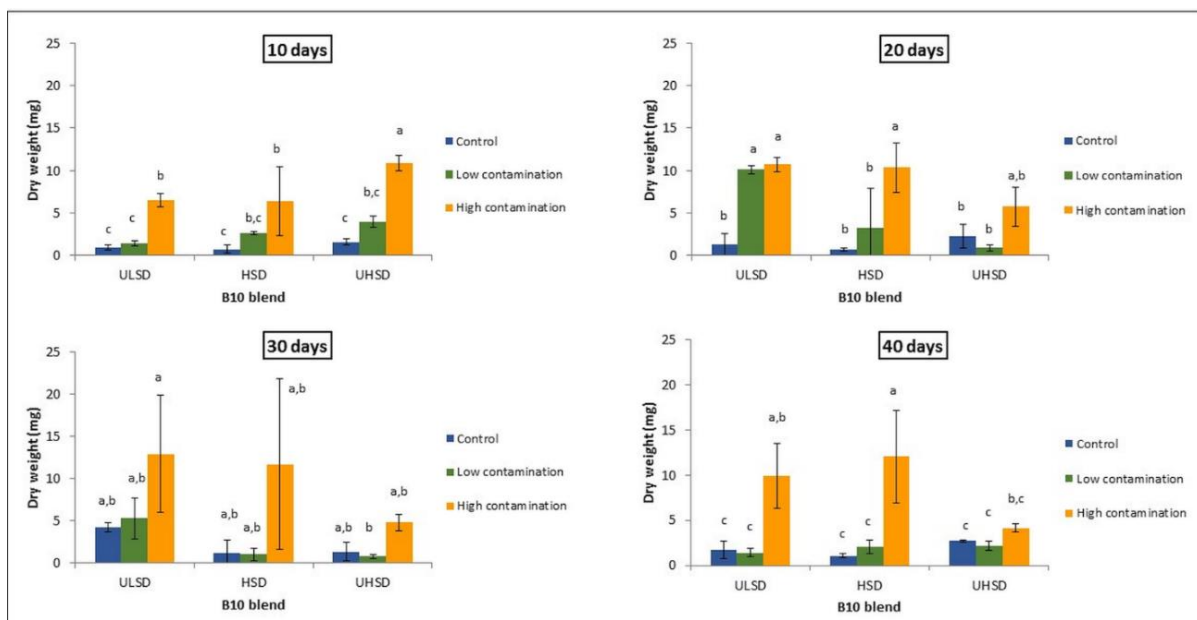


Figure 1. Interfacial biomass formed in B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur), in the control (sterile), as-received ($\sim 10^3$ CFU L⁻¹) and inoculated ($\sim 10^6$ bacterial cells and fungal spores mL⁻¹) treatments during simulated storage for 10, 20, 30 and 40 days. Means followed by the same letter do not differ at 5 % probability by Tukey test. Error bars represent the standard errors of triplicate incubations.

6.3.2 Diesel and biodiesel degradation (HATR/FTIR and ¹H NMR analyses)

After 40 days of storage, infrared spectroscopy detected structural changes in the various sulfur content B10 blends that could be related to the terminal methyl esters of the biodiesel fatty acids, produced by degradation. All treatments underwent molecular alterations, but the low contamination (as-received) condition showed a lower degradation tendency than the high contamination treatment (Figure S1, SI). Among the different sulfur contents, the ULSD B10 blend (Figure S1A, SI) showed minor changes, similar to time zero. The HSD B10 blend (Figure S1B, SI) showed the greatest change, indicative of degradation (Figure S1C, SI).

¹H NMR analysis for the B10 blend indicated a reduction in the O-CH₃ signal group, corresponding to the ester portion of the biodiesel, suggesting degradation of biodiesel in the ULSD, UHSD and HSD B10 blends of approximately 23 %, 39 % and 50 % respectively, between zero to 40 days. Similarly, there was a reduction of the

aromatic hydrogens present in the diesel fraction of approximately 26 %, 35 % and 46 % for ULSD, UHSD and HSD B10 blends, respectively; this may be due to degradation or conversion to aromatic products with more substituted rings (Table S2, SI).

Figure 2A confirms the observed degradation of B10 blend, showing the terminal methyl of biodiesel (~ 3.70 ppm chemical shift) with a reduced peak at 40 days (red) compared to time zero (blue), as observed in the area corresponding to the aromatic hydrogens of B10 (~ 6.82 - 7.2 ppm chemical shift), with reduction of the initial (red) and 40 day (blue) time signals in Figure 2B. In view of these results, we can suggest that the HSD B10 blend underwent greater degradation of the ester and aromatic hydrogen portion than ULSD and UHSD B10 blend.

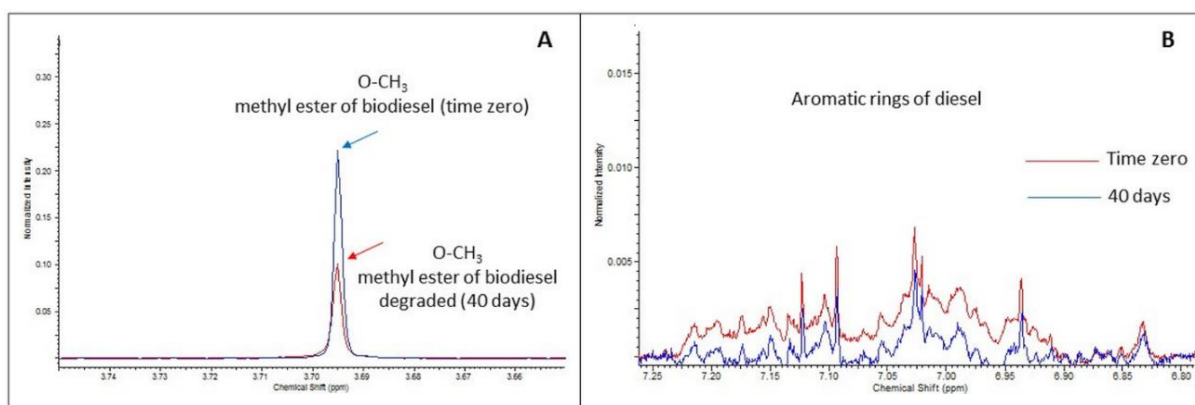


Figure 2. Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectrum (^1H NMR) for the oil phase of the HSD B10 blend from the high contamination (inoculated) treatment. **A:** Biodiesel degradation at time zero (blue) and at 40 days (red). **B:** Diesel degradation time zero (red) and at 40 days (blue).

6.3.3 Microbial community profile

16S rRNA gene

Sequencing of the 16S rRNA gene revealed a total of 1979014 sequences for the initial inoculum and samples from the interfaces and water phases of the high contamination treatment of all sulfur contents and times. There were 3024 Operational Taxonomic Units (OTUs) with 97% similarity, with valid sequences identified as: 23 phyla, 60 classes, 129 orders, 223 families and 395 genera; however, a portion of the OTUs (0.25 %) could not be classified into any taxon. The domain Archaea was detected with low relative abundance (< 0.01 %), the domain Bacteria predominating in all treatments (> 99.99 %).

Table S3 (SI) shows the average relative abundance of the taxonomic groups (phylum to family) found at above 0.01 % in the initial inoculum and high

contamination treatment of the water phase and interface at 10-40 days. In general, the phylum Proteobacteria showed the highest relative abundance, followed by the Firmicutes. The Bacteroidetes, Actinobacteria and Cyanobacteria phyla were also found, but representing less than 1 %.

The average relative abundance of the genera detected by 16S rRNA gene sequencing is visualized in Figure 3.

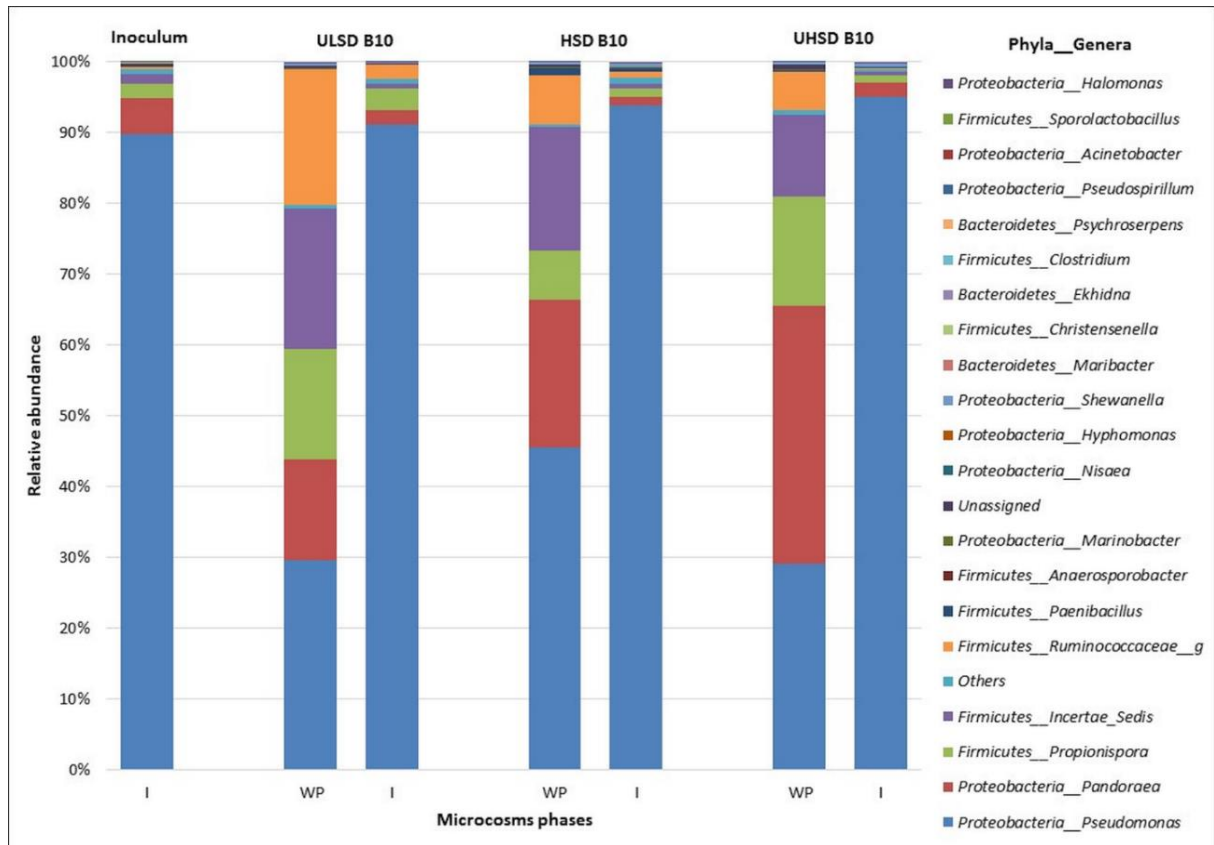


Figure 3. Mean of the relative abundance between 10, 20, 30 and 40 days obtained by 16S rRNA gene sequencing, for the bacterial genera found in the initial inoculum (time zero) and high contamination (inoculated) treatment in the B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) in the interface (I) and water phase (WP) microcosm.

In the initial inoculum used in the experiment, 20 genera with relative abundance greater than or equal to 0.01 % were highlighted. Among them *Pseudomonas* (~90 %), *Pandoraea* (~5 %), both Proteobacteria, and *Propionispora* (2 %), in the Firmicutes, were the most abundant. *Incertae sedis* (Firmicutes) position appeared with 1.4% relative abundance. The other genera appeared with less than 1 % relative abundance (0.45 % - 0.01 %), *Ruminococcaceae_g* (Firmicutes); *Paenibacillus* (Firmicutes), *Anaerosporobacter* (Firmicutes), *Marinobacter*

(Proteobacteria), *Nisaea* (Proteobacteria), *Hyphomonas* (Proteobacteria), *Shewanella* (Proteobacteria), *Maribacter* (Bacteroidetes), *Christensenella* (Firmicutes), *Ekhidna* (Bacteroidetes), *Clostridium* (Firmicutes), *Psychroserpens* (Bacteroidetes), *Pseudospirillum* (Proteobacteria), *Acinetobacter* (Proteobacteria), *Sporolactobacillus* (Firmicutes) and *Halomonas* (Proteobacteria) stood out, but many were classified as less than 0.01 % (0.60 %) or not classified within the proposed genera (0.06 %).

In the interfacial regions of the initial inoculum and those of the various sulfur content fuels there was a similar pattern for the three most frequent genera over time, with *Pseudomonas* occurring at over 91 % in the samples (Figure 3). On the other hand, in the water phase samples *Pandoraea* and *Propionispora* were favored, increasing at least 5 times in average relative abundance between the different sulfur contents, while *Pseudomonas* was dramatically reduced (about 50 %) between the treatments. Thus, the abundance of *Pseudomonas* is inversely proportional to the abundance of *Pandoraea* and *Propionispora* (Figure 3). This pattern is maintained at 40 days (Table S4 - SI), when there is a significant difference ($p < 0.05$) in the relative abundance of the *Pseudomonas*, *Pandoraea* and *Propionispora* genera in relation to growth in the interface and water phase, showing that the collection region determines the abundance of the bacterial genera. Sulfur content, however, did not significantly influence ($p > 0.05$) the abundance of *Pseudomonas*, *Pandoraea* and *Propionispora* in the interface. For the water phase, the data suggest that ULSD B10 had reduced abundance of *Pseudomonas*, compared to the two genera cited, and *Propionispora* showed a significant difference in growth in both ULSD and HSD and UHSD B10 blend ($p < 0.05$) (Table S4, SI).

18S rRNA gene

18S rRNA gene sequencing showed that the Ascomycota was the major phylum in all samples analysed, with about 76 % relative abundance, followed by Basidiomycota with about 2 %. Organisms not classified into any taxon comprised 3 % and those that were identified as other organisms from the Eukarya domain were about 20 %. The most prevalent classes at the interface and water phase in the different sulfur contents and initial inoculum over time are presented in Figure 4. In general, it can be observed that Eurotiomycetes was the most prevalent in the interface and Saccharomycetes in the water phase samples. The initial inoculum (time zero), with DNA from the original interfacial biomass, was marked by the massive presence of Saccharomycetes (~ 63 %) and Eurotiomycetes (~ 17 %), both belonging to the phylum

Ascomycota. ULSD B10 uniquely presents the class Agaricomycetes (Basidiomycota) in the water phase, with approximately 11 % average relative abundance. In addition, ULSD B10 showed the highest relative abundance of unclassified microorganisms that may be related to other non-cultivable eukaryotic microorganisms. Both in the water phase and interface Saccharomycetes was more prevalent in HSD B10 than the other treatments. UHSD B10 water phase showed the most diverse composition: Saccharomycetes (~ 68 %), Eurotiomycetes (~ 4 %), Microbotryomycetes (~ 1.3 %), Sardariomycetes (~ 0.5 %) and Exobasidiomycetes (3 %) (Figure 4). At 40 days, the relative abundance of Saccharomycetes differed significantly between the water phase and interface ($p < 0.05$) in ULSD and HSD. For Eurotiomycetes, this difference was found only in ULSD B10 blend ($p < 0.05$), suggesting that ULSD may have favored its growth at the interface and of Saccharomycetes in the water phase (Table S5, SI).

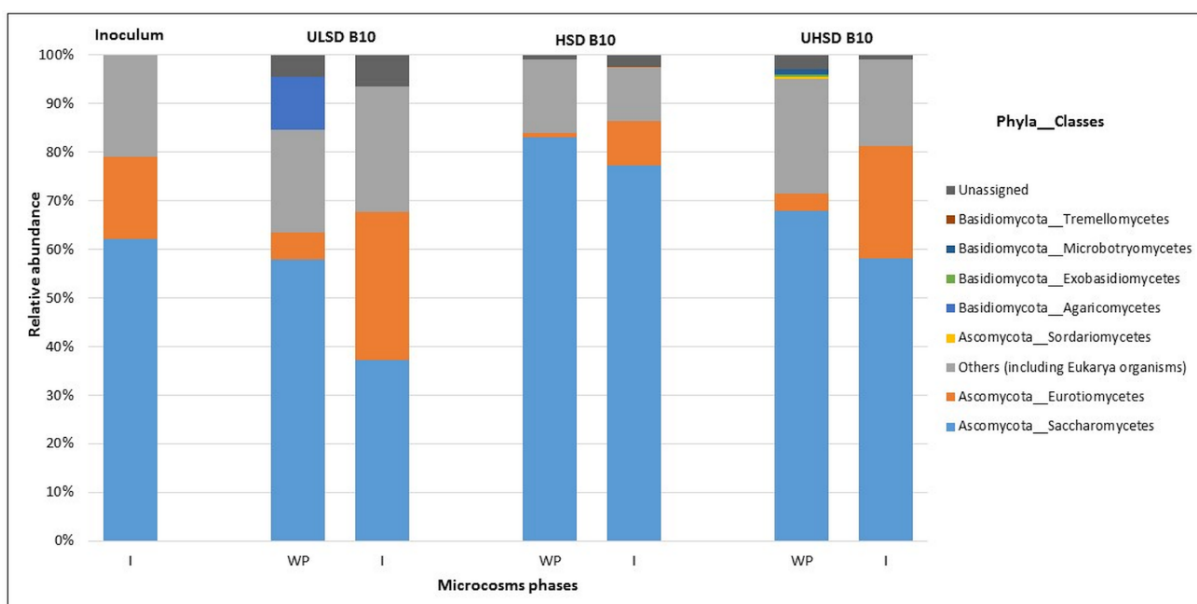


Figure 4. Mean of the relative abundance between 10, 20, 30 and 40 days obtained from 18S rRNA gene sequencing, for the fungal classes found in the initial inoculum (time zero) and high contamination (inoculated) treatment in the B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) in the interface (I) and water phase (WP) microcosm.

6.3.4 Metabolic profile

A large number of compounds were detected by UPLC / Q-ToF-MS in the high contamination (inoculated) water phase samples of the B10 blends. After filtering the data, the non-informative variables were removed, resulting in 2956 compounds for the ULSD B10 blend samples; 3226 compounds for the HSD B10 blend and 2860

compounds for the samples of UHSD B10 blend. Such compounds were used as a basis in the metabolic survey and putatively identified by comparison with the metabolites and other compounds listed in the KEGG database. Initially the profile of the samples was traced, looking for metabolites related to general microbial metabolism and then for signature metabolites of hydrocarbon and FAME degradation.

The main metabolic pathways detected in the samples at 40 days are represented in Table S6 (SI). We selected 29 pathways containing at least 5 putative metabolites responsible for activation in one or more metabolic pathways; amino acid, lipid, terpenoid /polyketide metabolism were the most representative. Amino acid metabolism contains metabolites responsible for the primary activation of amino acids, vitamins, glycerophospholipids, sulfur and nitrogen. In lipid metabolism, there are metabolites related to pathways of primary activation of organic acids, including fatty acids and steroids, and in terpenoid / polyketide metabolism, there are metabolites related to antimicrobial function. Among the pathways detected are also biosynthesis of other secondary metabolites, carbohydrate metabolism, genetic information, cofactor and vitamin, aromatic degradation and degradation of xenobiotics metabolism.

The lipid metabolic pathways represent important information related to metabolism and biosynthesis of fatty acids. The PCA analysis showed that, at 40 days, all high contamination treatment samples were grouped differently from the controls (sterile) and from the blank represented by Bushnell-Haas mineral medium at time zero (Figure 5). The overall view of the PCA with the analysis of five main components of the samples can be seen in Figure 5A; the greater differentiation is due to components PC1 and PC2, which together represent more than 70% variation (Figure 5B). Among the different sulfur contents, UHSD B10 blend showed the most evident separation between the produced metabolites, controls and blank. Similarly, hierarchical clustering analysis combined with heat mapping made it possible to see a higher abundance of certain lipid metabolites (represented in red in the color map) than in the controls and the blank, which are represented in blue (low abundance) and vice versa. BH medium (time zero), however, had a profile more similar to the treatments than to the controls (Figure 5C).

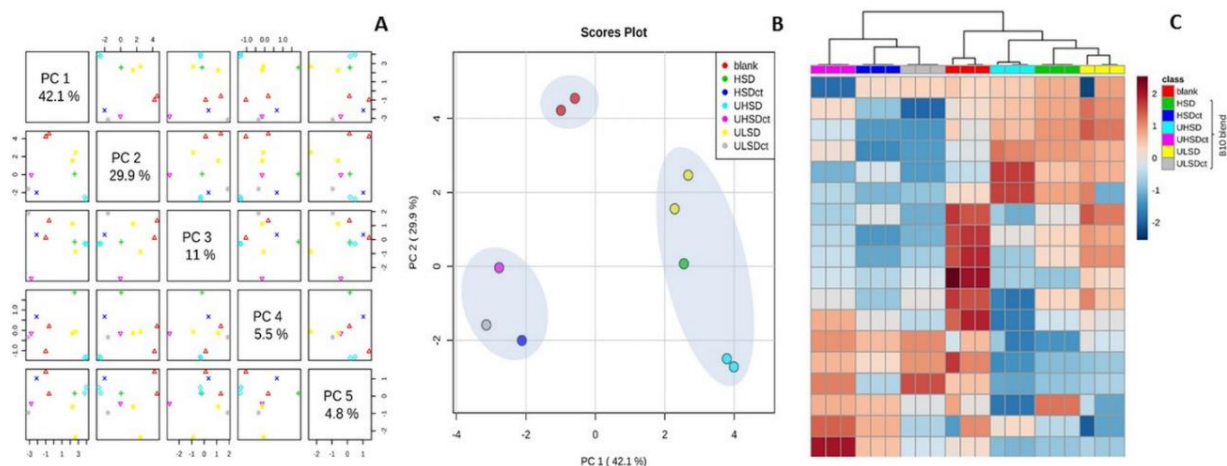


Figure 5. Distribution profile of putative lipid metabolites detected in the water phase of the high contamination (inoculated) treatment in the B10 blend with different sulfur contents at 40 days. **Treatments:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur), HSD (≤ 500 ppm sulfur), UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); **Controls** (sterile): ULSDct; HSDct; UHSDct; **Blank:** mineral medium Bushnell-Hass. **A:** Overview of PCA (PC 1 - PC 5); **B:** PCA with PC 1 and PC 2 score plot; **C:** hierarchical clustering analysis combined with heat mapping.

The putative fatty acid biosynthesis metabolites identified in each sample at 40 days were selected and are shown in Table 1. Both saturated and unsaturated fatty acids were observed with even carbon numbers varying between C₈-C₂₂. Among the 16 fatty acids detected, myristic acid (tetradecanoic acid), palmitic acid (hexadecanoic acid), stearic acid (octadecanoic acid), oleic acid [(9Z)-octadecenoic acid], linoleic acid (linoleate) and α -linolenic acid [(9Z, 12Z, 15Z)-octadecatrienoic acid] were found in all samples, with relative abundances between 2 -10 times above the controls ($p < 0.05$), and corresponding the typical starting FAME of soybean biodiesel (Figure 6). The C₈-C₁₂ carbon group was particularly related to sulfur content, without showing a homogenous distribution pattern. The C₂₀₋₂₂ carbon group was detected in very low abundance compared to controls ($p < 0.05$) and was not detected in some treatments, except for arachidic acid (icosanoic acid) and euricic acid [(13Z)-docosenoic acid], which was 10 times more abundant in ULSD/UHSD and HSD B10 treatments than controls, respectively.

Table 1. Putative fatty acids identified in the water phase of B10 with various sulfur levels at 40 days.

FATTY ACIDS		B10 blend treatments*		
Chemical name/Formula	Common name/ Abbreviation	ULSD	HSD	UHSD
Octanoic acid (C ₈ H ₁₆ O ₂)	Caprylic acid (C8:0)	↑	=	Nd
Decanoic acid (C ₁₀ H ₂₀ O ₂)	Capric acid (C10:0)	=	↓	Nd
Dodecanoic acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	Lauric acid (C12:0)	↑	=	↑
Tetradecanoic acid (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	Myristic acid (C14:0)	↑	↑	↑
Hexadecanoic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	Palmitic acid (C16:0)	↑	↑	↑
(9Z)-Hexadecenoic acid (C ₁₆ H ₃₀ O ₂)	Palmitoleic acid (C16:1)	=	↑	=
Octadecanoic acid (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	Stearic acid (C18:0)	↑	↑	↑
(9Z)-Octadecenoic acid (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	Oleic acid (C18:1)	↑	↑	↑
Linoleate (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	Linoleic acid (C18:2)	↑	↑	↑
(9Z, 12Z, 15Z)-Octadecatrienoic acid (C ₁₈ H ₃₀ O ₂)	α-Linolenic acid (C18:3)	↑	↑	↑
Abietic acid (C ₂₀ H ₃₀ O ₂)	Abietate	↓	Nd	Nd
Icosanoic acid (C ₂₀ H ₄₀ O ₂)	Arachidic acid (C20:0)	↑	Nd	↑
Icosadienoic acid (C ₂₀ H ₃₆ O ₂)	Ethyl linoleate (C20:2)	↓	↓	Nd
Icosatrienoic acid (C ₂₀ H ₃₄ O ₂)	Eicosatrienoic acid (C20:3)	↓	↓	↓
Docosanoic acid C ₂₂ H ₄₄ O ₂)	Behenic acid (C22:0)	Nd	Nd	↑
(13Z)-Docosenoic acid (C ₂₂ H ₄₂ O ₂)	Erucic acid (C22:1)	↑	↑	↑

†Total: 13/15 11/13 11/12

*Relative abundance of the metabolites changed in relation to the control (sterile). A p-value of 0.05 was used to determine whether at least two-fold higher (↑) or at least two-fold lower (↓) change was statistically significant.

Red arrow (↑): relative abundance 10-fold higher compared to controls.

The metabolite is considered "detected" in a sample if its relative abundance is at least 0.1%.

Equal (=): without changes in relative abundance compared to controls (sterile).

Nd: not detected.

†Number of putative metabolites that changed in relative abundance compared to controls at 40 days/Total number of putative metabolites detected for each treatment at 40 days.

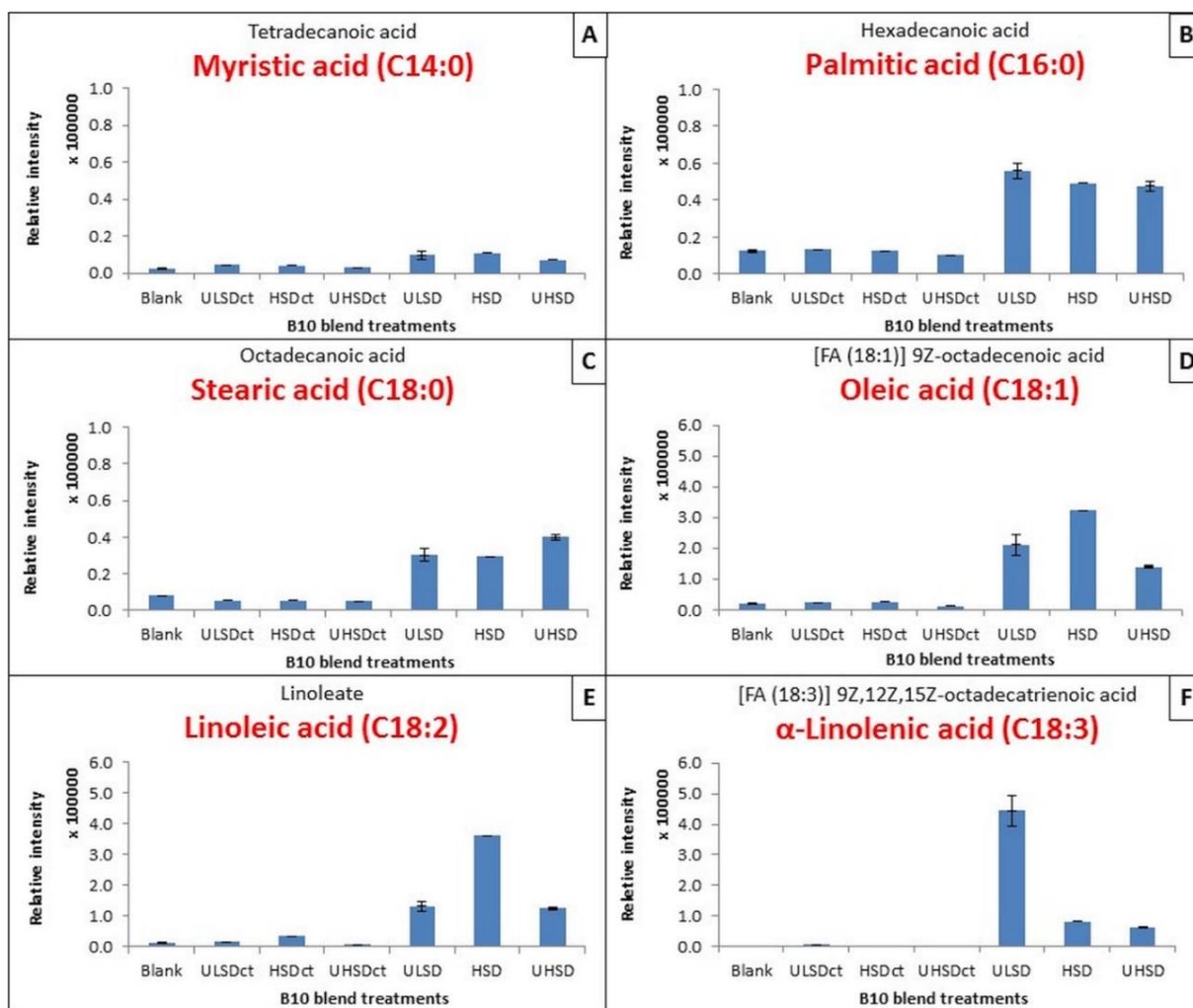


Figure 6. Relative abundance of putative fatty acids (lipid metabolism) identified in the water phase of the high contamination (inoculated) treatment of B10 blend with different sulfur contents at 40 days. **Treatments:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur), HSD (≤ 500 ppm sulfur), UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); **Controls** (sterile): ULSDct; HSDct; UHSDct; **Blank:** mineral medium Bushnell-Hass. **A:** Myristic acid (Tetradecanoic acid); **B:** Palmitic acid (Hexadecanoic acid); **C:** Stearic acid (Octadecanoic acid); **D:** Oleic acid ([FA (18:1)]9Z-ctadecenoic acid); **E:** Linoleic acid (Linoleate); **F:** α -Linolenic acid ([FA(18:3)]9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid). Relative intensity varies according to mean of peak intensity for each putative metabolite. Fatty acids A-C were detected in low abundance (1.0×100000) compared to fatty acids D-E in high abundance (6.0×100000), but statistically different from controls ($p < 0.05$).

6.4 Discussion

The biodegradability of biodiesel has been well reported in the literature.^{12,16-18,20,22,61,62} However, its relationship to sulfur levels in diesel is little studied. There is some disagreement on this issue, but, in fact, the removal of sulfur from pure diesel has not been shown to be responsible for increased microbial

contamination.^{30,31} On the other hand, some authors have reported that, in diesel/biodiesel blends, ULSD becomes more susceptible to biodeterioration⁶³ and the addition of biodiesel is directly proportional to microbial growth.²⁷ In the current work, degradation was shown in all treatments irrespective of sulfur content. However, HSD B10 blend produced greater microbial biomass and higher reduction of terminal methyl and aromatic hydrogens after 40 days, indicative of increased degradation (Figures 1, 2 and Table S2, SI). The fuels used in this experiment showed variations in the maximum sulfur content within each category: ULSD B10 blend (6.3 ppm sulfur), HSD B10 blend (327 ppm sulfur) and UHSD B10 blend (861 ppm sulfur) (Table S1, SI), conforming to ANP 04/2013 specifications.⁶⁴ These differences are the result of the desulfurization process, which causes molecular changes in the fuel. In addition to the origin of the oil, the introduction of biodiesel and the presence of water, shown here to be within the limits of 200 ppm for the blend⁶⁵ (Table S1, SI), are factors that should be considered.³¹ Biodiesel is more easily metabolized than diesel owing to the presence of fatty acid methyl esters (FAME) that are recognized and attacked by enzymes such as acetylCoA dehydrogenase,¹⁰ as well as autoxidation in the presence of moisture and oxygen, generating sediments of a chemical nature (gums, monoglycerides, sterol-glycosides, inorganic compounds, organic and inorganic acids), hygroscopicity and solvency power.^{19,29,33,66} Diesel contains large amounts of alkanes (C₁₀-C₂₀), among others functional groups, without the oxygen bound in the terminal portion, thus requiring microorganisms capable of producing specific enzymes for the recognition of this type of complex molecule.⁶¹ Such differences in fuel composition thus also interfere in biodegradability^{32,67} and when biodiesel is added to diesel, new characteristics are created generating organic and inorganic particulates.^{29,66}

Microbial diversity in petroleum hydrocarbons and their derivatives depends on a number of factors, such as composition of the molecule, bioavailability of the compounds to the microorganisms, enzymatic specificity and abiotic factors like aeration, temperature, humidity, nutrients and pH.^{8,68,69,71} In the current research, of the 20 bacterial genera identified 70 % were directly related to the contamination and / or biodegradation of fuels.^{17,18,31,68,72-74,75,76} The other genera (*Anaerosporebacter*, *Maribacter*, *Christensenella*, *Ekhidna*, *Psychroserpens*, *Pseudospirillum*) have not yet been described in this area. They may not have been recognised by previously used methods. However, it must be pointed out that the DNA of these organisms detected

by the high throughput sequencing technique could have been extracellular (eDNA) from other sources of contamination.

The variation in *Pseudomonas* distribution observed over time, mainly in the interface, may be related to the availability of oxygen within the microcosm. Oxygen is normally present in distilled fuels due to rotation occurring inside the tanks, creating a gradient of microbial distribution.²⁸ Aerobic microorganisms preferentially occupy the oil / water interface and the water phase, while the facultative anaerobes or anaerobes can be found in the bottom of the tanks and in biofilms on the walls.^{8,29,68,72} In the case of *Pandora* (Proteobacteria), which is an aerobic bacterium, the distribution pattern showed preferential location in the water phase. *Propionispora* (Firmicutes) is an endospore producing, obligatory anaerobic genus. It was detected strongly in the water phase, and most likely adhered to the exopolysaccharide matrix of the biofilm. Aerobic and facultative anaerobic microorganisms can grow on extracellular polymeric substances (EPS), removing oxygen and creating an anoxic environment in which sulfate reducing bacteria (SRB) and strict anaerobes can grow.⁷⁷ *Pseudomonas aeruginosa* is an aerobic or facultatively anaerobic bacterium that produces at least three types of polysaccharides (alginate, Pel and Psl) that determine the stability and structure of the biofilm.⁷⁸ Thus, in the water phase, we may suggest that the *Pseudomonas* biofilm may have provided protection and additional nutrients supporting the growth of *Pandora* and *Propionispora* with population fluctuations of *Pseudomonas* over time (Figure 3). Aktas et al.⁷⁹ obtained similar results with the change from an aerobic marine microflora to typical anaerobic groups such as *Clostridium* and Deltaproteobacteria after incubation with fossil fuels and biofuels.

Of the 7 classes of fungi identified, all were directly or indirectly related to the contamination and / or biodegradation of fuels.^{18,68,80-82} In this work the bacterial community was more diverse than the fungal. Similar results were also observed by Soriano et al.¹⁸ The availability of minerals such as nitrogen, phosphorus and iron are a limiting factor, especially for fungal species.²⁸ After 40 days, the reduced concentrations of oxygen, metabolites and nutrients would have limited the development of an extensive fungal community. Filamentous fungi are found more frequently at the oil / water interface,⁶⁸ as observed in this experiment with the Eurotiomycetes and yeast fungi (Saccharomycetes) in the aqueous phase.

The production of primary microbial metabolites occurs during the cell synthesis phase and is related to vital functions; secondary metabolites are

synthesized in a post-growth phase and are related to physiological, social or predatory adaptation.⁸³ We identified important metabolic pathways for putative primary and secondary metabolites activated during cell growth and maintenance (amino acids, cofactors and vitamins, carbohydrates, lipids), related to genetic information (translation), as well as antimicrobials (terpenoids and polyketides), degradation of aromatic compounds (1,4-dichlorobenzene) and other xenobiotics (benzoate via hydroxylation) (Table S6, SI).

The 16 putative saturated and unsaturated fatty acids detected (Table 1) may have been intermediates formed during degradation of alkanes by aerobic and anaerobic microorganisms, or produced by hydrolysis of FAME components and subsequent β -oxidation. The degradation data of the oil phase, obtained from the infrared analysis (Figure S1, SI) and ¹H NMR (Table S2, SI), point to degradation in all the treatments independent of sulfur content, but with different intensity than in controls. Metabolomic identification using UPLC / Q-ToF-MS detected the putative fatty acids myristic (tetradecanoic acid), palmitic (hexadecanoic acid), stearic (octadecanoic acid), oleic [(9Z) -octadecenoic acid], linoleic (linoleate) and α -linolenic (9Z, 12Z, 15Z-octadecatrienoic acid) (Figure 6). These showed significant relative abundance in all sulfur-containing blends compared to controls ($p < 0.05$), suggesting that they are degradation products of the corresponding fatty acids of methyl esters found in soybean biodiesel. Similar results evaluating aerobic and anaerobic biodegradation of bio and petroleum based fuels were obtained by Vieira et al.⁸⁴ and Aktas et al.^{21,79}

There were differences detected in the metabolomics results of the various sulfur-content fuels. The presence of likely metabolites may be related to the ease of feedstock origin degradation. For example, HSD B10 blend had the greatest degradation of the ester (Figure 2A) with higher aromatic hydrogens portion (Figure 2B), significant biomass production (Figure 1), and high relative abundance of putative oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18: 2) (Figure 6). Soybean biodiesel has more than 80 % unsaturated fatty acids in its composition and C18:1 and C18:2 are the major ones.⁸⁵ Carbon chain-length $\geq C_{15}$ and unsaturated FAMEs are more biodegradable than short-chain and saturated FAMEs.²⁹ Our study showed that unsaturated fatty acids (C18:1:2:3) were detected with greater relative abundance (6.0×100000) than saturated fatty acids (1.0×100000) (Figure 6) suggesting that FAME B10 blends are much more important for microbial degradation than are differences in sulfur content.

Hexanoic, octanoic and decanoic acid are particularly diagnostic metabolites associated with either aerobic or anaerobic *n*-alkane degradation.³⁴ In this work, the abundance of caprylic acid (octanoic acid), with eight carbons, was 10 times higher in ULSD B10 blend than in its controls ($p < 0.05$). In biodegradation of biodiesel, lipase and esterase microbial enzymes act as catalysts for the hydrolysis of the methyl or ethyl ester, resulting in a fatty acid and an associated alcohol. Fatty acids are incorporated into microbial cells by β -oxidation processes that promote the successive shortening of the fatty acid at the carboxyl end of the molecule.^{10,84} Based on these results, we can infer that this acid intermediate represents a low molecular weight residue with two carbon atoms less than the precursor. Capric acid (decanoic acid), with 10 carbons, was detected with low relative abundance in HSD B10 blend compared to controls ($p < 0.05$), suggesting that this and other short chain fatty acids related to aerobic degradation metabolism of *n*-alkanes and esters may have been produced and metabolized, although not detected by the UPLC / Q-ToF-MS technique. Monoaromatic signature metabolites (benzoic acid, cresol) were also below the limit of detection by the technique employed. A probable explanation for the detection of reduced amounts of fatty acids in the controls is the partial migration of the methyl esters from the oil phase to the water phase^{15,79} that may have undergone abiotic degradation by inorganic oxidation, transformation, sorption by the glass flask, interactions with the components of the medium and volatilization.⁸⁶

The data obtained here are pioneering results in the attempt to elucidate and identify possible metabolites as biomarkers of microbial activities related to biocorrosion and biodeterioration of diesel and biodiesel blends. They should be used in the formulation of hypotheses and further investigated to assist in understanding these processes and in taking appropriate preventive measures to ensure the final quality of the fuel.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional tables and figures describing the characteristics of the fuels used in the experiment; degradation data of the diesel and biodiesel fraction using infrared and ¹H NMR; high-throughput sequencing for relative abundance data from 16S and

18S rRNA gene and overall metabolic pathways detected in B10 blend with different sulfur contents: ULSD, HSD, UHSD treatments. The following files are available free of charge.

Tables (S1 - S6, PDF) and Figure (S1, PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: alineoliboni@gmail.com; mailing address: Federal University of Rio Grande do Sul, #500 Sarmiento Leite, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; tel: +55 51 3308-3665.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment

We thank CAPES for financial support (40-2013 Edital of CNPq Biodiesel), a doctorate scholarship in Brazil and a scholarship abroad (doctorate sandwich) for Aline Oliboni de Azambuja. The research also received funding from the Office of Naval Research (Award N62909-14-1-N18) running at the University of Oklahoma - USA. We also thank Dr. Joseph M. Suflita, professor and director of the University of Oklahoma Biocorrosion Center, for his valuable support in conducting this research. The authors are grateful to Christine Gaylarde for reviewing the manuscript and Ipiranga Petroleum products for supplying fuel and technical support in Brazil.

References

- (1) Amends Law 13.033, dated September 24, 2014, to provide for the percentage of biodiesel added to the diesel sold in the national territory. Public Law 13.263, DOU 24.03.2016;
<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=24/03/2016>
- (2) ANP 50, dated December 23, 2013. Public Resolution No. 50, DOU 24.12.2013.
[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)

- (3) Stanislaus, A.; Marafi, A.; Rana, S. M. 2010. Recent advances in the science and technology of ultra-low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal. Today*. **2010**, *153*, 1-68.
- (4) Dunn, R. O. Fuel Properties of Biodiesel/Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) Blends. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1977–1987.
- (5) Grishin, D. F.; Zinina, N. D. Review: Environmentally Friendly Diesel Fuels with Low and Ultralow Sulfur Content and Additives to Them. *Russ. J. Appl. Chem.* **2015**, *88* (7), 1106–1121.
- (6) Moheballi, G.; Ball, A. Biodesulfurization of diesel fuels –Past, present and future perspectives. *Int. biodeter. Biodegr.* **2016**, *110*, 163-180.
- (7) Knothe, G; Steidley, K. R. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity. *Energ. Fuel.* **2005**, *19*, 1192-1200.
- (8) Yemashova, N. A.; Murygina, V. P.; Zhukov, D. V.; Zakharyantz, A. A.; Gladchenko, M. A.; Appanna, V.; Kalyuzhnyi, S. V. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2007**, *6*, 315–337.
- (9) Muñoz, M; Moreno, F; Monné, C; Morea, J; Terradillos, J. Biodiesel improves lubricity of new low sulphur diesel fuels. *Renew. Energ.* **2011**, *36*, 2918-2924.
- (10) Zhang, X.; Peterson, C.; Rhee, D.; Mbller, D.; Haws, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans. ASAE.* **1998**, *41*, 1423-1430.
- (11) Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Gaylarde, C. C.; Viscardi, S. L.; Menendez, A.; Daroda, R. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. *Rev. Biodiesel.* **2006**, *4*, 24-26.
- (12) Pasqualino, J. C.; Montané, D.; Salvadó, J. Syntetic effects os biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass. Bioenerg.* **2006**, *30*, 874-879.
- (13) De Mello, J. A.; Carmichael, C. A.; Peacock, E. E.; Nelson, R. K.; Arey, J. S.; Reddy, C. M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, *54*, 894–904.
- (14) Yassine, M. H.; Wu, S.; Suidan, M. T.; Venosa, A. D. Aerobic Biodegradation Kinetics and Mineralization of Six Petrodiesel/Soybean-Biodiesel Blends. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4619–4627; DOI 10.1021/es400360v.
- (15) Cazarolli, J. C.; Guzatto, R.; Samios, D.; Peralba, M. C. R.; Cavalcanti, E. H. S.; Bento, F. M. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2014**, *95*, 364-372; DOI 10.1016/j.ibiod.2013.09.025.
- (16) Zimmer, A.; Cazarolli, J. C.; Teixeira, R. M.; Viscardi, S. L. C.; Cavalcanti, E. H. S.; Gerbase, A.; Ferrão, F. M.; Piatnick, C. M. S.; Bento, F. M. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *Fuel.* **2013**, *112*, 153-162.

- (17) Bücken, F.; Barbosa, C. S.; Quadros, P. D.; Bueno, M. K.; Fiori, P.; Huang, C.; Frazzon, A. P. G.; Ferrão, M. F.; Camargo, F. A. O.; Bento, F. M. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2014**, *95*, 346-355; DOI 10.1016/j.ibiod.2014.05.030.
- (18) Soriano, A. U.; Martins, L. F.; Ventura, E. S. A.; Landa, F. H. T. G.; Valoni, E. A.; Faria, F. R. D.; Ferreira, R. F.; Faller, M.C. K.; Valério, R. R.; Leite, D. C. A.; CArmo, F. L.; Peixoto, R. S. 2015. Microbial aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2015**, *99*, 102-114.
- (19) Bento, F. M.; et al. Diagnóstico, monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle; Pinho, D. M. M., Suarez, P.A.Z., Eds.; Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação: Brasília, BR, 2016; pp 206.
- (20) Moreira de Souza, M.; Colla, T. S.; Bücken, F.; Ferrão, M. F.; Te Huang, C.; Andrezza, R.; Camargo, F. A. O.; Bento, F. M. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2016**, *110*, 141-146.
- (21) Aktas, D. F.; Lee, J. S.; Little, B. J.; Ray, R. I.; Davidova, I. A.; Lyles, C. N.; Suflita, J. M. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. *Energ. Fuel.* **2010**, *24*, 2924-2928.
- (22) Sørensen, G.; Pedersen, D. V.; Norgaard, A. K.; Sørensen, K. B.; Nygaard, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresource Technol.* **2011**, *102*, 5259-5264.
- (23) Wu, S.; Yassine, M. H.; Suidan, M. T.; Venosa, A. D. Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under methanogenic conditions. *Water Res.* **2015**, *87*, 395-402.
- (24) Wu, S.; Yassine, M. H.; Suidan, M. T.; Venosa, A. D. Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under sulfate-reducing conditions. *Chemosphere.* **2016**, *161*, 382-389.
- (25) Londry, K. L.; Suflita, J. M. Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 1119-1206.
- (26) Heldreth, B.; Turos, E. Microbiological properties and modes of action of organosulfur-based anti-infectives. *Curr. Med. Chem.: AntiInfect Agents.* **2005**, *4* (4), 295-315.
- (27) Dodos, G. S.; Konstantakos, T.; Longinos, S.; Zannikos, F. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. Proceedings of the 12th International Conference Science and Technology: Rhodes, GR, September 8-10, 2011. A431-439.
- (28) Srivastava, N. K.; Nandan, N. K. Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. *IJEPR.* **2012**, *1* (1), 119-125.
- (29) Passman, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2012**, *81*, 88-104.

- (30) Lyles, C. N.; Aktas, D. F.; Duncan, K. E.; Callaghan, E. V.; Stevenson, B. S.; Suflita, J. M. Impact of Organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 6052-6062.
- (31) Azambuja, A. O.; Bücken, F.; Quadros, P. D.; Zhalnina, R. D.; Vacaro, B. B.; Correa, C.; Ferrão, M. F.; Camargo, F. A. O.; Triplett, E.; Bento, F. M. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying sulfur content, using high-throughput sequencing. *Fuel.* **2017**, *189*, 340-349.
- (32) Suflita, J. M.; Lyles, C. N.; Aktas, D. F.; Sunner, J. Biocorrosion issues associated with the use of ultra-low sulfur diesel and biofuel blends in the energy infrastructure. in *Understanding biocorrosion: fundamentals and applications*; Liengen, T., Feron, D., Basseguy, R., Beech, I.B., Eds.; European of Corrosion (EFC): Elsevier Science, 2014.
- (33) Alsopp, D.; Seal, K.; Gaylarde, C. C.; Bento, F. M.; Shirakawa, M.; Saad, D. S. *Introduction to Biodeterioration*, 1st, ed.; UFRGS: Porto Alegre, BR, 2016.
- (34) Bonifay, V.; et al. Metabolic profiling and metabolomic procedures for investigating the biodegradation of hydrocarbons. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Genetic, Genomic and System Analyses of Communities*; McGenity, T. J., Timmis K. N., Nogales, B., Eds.; Springer Protocols Handbooks: 216, pp 111-161; DOI 10.1007/8623_2016_225.
- (35) *ASTM D6304. Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils and Additives by Coulometric Karl Fisher Titration*; ASTM International: West Conshohocken, PA, 2011, www.astm.org.
- (36) *ASTM D5453. Determination of Total Sulphur in Light Hydrocarbons, Motor Fuels and Oils by Ultraviolet Fluorescence*; ASTM International: West Conshohocken, PA, 2002, www.astm.org.
- (37) *EN 14078. Liquid petroleum products. Determination of fatty acid methyl ester (FAME) content in middle distillates. Infrared spectrometry method*; European Standards: 2014, <https://www.en-standard.eu>
- (38) Hill, E. C; Hill, G. C. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. *Proceedings of the 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels - IASH: Prague, CZ, October, 2009.* 1525-1580.
- (39) *ASTM E1259-10. Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C*; ASTM International: West Conshohocken, PA, 2010, www.astm.org.; DOI 10.1520/E1259-10.
- (40) Bushnell, L. D; Haas, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.* **1941**, *41*, 653-673.
- (41) Silva, T. R. ; Verde, L. C. L.; Santos Neto, E. V.; Oliveira, V. M. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *81* (0), 57-70.
- (42) Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3th, ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001.

- (43) Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glockner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (1); DOI:10.1093/nar/gks808.
- (44) Hadziavdic, K.; Lekang, K.; Lanzen, A.; Jonassen, I.; Thompson, E. M. Troedsson, C. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *Plos One.* **2014**, *9* (2), e87624; DOI 10.1371/journal.pone.0087624.
- (45) Caporaso, J.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.; Cotello, E.; Fierer, N.; Gonzalez Pena, A.; Goodrich, J.; Gordon, J.; Huttley, G.; Kelley, S.; Knights, D.; Koenig, J.; Ley, R.; Lozupone, C.; McDonald, D.; Muegge, B.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.; Turnbaugh, P.; Walters, W.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* **2010**, *7* (5), 335-336.
- (46) Edgar, R. C. Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinforma. J.* **2013**, *7*, 1-8.
- (47) Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* **2010**, *26* (19), 2460-2461.
- (48) Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590-6.
- (49) Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microb.* **2007**, *73* (16), 5261-5267.
- (50) Vazquez-Baeza, Y.; Pirrung, M.; Gonzalez, A.; Knight, R. Emperor: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*, **2013**, *2* (1), 16.
- (51) Lozupone, C.; Knight, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (12): 8228-8235.
- (52) Creek, D. J.; Chokkathukalam, A.; Jankevics, A.; Burgess, K. E.; Breitling, R.; Barrett, M. P. Stable isotope-assisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8442-8447; DOI 10.1021/ac3018795.
- (53) Tautenhahn, R.; Böttcher, C.; Neumann, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics.* **2008**, *9* (504); DOI 10.1186/1471-2105-9-504.
- (54) Scheltema, R. A.; Jankevics, A.; Jansen, R. C.; Swertz, M. A.; Breitling, R. PeakML/mzMatch: a file format, java library, r library, and tool-chain for mass spectrometry data analysis. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2786-2793; DOI 10.1021/ac2000994.
- (55) Team, R. D. C. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing: Vienna, AT, 2008. ISBN 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org>.

- (56) Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27-30.
- (57) Leader, D. P.; Burgess, K.; Creek, D.; Barrett, M. P. Pathos: a web facility that uses metabolic maps to display experimental changes in metabolites identified by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 3422-3426; DOI 10.1002/rcm.5245.
- (58) Letunic, I.; Yamada, T.; Kanehisa, M.; Bork, P. *iPath: interactive exploration of biochemical pathways and networks.* *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33* (3), 101-103; DOI 10.1016/j.tibs.2008.01.001
- (59) Yamada, T.; Letunic, I.; Okuda, S.; Kanehisa, M.; Bork, P. *iPath2.0: interactive pathway explorer.* *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W412-W415; DOI 10.1093/nar/gkr313.
- (60) Xia, J.; Sinelnikov, I.; Han, B.; Wishart, D. S. 2015 MetaboAnalyst 3.0 – making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 251-257.
- (61) Mariano, A. P.; Tomasella, R. C.; Oliveira, L. M.; Contiero, J.; Angelis, D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African J. Biotechnol.* **2008**, *7* (9), 1323-1328.
- (62) Bücker, F.; Santestevan, N. A.; Roesch, L. F.; Jacques, R. J. S.; Peralba, M. C.; Camargo, F. A. O.; Gaylarde, C. C.; Bento, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2011**, *65* (1), 172-178.
- (63) Passman, F. J.; Dobranick, J. K. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. Proceedings of the 9th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels – IASH: Sidges, ES, 2005. 18-22.
- (64) ANP 4, dated December 23, 2013. Public Resolution No. 50, DOU 24.12.2013. Technical regulation attached 4/2013.
[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)
- (65) ANP 3, dated August 25, 2014. Public Resolution No. 45, DOU 26.8.2014. Technical regulation attached 3/2014.
[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)
- (66) Yang, Z.; Hollebone, B. P.; Wang, Z.; Yang, C.; Brown, C.; Landriault, M. Storage stability of commercially available biodiesels and their blends under different storage conditions. *Fuel.* **2014**, *115*, 366-377.
- (67) Aktas, D.F.; Sorrell, K.R.; Duncan, K.E.; Wawrik, B.; Callaghan, A.V.; Suflita, J.M. Anaerobic hydrocarbon biodegradation and biocorrosion of carbon steel in marine environments: The impact of different ultra low sulfur diesels and bioaugmentation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2017**, *118*, 45-56.
- (68) Gaylarde, C. C.; Bento, F.; Kelley, J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Braz. J. Microbiol.* **1999**, *30*, 1-10.

- (69) Seabra, P. N. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados. In *Microbiologia Ambiental*; Melo, I. S., Azevedo, J. L., Eds.; EMBRAPA: Jaguariúna, SP, 2008; pp 547-570.
- (70) Barbosa, A. M.; Geise, E. C.; Covizzi, L. G. Biodegradação de Compostos Aromáticos. In *Microbiologia Ambiental*; Melo, I. S., Azevedo, J. L., Eds.; EMBRAPA: Jaguariúna, SP, 2008; pp 261-280.
- (71) Das, N.; Chandran, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol. Res. Int.* **2011**, article ID 941810, 13 p.; DOI 10.4061/2011/941810.
- (72) Bento, F. M.; Gaylarde, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2011**, *47*, 107-112.
- (73) White, J.; Gilbert, J.; Hill, G.; Hill, E. D.; Huse, S.; Weightman, A.; Mahenthiralingam, E. Culture-Independent Analysis of Bacterial Fuel Contamination Provides Insight into the Level of Concordance with the Standard Industry Practice of Aerobic Cultivation. *Appl. Environ. Microb.* **2011**, *77* (13), 4527–4538; DOI 10.1128/AEM.02317-10.
- (74) Onuorah, S. C.; Ikegbunam, M. N.; Awah, S. N.; Ezeadila, J. O. Microbial contamination of stored diesel oil in Nigeria. *WJPPS.* **2013**, *2* (3), 1459-1464.
- (75) Lisiecki, P.; Chrzanowski, L.; Szulc, A.; Lawniczak, L.; Białas, W.; Dziadas, M.; Owsianiak, M.; Staniewski, J.; Cyplik, P.; Marecik, R.; Jelen, H.; Heipieper, H.J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel.* **2014**, *116*, 321-327.
- (76) Restrepo-Florez, J. M.; Bassi, A.; Rehmann, L.; Thompson, M.R. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. *Bioresource Technol.* **2013**, *147*, 456-463.
- (77) Passman, F. J. Introduction to fuel microbiology. In *Manual Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control*; Passman, F. J., Ed. ASTM International: West Conshohocken, 2003; pp 1-13.
- (78) Rasamiravaka, T.; Labtani, Q.; Duez, P.; El Jaziri, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Biomed Res. Int.* **2015**, article ID 759348, 17 p.; DOI 10.1155/2015/759348.
- (79) Aktas, D. F.; Lee, J. S.; Little, B. J.; Duncan, K. E.; Perez-Ibarra, B. M.; Sufliya, J. M. Effects of oxygen on biodegradation of fuels in a corroding environment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *81*, 114-126.
- (80) Ferrari, B. C.; Zhang, C.; Dorst, J. V. Recovering Greater Fungal Diversity from Pristine and Diesel Fuel Contaminated Sub-Antarctic Soil Through Cultivation Using Both a High and a Low Nutrient Media Approach. *Front. Microbiol.* **2011**; DOI 10.3389/fmicb.2011.00217.
- (81) De Menezes, A.; Clipson, N.; Doyle, E. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14* (9), 2577-2588.

- (82) Stefani, F. O. P.; Bell, T. H.; Marchand, C.; La Providencia, I. E.; Yassimi, A. E.; St-Arnaud, M.; Hijri, M. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Plos One*. **2015**, *10* (6), e0128272; DOI 10.1371/journal.pone.0128272.
- (83) O'Brien, J.; Wright, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr. Opin. Biotech.* **2011**, *22*, 552-558.
- (84) Vieira, T. M.; Silva, E. P.; Antoniosi Filho, N. R.; Vieira, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. Proceedings of the Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel. Artigos técnico-científico: Estação Gráfica, Brasília, BR, 2006. 218-222.
- (85) Pinho, D. M. M.; Suarez, P. A. Z.; Meneghetti, S. M. P.; Rangel, E. T. Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. In Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle; Pinho, D. M. M., Suarez, P. A. Z., Eds.; Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação: Brasília 2016; pp 12-26.
- (86) Batts, B. D.; Fathoni, Z. A. A Literature Review on Fuel Stability Studies with Particular Emphasis on Diesel Oil. *Energ. Fuel*. **1991**, *5*, 2-21.

SUPPORTING INFORMATION (SI)

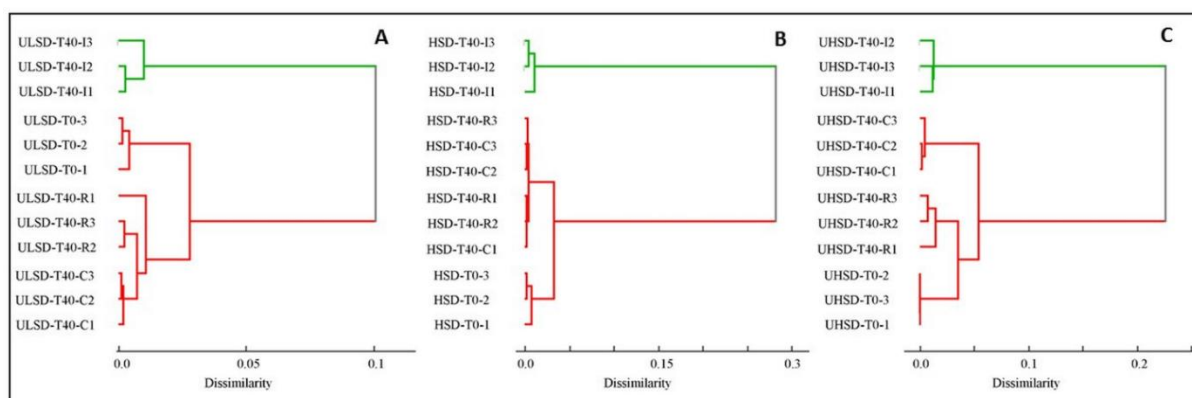


Figure S1. Dendrograms resulting from infrared spectra for the oil phase of the B10 blend with different sulfur contents at time zero (T0) and 40 days (T40). **A:** ULSD (≤ 10 ppm sulfur); **B:** HSD (≤ 500 ppm sulfur); **C:** UHSD (≤ 1800 ppm sulfur). **Treatments:** high contamination (I): $\sim 10^6$ bacterial cells and fungal spores mL^{-1} ; Low contamination (R): $\sim 10^3$ CFU L^{-1} ; **Controls (C):** sterile.

Table S1. Characteristics of the fuels used in the preparation of the B10 blend with different sulfur contents at time zero.

Fuels	Water content (mg kg^{-1})	Biodiesel content (v/v)	Total sulfur (mg kg^{-1})
B100	390	100	2.8
ULSD	49	0.1	7.7
HSD	68	0.1	349
UHSD	75	0.1	966
ULSD B10	92	11.2	6.3
HSD B10	114	10.3	327
UHSD B10	112	10.7	861

Standards method: Water content: ASTM D6304; Biodiesel content: EN 14078; Total Sulfur: ASTM D5453 for hydrocarbons, automotive fuels and oils. Total sulfur refers to the concentration of sulfur dioxide (SO_2) present in the sample, detected by ultraviolet fluorescence. Sample concentration: 0.0001 to 0.8% mass (1.0 to 8000 mg kg^{-1}).

Fuels: B100 (100% biodiesel); Ultra low sulfur diesel - ULSD (≤ 10 ppm sulfur); High sulfur diesel - HSD (≤ 500 ppm sulfur); Ultra high sulfur diesel - UHSD (≤ 1800 ppm sulfur); ULSD B10 (10% biodiesel + 90% ULSD); HSD B10 (10% biodiesel + 90% HSD); UHSD B10 (10% biodiesel + 90% UHSD).

Table S2. Corresponding areas to the different hydrogens present in the B10 blend with different sulfur contents at time zero and 40 days of experiment.

B10 blend	E (-CH₂-)	M (-CH₃)	A (Ar-H)	A/(M+E+A)	-OCH₃	-CH₁=CH₁-
ULSD - T0	0.4588	0.2941	0.0175	0.0227	0.0083	0.0082
ULSD - T40	0.4962	0.2971	0.0136	0.0168	0.0064	0.0076
HSD - T0	0.4869	0.2919	0.0185	0.0231	0.0086	0.0077
HSD - T40	0.5163	0.3077	0.0104	0.0125	0.0043	0.0076
UHSD - T0	0.5028	0.2801	0.0135	0.0169	0.0090	0.0087
UHSD - T40	0.5135	0.2747	0.0088	0.0110	0.0055	0.0089
Chemical Shift (ppm)	1.30	0.90	6.82 - 7.2	-----	3.70	5.32 - 5.45

E, M and **A** represent the ethylene, methylene and aromatic groups present in diesel.

Table S3. Average of relative abundance for the taxonomic level of Phylum, Class, Order and Family representative of 16S rRNA gene sequencing from the initial inoculum (time zero) and high contamination treatment in the B10 blend with ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) present at the interface and water phase over 40 days.

Taxonomic groups	Relative abundance average (%) of B10 blend			
PHYLUM	Initial inoculum	ULSD	HSD	UHSD
Actinobacteria	0	<1	<1	0
Bacteroidetes	<1	<1	<1	<1
Cyanobacteria	0	<1	<1	<1
Firmicutes	4	32	18	17
Proteobacteria	96	68	82	82
Unclassified	<1	<1	<1	<1
CLASS	Initial inoculum	ULSD	HSD	UHSD
Acidimicrobiia	0	0	0	0
Alphaproteobacteria	<1	<1	<1	<1
Bacilli	<1	<1	<1	<1
Bacteroidia	<1	0	0	0
Betaproteobacteria	5	8	11	19
Clostridia	4	30	17	17
Cytophagia	<1	0	0	0
Deltaproteobacteria	0	<1	0	0
Flavobacteria	<1	<1	<1	<1
Gammaproteobacteria	90	61	70	63
Sphingobacteriia	<1	<1	<1	<1
Unclassified	<1	<1	<1	<1
ORDER	Initial inoculum	ULSD	HSD	UHSD
Acidimicrobiales	0	<1	<1	0
Alteromonadales	<1	<1	<1	<1
Bacillales	<1	<1	<1	<1
Bacteroidales	<1	0	0	0
Burkholderiales	5	8	11	19
Caulobacterales	<1	<1	<1	<1
Clostridiales	4	30	17	17
Cytophagales	<1	<1	0	0
Flavobacteriales	<1	<1	<1	<1
Oceanospirillales	<1	<1	<1	<1
Pseudomonadales	90	61	70	62
Rhizobiales	0	<1	<1	<1
Rhodobacterales	<1	<1	<1	<1

Rhodospirillales	<1	<1	<1	<1
Rickettsiales	<1	<1	<1	<1
Sphingobacteriales	<1	<1	0	0
Sphingomonadales	0	0	0	<1
Xanthomonadales	0	<1	0	<1
Unclassified	<1	<1	<1	<1
FAMILY	Initial inoculum	ULSD	HSD	UHSD
<i>Alteromonadaceae</i>	<1	<1	<1	<1
<i>Burkholderiaceae</i>	5	3	5	9
<i>Chitinophagaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Christensenellaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Clostridiaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Colwelliaceae</i>	0	0	0	0
<i>Flammeovirgaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Flavobacteriaceae</i>	<1	<1	<1	<1
<i>Halomonadaceae</i>	<1	<1	<1	<1
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	0	0	0	0
<i>Hyphomonadaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i>	1	2	6	3
<i>Marinilabiaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Moraxellaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Oceanospirillaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Oxalobacteraceae</i>	0	0	0	0
<i>Paenibacillaceae</i>	<1	<1	<1	<1
<i>Phyllobacteriaceae</i>	0	0	>1	>1
<i>Pseudomonadaceae</i>	90	86	81	68
<i>Rhodobacteraceae</i>	<1	<1	<1	<1
<i>Rhodospirillaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Ruminococcaceae</i>	<1	3	2	2
<i>Saprospiraceae</i>	<1	0	0	0
<i>Shewanellaceae</i>	<1	<1	<1	<1
<i>Sporolactobacillaceae</i>	<1	0	0	0
<i>Veillonellaceae</i>	2	5	3	5
Unclassified	<1	<1	<1	<1

Cut-off taxonomic classification = 0.01 % using the average relative abundance.

< 1 = 0.99 % - 0.01 %.

0 = average relative abundance equal to zero.

Table S4. OTU abundance from 16S rRNA gene sequencing of the initial inoculum (time zero) and high contamination treatment in the B10 blend with ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) present at the interface and water phase at 40 days.

TAXONOMIC GROUPS Phylum_Genus	B10 blend treatments*						
	Initial inoculum Interface	ULSD Interface	HSD Interface	ULSD Interface	ULSD Water phase	HSD Water phase	ULSD Water phase
Proteobacteria_ <i>Pseudomonas</i>	0.898 ^a	0.956 ^a	0.931 ^a	0.954 ^a	0.123 ^c	0.495 ^b	0.427 ^b
Proteobacteria_ <i>Pandoraea</i>	0.051 ^{b,c}	0.016 ^c	0.019 ^c	0.024 ^c	0.290 ^a	0.167 ^{a,b}	0.250 ^a
Firmicutes_ <i>Propionispora</i>	0.020 ^d	0.015 ^d	0.007 ^d	0.004 ^d	0.307 ^a	0.112 ^c	0.160 ^b

*Least squares means from ANOVA with a 95% confidence interval.
Means followed by the same letter do not differ at 5% probability by Tukey test.

Table S5. OTU abundance from 18S rRNA gene sequencing of the initial inoculum (time zero) and high contamination treatment in the B10 blend with ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) and UHSD (≤ 1800 ppm sulfur) present at the interface and water phase at 40 days.

TAXONOMIC GROUPS Phylum_Class	B10 blend treatments*						
	Initial inoculum Interface	ULSD Interface	HSD Interface	ULSD Interface	ULSD Water phase	HSD Water phase	ULSD Water phase
Ascomycota_ <i>Saccharomycetes</i>	0.621 ^d	0.037 ^e	0.650 ^{c,d}	0.719 ^{b,c,d}	0.820 ^{a,b}	0.939 ^a	0.797 ^{a,b,c}
Ascomycota_ <i>Eurotiomycetes</i>	0.168 ^b	0.575 ^a	0.200 ^b	0.197 ^b	0.006 ^b	0.005 ^b	0.066 ^b

*Least squares means from ANOVA with a 95% confidence interval.
Means followed by the same letter do not differ at 5% probability by Tukey test.

Table S6. Metabolic pathways detected in the water phase from high contamination treatment of the B10 blend with different sulfur contents: ULSD (≤ 10 ppm sulfur); HSD (≤ 500 ppm sulfur) UHSD (≤ 1800 ppm sulfur), at 40 days.

No	Metabolic pathways	Number of putative metabolites identified in the B10 blend samples / Number of metabolites in the metabolic pathway		
		ULSD	HSD	UHSD
Amino acid metabolism				
1	Arginine and Proline metabolism	<5	<5	8/67
2	Lysine degradation	<5	<5	5/42
3	Phenylalanine metabolism	14/64	17/64	14/64
4	Tryptophan metabolism	5/80	14/80	10/80
5	Tyrosine metabolism	13/75	11/75	11/75
6	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	6/23	7/23	7/23
Biosynthesis of the other secondary metabolites				
7	Glucosinolate biosynthesis	5/72	7/72	6/72
8	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	7/93	17/93	16/93
9	Phenylpropanoid biosynthesis	6/51	6/51	<5
10	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	10/61	11/61	12/61
Carbohydrate metabolism				
11	Butanoate metabolism	<5	6/38	5/38
Degradation of aromatic compounds				
12	1,4-Dichlorobenzene degradation	5/74	6/74	<5
Genetic information (Translation)				
13	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	6/24	6/24	5/24
Lipid metabolism				
14	Alpha-linolenic acid metabolism	9/39	9/39	9/39
15	Arachidonic acid metabolism	9/74	7/74	8/74
16	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	10/49	8/49	9/49
17	Steroid hormone biosynthesis	14/99	11/99	11/99
18	Fatty acid biosynthesis	8/11	8/11	6/11
19	Linoleic acid metabolism	5/25	5/25	5/25
Metabolism of cofactors and vitamins				
20	Nicotinate and nicotinamide metabolism	6/46	<5	<5
21	Porphyrin and chlorophyll metabolism	6/93	12/93	<5
22	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	6/36	8/36	6/36
Metabolism of terpenoids and polyketides				

23	Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides	11/75	16/75	10/75
24	Brassinosteroid biosynthesis	5/27	<5	<5
25	Carotenoid biosynthesis	9/91	10/91	9/91
26	Diterpenoid biosynthesis	6/69	<5	6/69
27	Limonene and pinene degradation	7/59	6/59	6/59
28	Monoterpenoid biosynthesis	6/44	5/44	6/44
Xenobiotics biodegradation and metabolism				
29	Benzoate degradation via hydroxylation	5/66	5/66	<5

<5 = Below five putative metabolites that make up.

7. CAPÍTULO 4.
MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE ABIÓTICA E BIÓTICA DURANTE
ARMAZENAMENTO SIMULADO DA MISTURA BRASILEIRA B10-S10

MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE ABIÓTICA E BIÓTICA DURANTE ARMAZENAMENTO SIMULADO DA MISTURA BRASILEIRA B10-S10

Aline Oliboni de Azambuja^{a,e*}; Sabrina Anderson Beker^a; Sukriye Celikkol Aydin^e,
Akiko Terada Ogawa^e; Vanessa Souza Breder Valente^c; Sérgio Luiz Camacho
Viscardi^c; Roberta Miranda Teixeira^c; Eduardo Homem de Siqueira Cavalcanti^d;
Bernardo Brito Vacaro^b; Marco Flôres Ferrão^b; Iwona Boguslavia Beech^e; Fátima
Menezes Bento^a

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LAB-BIO), RS - Brasil.

^bUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, RS - Brasil.

^cIpiranga Produtos de Petróleo, Centro de Tecnologia Aplicada e da Qualidade (CETAQ), RJ - Brasil.

^dInstituto Nacional de Tecnologia (INT), Laboratório de Corrosão e Proteção (LACOR), RJ - Brasil.

^eUniversidade de Oklahoma, Departamento de Microbiologia e Biologia de Plantas, OK - Estados Unidos da América.

*autor correspondente

Tel: +55 51 91246674; fax: +55 51 3308 3665

E-mail: alineoliboni@gmail.com

Destaques

A estabilidade oxidativa sofreu redução dos valores, de acordo com regulamento técnico da ANP, após 90 dias de estocagem simulada.

Foi constatado crescimento bacteriano na fase óleo e produção de sedimentos na fase aquosa, após 90 dias de armazenamento simulado.

Pela análise de infravermelho todos os combustíveis sofreram degradação que pode ser de origem química ou biológica.

Resumo

O óleo diesel brasileiro de uso rodoviário, pode apresentar até no máximo 500 mg kg^{-1} de enxofre, no entanto, o diesel S10 (ULSD, até 10 mg kg^{-1}), vem sendo utilizado desde 2013, visando a redução de impactos gerados pela queima de combustíveis fósseis. Com a remoção do enxofre, algumas propriedades como a lubrificidade podem ficar comprometidas e a adição de biodiesel pode recuperar esta limitação. O objetivo desse trabalho foi acompanhar a estabilidade química e biológica ao armazenamento simulado da mistura B10 com óleo diesel S10 por 90 dias em tanques de aço carbono (20 L), com e sem 1 % de água de drenagem, na condição de recebido e contaminado. Foram monitorados o aspecto; teor de água; estabilidade oxidativa; massa específica a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$; viscosidade cinemática; índice de acidez; teor de biodiesel; teor de enxofre; lubrificidade a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$; teor de metanol/etanol e a degradação do combustível com espectroscopia de infravermelho. A contaminação microbiana foi estimada com laminocultivo e detecção de bactérias redutoras de sulfato e ferrobactérias com método dependente e independente de cultivo. Verificou-se que após 90 dias de estocagem simulada a estabilidade oxidativa mostrou tendência de redução e os demais parâmetros, atenderam às especificações exigidas pela ANP. A contaminação microbiana foi classificada como dentro de níveis aceitáveis para combustíveis, com sugestão de alerta na contaminação bacteriana da fase oleosa. Foi realizado o isolamento e seqüenciamento de *Bacillus aryabhatai* como ferrobactéria. A avaliação da fase oleosa mostrou degradação da fração biodiesel da mistura B10, ao longo do tempo e que a presença de água não foi determinante para a maior degradação encontrada.

Palavras-chave: armazenamento, ULSD, estabilidade, blenda B10, degradação abiótica e biótica.

7.1 Introdução

Atualmente, o óleo diesel brasileiro, de uso rodoviário, pode apresentar dois diferentes teores de enxofre na sua composição. De acordo com a Resolução 50/2013, que regulamenta a comercialização e a qualidade do diesel rodoviário distribuído no país, o óleo diesel S500 pode conter até 500 mg kg⁻¹ (ppm) de enxofre na sua composição e o óleo diesel S10, no máximo 10 mg kg⁻¹ (ppm). A redução dos níveis de enxofre no óleo diesel a níveis ultra baixos, entre 10 a 15 ppm S (*ultra low sulfur diesel* – ULSD) é uma tendência mundial na tentativa de minimizar o impacto gerado pela queima de combustíveis fósseis (Stanislaus et al., 2010; Pawelec et al., 2011; Passman, 2012; Lyles et al., 2013; Suflita et al., 2014; Grishin & Zinina, 2015). Segundo as regulamentações ambientais a redução do enxofre de 500 mg kg⁻¹ para 10 mg kg⁻¹ está de acordo com as especificações do Programa de Redução de Poluentes Automotivos da União Européia para dieséis classificados dentro de padrões Euro 2 e Euro 5, respectivamente (Grishin & Zinina, 2015).

Com a introdução do biodiesel, em 2005 (Lei 11.097) algumas mudanças importantes nas características do óleo diesel brasileiro são esperadas. O biodiesel é definido como mono-alquil éster com mesmo perfil de ácidos graxos da matéria prima de origem. A soja, principal matéria prima utilizada no País, possui uma significativa quantidade de ácidos graxos insaturados e problemas relacionados a estabilidade oxidativa, especialmente durante o período de estocagem tendem a aumentar (Knothe, 2007). Atualmente a mistura obrigatória é de 7 % de biodiesel ao diesel mineral e está previsto um aumento de até 10 % em 2019 (Lei 13.263, DOU 24.03.2016).

A estabilidade ao armazenamento é uma das mais importantes características dos combustíveis para motores automotivos, sendo caracterizada pela capacidade de manter a composição e propriedades do combustível durante o longo período de estocagem, transporte e no curso do sistema de injeção para o motor (Jakeria et al., 2014; Grishin & Zinina, 2015). Há muitos fatores que influenciam a estabilidade do biodiesel e do diesel. Trabalhos de pesquisa têm relatado que o biodiesel é sensível a luz, temperatura e íons metálicos (Aquino et al., 2012), é higroscópico e mais suscetível a reações de oxidação (Mushrush et al., 2011) a degradação microbiana (Pasqualino et al., 2006; Bückler et al., 2011; Sørensen et al., 2011; Bückler et al., 2014; Cazarolli et al., 2014) e apresenta maior tendência a

corrosividade (Fazal et al., 2010), quando comparado ao petrodiesel. No caso do diesel, alguns trabalhos têm reportado que o processo de hidrotreatamento, na remoção de compostos organosulfurados, afeta propriedades como condutividade, lubricidade, densidade e viscosidade (Knothe & Steidley, 2005; Yemashova et al., 2007), e que poderia tornar o combustível mais suscetível à contaminação microbiana (Passman & Dobranick, 2005; Srivastava & Nandan, 2012).

Diante desse cenário, o objetivo desse trabalho foi avaliar a mistura B10, confeccionada com óleo diesel com até 10 ppm de enxofre (S10), quanto a estabilidade abiótica e biótica, durante 90 dias de armazenamento simulado. Para tanto foram avaliados a condição de postos revendedores de combustível (com 1 % de fase aquosa) e a condição de base refinadora e distribuidora (sem fase aquosa) com a adição de um consórcio microbiano não caracterizado e na condição de combustível como recebido da distribuidora. Foram monitorados parâmetros relacionados a degradação abiótica como: aspecto da mistura B10; teor de água; estabilidade oxidativa; massa específica a 20 °C; viscosidade cinemática a 40 °C; índice de acidez; teor de biodiesel; teor de enxofre; lubricidade a 60 °C; teor de metanol/etanol e avaliação da degradação da fração biodiesel por espectroscopia no infravermelho. A estimativa de microrganismos heterotróficos totais, fungos e bactérias (totais; reductoras de sulfato e ferroreductoras) da fase oleosa e aquosa foi realizada com laminocultivo.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Combustíveis utilizados

Foram utilizados o biodiesel metílico de soja e sebo bovino (OLEOPLAN, 65:35) (ANEXO 5A), conforme distribuição sazonal do verão do Rio Grande do Sul (Brasil) e o óleo diesel A, contendo até 10 mg kg⁻¹ de enxofre (S10) (ANEXO 1). Ambos, diesel e biodiesel foram fornecidos pela empresa Ipiranga Produtos de Petróleo S.A. acompanhados de Certificado de Qualidade em consonância para o diesel, conforme o Regulamento Técnico ANP 04 /2013 (ANEXO 6) e resolução complementar 69/2014; Regulamento Técnico ANP 02 /2016 para BX e B30 (ANEXO 7) e Regulamento Técnico ANP 03 /2014 e para o biodiesel (ANEXO 8). A mistura B10 foi confeccionada em laboratório contendo 10 % do biodiesel e 90 % de óleo diesel A S10.

7.2.2 Experimento piloto

O experimento foi realizado em 8 tanques especialmente construídos em aço carbono, jateados com granalha de ferro e com capacidade para 20 litros, representando réplicas de tanques armazenadores de combustível. A esses tanques foram adicionados 19,8 L da mistura B10/ S10 e 200 mL (1 %) de água de drenagem (pH 4,8) de tanques de armazenamento de diesel S500, fornecidos pela Ipiranga Produtos de Petróleo. Um conjunto de quatro tanques receberam a fase aquosa e os outros quatro tanques não receberam fase aquosa, na tentativa de simular um cenário de Postos (comércio de combustíveis) e de Base (refinaria e distribuidora), respectivamente. Os tratamentos considerados de baixa contaminação (10^3 UFC L⁻¹) foram compostos por dois tanques com água de drenagem (Tanques 1 e 2), não estéril, e outros dois tanques que não receberam a fase aquosa (Tanques 3 e 4). A condição de média contaminação foi composta pela adição de um inóculo não caracterizado de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos na concentração de 10^5 cel/espores mL⁻¹ distribuídos em dois tanques que receberam a água de drenagem (Tanques 5 e 6) e em outros dois tanques que não receberam a fase aquosa (Tanques 7 e 8), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Identificação dos tanques experimentais de acordo com os níveis de contaminação microbiana e presença de água no fundo dos tanques.

Cenário	Níveis de contaminação microbiana	
	Baixa ($\sim 10^3$ UFC L ⁻¹)	Média ($\sim 10^5$ cel/espores mL ⁻¹)
POSTOS – presença de fase aquosa	Tanques 1 e 2	Tanques 5 e 6
BASE – ausência de fase aquosa	Tanques 3 e 4	Tanques 7 e 8

Cada nível de contaminação e condição em relação a presença ou ausência de fase aquosa foram distribuídos em duplicatas. Os tanques permaneceram em uma área coberta, protegidos da incidência direta de luz solar e de precipitação de chuva. A verificação da temperatura foi realizada com termômetros mantidos imersos na fase óleo, no centro de cada tanque e termômetro na área externa, sendo as medições verificadas nos tempos 15, 30, 60 e 90 dias.

7.2.3 Inóculo não caracterizado e condições de cultivo

O inóculo não caracterizado foi preparado conforme a Norma ASTM E1259-10 (ASTM, 2010), com algumas modificações. Uma alíquota de 5 mL de diferentes borras biológicas, provenientes de tanques de diesel S500 e misturas B4/B5 foi aclimatado em 100 mL de meio mineral Bushnell-Haas (Bushnell & Haas, 1941), estéril, suplementado com 2 % da mistura B10/S50, previamente esterilizado por filtração a vácuo com membrana de 0,22 micra (Millipore), sendo armazenado em incubador rotativo a 180 rpm, a 30 °C por 7 dias. Após esse período o inóculo foi diluído serialmente em solução salina (0,85 %) e contado em câmara de Neubauer, sendo ajustado a uma concentração final de 10^5 células/espores mL⁻¹ para o experimento. Tal concentração é considerada média contaminação microbiana em sistemas de armazenamento de combustíveis (Hill & Hill, 2009). Neste experimento também foi avaliado a condição de combustível recebido da distribuidora com a estimativa de 10^3 UFC L⁻¹, conforme sugerido por Hill & Hill (2009).

7.2.4 Análises microbianas

7.2.4.1 Estimativa de heterotróficos cultiváveis pela técnica de laminocultivos (UFC/mL)

Para a estimativa de fungos e bactérias totais foram realizadas análises na fase oleosa (em todos os tanques) com amostra coletada do topo, meio e fundo para compor uma amostra composta e na fase aquosa (fundo), somente para os tanques que contém esta condição (Tanques 1, 2, 5, e 6), utilizando a técnica de laminocultivos (UFC/mL) nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias. Os laminocultivos foram utilizados diretamente com as amostras oriundas de água de lastro, gotejando 5 mL sobre cada uma das duas faces (face 1 e face 2). Nesse experimento foram utilizados 2 tipos de laminocultivos (Laborclin, PR - Brasil), onde cada um contém meios de cultura específicos para o desenvolvimento de fungos e microrganismos totais (Nutrilab F); bactérias e microrganismos totais (Nutrilab E). Nas amostras provenientes do óleo, 5 mL desse foi diluído em 40 mL de surfactante Tween 80 % (0,01 %) para imersão de cada lâminocultivo em triplicata, sendo incubados a 30 °C por até 5 dias. Após esse período, as amostras foram comparadas a um gabarito que expressa a quantidade de colônias crescidas em cada face dos lâminos como unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

7.2.4.2 Detecção de bactérias ferroredutoras e bactérias redutoras de sulfato (BRS)

A detecção dos grupos das bactérias ferroredutoras e bactérias redutoras de sulfato (BRS) foi realizada no inóculo inicial (tempo zero) e após 90 dias para os tanques com adição de água (1, 2, 5 e 6), utilizando meios seletivos. Nesta avaliação foram utilizados padrões positivo de crescimento de bactérias ferroredutoras (033 LABIO/INT *Shewanella* sp.) e de bactérias redutoras de sulfato (003 LABIO/INT *Desulfovibrio desulfuricans*), ambos fornecidos pelo Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação do Instituto Nacional de Tecnologia, RJ.

Para a detecção de ferrobactérias foram utilizados frascos do tipo penicilina (25 mL), contendo 9 mL de meio caldo citrato férrico amoniacal verde (Norma Técnica L5.207 - CETESB, 1988), com algumas alterações: 0,5 % de salinidade e pH 6,6 em 1 mL da fase aquosa. Os frascos foram tampados com buchas de algodão, cobertos com papel alumínio e mantidos em incubador rotativo a 120 r.p.m. a 30 °C por até 14 dias.

O grupo de BRS foi investigado utilizando-se o Meio Postgate E (Postgate, 1984) modificado (0,5 % de salinidade). 9 mL do meio foram distribuídos em frascos do tipo penicilina (15 mL) e purgados com nitrogênio (95 % N₂ e 5 % CO₂), por três vezes para garantir a condição de anaerobiose. Os frascos foram vedados com tampas de borracha e lacres metálicos e esterilizados com autoclave (121 °C por 15 min). Com o auxílio de seringas descartáveis, 1 mL da fase aquosa foi inoculada nos frascos e incubados a 30 °C por até 30 dias.

7.2.4.3 Identificação dos isolados por sequenciamento Sanger (16S rRNA)

As diferentes colônias crescidas no meio seletivo ágar citrato amoniacal verde, proveniente do inóculo não caracterizado, foram submetidas a sucessivos esgotamentos a fim de isolar colônias axênicas. As culturas puras foram crescidas em caldo Luria Bertani – LB (BD-Difco) e acondicionadas em incubador rotativo a 150 r.p.m., 30 °C por 24 horas. Após este período 10 µL de proteinase K foi adicionado ao cultivo (750 µL) e incubado a 50 °C por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de cada um dos tampões de lise (RLA e RDB Promega, USA) juntamente com 200 µL de DNAzol (Direct Molecular Research Center, OH - USA) e homogeneizados no vórtex. A solução foi adicionada dentro dos cartuchos da Maxwell 16 (Promega), um método automatizado de extração de DNA, seguindo as instruções do fabricante.

A quantificação de DNA genômico foi determinada por fluorometria no aparelho Qubit 2.0 Fluorometer utilizando o kit dsDNA HS (Invitrogen™), de acordo com o manual.

A amplificação total do gene 16S rRNA foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos universais 8F (5'AGAGTTTGATCMTGG3') e U1492R Tu103 (5'TACCTTGTTACGACTT3') (Herrick et al., 1993). As reações de PCR foram conduzidas num volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA; 12,5 µL de 2x DreamTaq Green master mix (Thermo Scientific); 5 µL de Betaína (5M) e 5 pmol de cada *primer*. As condições da amplificação da PCR foram: 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 1min a 94 °C, 1 min a 46 °C e 2 min a 72 °C, e a extensão final a 72 °C por 10 min. Foi utilizado uma cepa de *Escherichia coli* como controle positivo da reação. A amplificação foi conduzida no termociclador T100 (BIO-RAD), a qualidade dos produtos gerados foi analisado em gel de agarose a 1 % e as imagens visualizadas no foto documentador Gel Logic 112 *Imaging System* e *Molecular Imaging Software v5* (Carestream, WoodBridge, CT). Os produtos da PCR foram purificados usando o tratamento enzimático ExoSAP-IT (Affymetrix/USB), de acordo com as instruções do fabricante. Os *amplicons* foram lidos por sequenciamento capilar ABI 3730 no Oklahoma *Medical Research Foundation*, (Oklahoma City, OK, USA). As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas pelo programa Sequencher (versão 5.3.2) e comparadas com as sequências de nucleotídeos de espécies de referências, obtidas no EMBL/Genbank database, usando NCBI BLAST.

7.2.4.4 Determinação da biomassa

A biomassa microbiana formada nos tanques ao final dos 90 dias foi estimada pela técnica gravimétrica. Foram utilizadas discos de papel filtro, sendo submetidas, inicialmente à secagem em estufa bacteriológica 30 °C por 48 h e mantidas no dessecador por 24 h para posterior pesagem em balança de precisão e armazenagem em dessecador. Após 90 dias foi removida a biomassa formada no fundo dos tanques, com a separação das fases oleosa e aquosa. A biomassa foi depositada sobre o papel filtro e adicionado uma alíquota de 4 mL de hexano para remover o excesso de óleo, seguido os mesmos procedimentos de secagem, remoção de umidade e pesagem acima mencionados. O peso seco da biomassa (g) de cada tratamento foi obtido a partir da diferença entre o peso final e inicial dos papéis filtro.

7.2.5 Análises Físico-Químicas

7.2.5.1 Temperatura e pH

O acompanhamento das variações de temperatura interna e externa dos tanques, mediante termômetros de mercúrio e termohigrômetro, respectivamente, foram acompanhadas nos tempos 15, 30, 60 e 90 dias, assim como as medidas de pH da fase aquosa com fitas de pH universal (Marcherey-Nagel) nos Tanques 1, 2, 5 e 6 no mesmo período mencionados acima.

7.2.5.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Alíquotas composta da fase oleosa (topo, meio e fundo) de todos os tratamentos nos tempos 0, 15, 60 e 90 dias foram coletadas e armazenadas a 4 °C até proceder as análises de espectroscopia no infravermelho (FTIR) para verificar a fração de ésteres degradados. Os espectros FTIR foram obtidos usando o espectrofotômetro 400 Perkin Elmer equipado com detector de sulfato triglicina deuterado (DTGS) e um detector de refletância total atenuada horizontal (HATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros foram obtidos em duplicatas 650-4000 cm^{-1} à temperatura ambiente. A resolução óptica do infravermelho foi de 4 cm^{-1} e foram realizadas 16 varreduras para cada espectro. Os espectros foram obtidos para cada amostra subtraindo o *background* (espectro de fundo) que foi realizado com o cristal limpo (sem amostra). Os dados espectrais obtidos foram centrados na média para realização das análises multivariadas. Os resultados do infravermelho foram subsequentemente submetidos a análise de agrupamento hierárquico (HCA) na região espectral de 1800-650 cm^{-1} utilizando os programas Matlab 7,11 (The Mathworks) e PLS_Toolbox 6.0 (Eigenvector Research).

7.2.5.3 Estabilidade ao armazenamento da mistura B10

As análises químicas foram realizadas pelo Centro de Tecnologia Aplicada e da Qualidade (CTAQ) – IPIRANGA/ RJ, nos tempos amostrais (0, 30, 60 e 90 dias), verificando o aspecto da mistura B10 (ABNT- NBR 14954), B100 e B0 (ASTM D4176); teor de água (ASTM D6304); estabilidade oxidativa (Rancimat EN 14112 para biodiesel e EN 15571 para mistura); massa específica a 20 °C (ASTM D4052); viscosidade cinemática a 40 °C (ASTM D445); índice de acidez (ASTM D664); teor de biodiesel (EN 14078); teor de enxofre (Antek - ASTM D5453); lubrificidade a 60 °C (DIN EN 12156) e teor de metanol/etanol (EN 14110).

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Análise dos parâmetros físico-químicos

7.3.1.1 Temperatura e pH

O acompanhamento das variações de temperatura interna e externa dos tanques, onde ficaram armazenados, foi realizado durante o período de amostragem, nos tempos 15, 30, 60 e 90 dias. A temperatura ambiente variou entre 26 °C e 16 °C, e no interior dos tanques, entre 25 °C e 15 °C, acompanhando as variações da temperatura ambiente (Figuras 1 e 2). O pH inicial da fase aquosa foi de 4,8 e após cada em tempo amostral, foi constatado que não houve variação durante os 90 dias, permanecendo na faixa de pH 5.

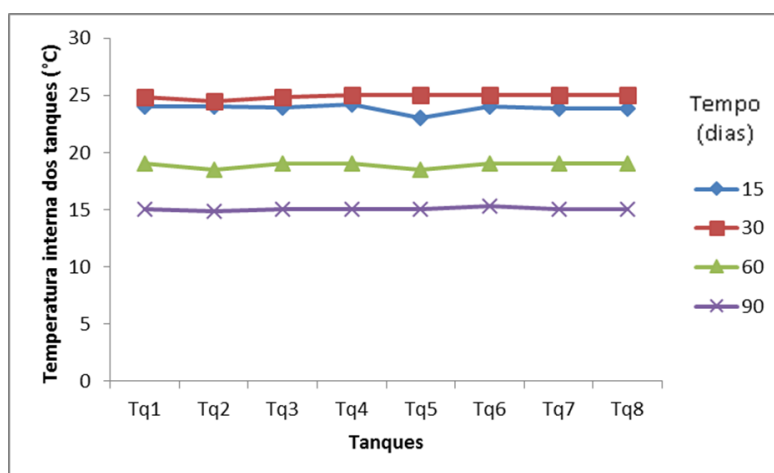


Figura 1. Valores das temperaturas internas (°C) dos tanques, registradas durante 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento (Janeiro a Abril/ 2013).

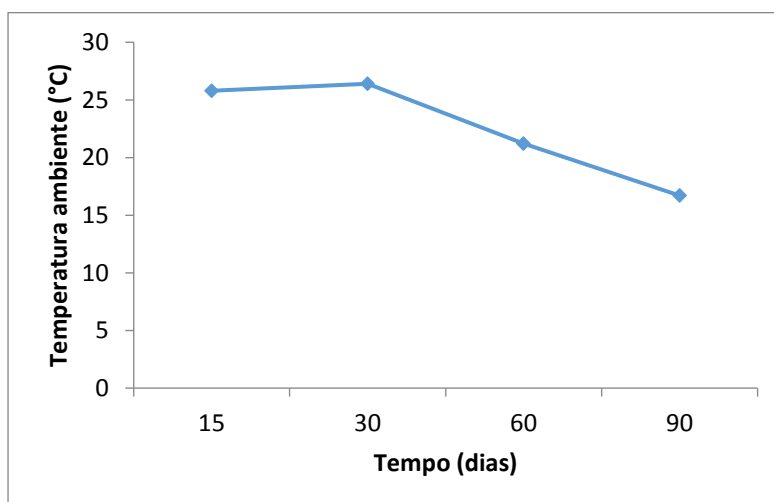


Figura 2. Valores de temperatura ambiente (°C), da área de armazenamento dos tanques, registradas durante 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento (Janeiro a Abril/ 2013).

Em nenhum dos tempos amostrais foi observada condensação de água nas paredes dos tanques ou nas suas tampas protetoras. O experimento foi iniciado na estação Verão e finalizou no Outono da região Sul do País. A variação de aproximadamente 10 °C entre os 90 dias de estocagem não foram suficientes para promover a visível condensação dos tanques. Por outro lado, muitas propriedades do biodiesel como oxidação, lubricidade, corrosividade, composição, viscosidade, entre outras, podem ser influenciadas pela temperatura (Jakeria et al., 2014). Por exemplo, o biodiesel metílico utilizado foi confeccionado com 65:35 óleos e gorduras soja/animal, respectivamente, especialmente para o Verão, uma vez que esta formulação está sujeita a modificação de suas propriedades se utilizada no Inverno. O biodiesel originário de gordura animal possui alto teor de ácidos graxos saturados e, em função disso, em baixas temperaturas, tende a solidificar-se parcialmente ou a perder sua fluidez, levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor (Lôbo & Ferreira, 2009). Segundo o Regulamento Técnico da ANP 4/2013 o ponto de entupimento de filtro a frio da mistura para a região Sul do País, entre os meses de Janeiro a Abril, é de 10 a 7 °C, respectivamente, estando de acordo com os resultados obtidos nesse experimento e para este tipo de formulação.

7.3.1.2 Estabilidade química

Os resultados da estabilidade química dos combustíveis utilizados no tempo inicial, óleo diesel S10 (B0 S10), biodiesel puro (B100) e a mistura B10 confeccionada foram avaliados quanto ao aspecto; teor de água (Karl Fisher); massa específica a 20 °C (densidade); índice de acidez; teor de enxofre; teor de biodiesel; teor de metanol/etanol; estabilidade oxidativa (Rancimat); lubricidade a 60 °C e viscosidade cinemática a 40 °C (Tabela 2).

A mistura B10 foi avaliada durante os tempos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento simulado, através do monitoramento das alterações nas suas propriedades físico-químicas no cenário Postos (com água) e no cenário Base (sem água). Com relação à observação da superfície interna dos tanques após 90 dias de ensaio, verificou-se os mesmos permaneceram praticamente inalterados, com exceção do Tanque 2 (com adição de água), com presença de ferrugem acentuada (Figuras 3 e 4).

Tabela 2. Análises físico-químicas dos combustíveis: biodiesel puro (B100); diesel puro (B0 S10) e da mistura B10, utilizados nesse estudo no tempo inicial (tempo zero).

PROPRIEDADES	Combustíveis			METODOLOGIA
	B100	B0 S10	B10 S10	
Aspecto	Límpido e isento de impurezas	Límpido e isento de impurezas	Límpido e isento de impurezas	ABNT NBR 14954
Teor de água KF (ppm)	777,3	17,4-20	174	ASTM D6304
Massa Específica 20 °C (kg/m ³)	878	837	841	ASTM D4052
Índice de Acidez (mg KOH/g)	0,25	0,309	0,262	ASTM D664
Teor de Enxofre (ppm)	11,31	7,02	8,01	ANTEK ASTM D5453
Teor de Biodiesel (% Vol)	-	0	9,95	DIN EN 14078
Teor de Metanol/Etanol (% Vol)	0,02	0	0	DIN EN 14110
Estabilidade Oxidativa (horas)	7,56	-	25,76	Rancimat EN 14112 (biodiesel) EN 15571 (mistura)
Lubricidade 60 °C (µm)	-	-	184	DIN EN ISO 12156
Viscosidade 40 °C (mm ² /s)	4,459	2,94	2,928	ASTM D445

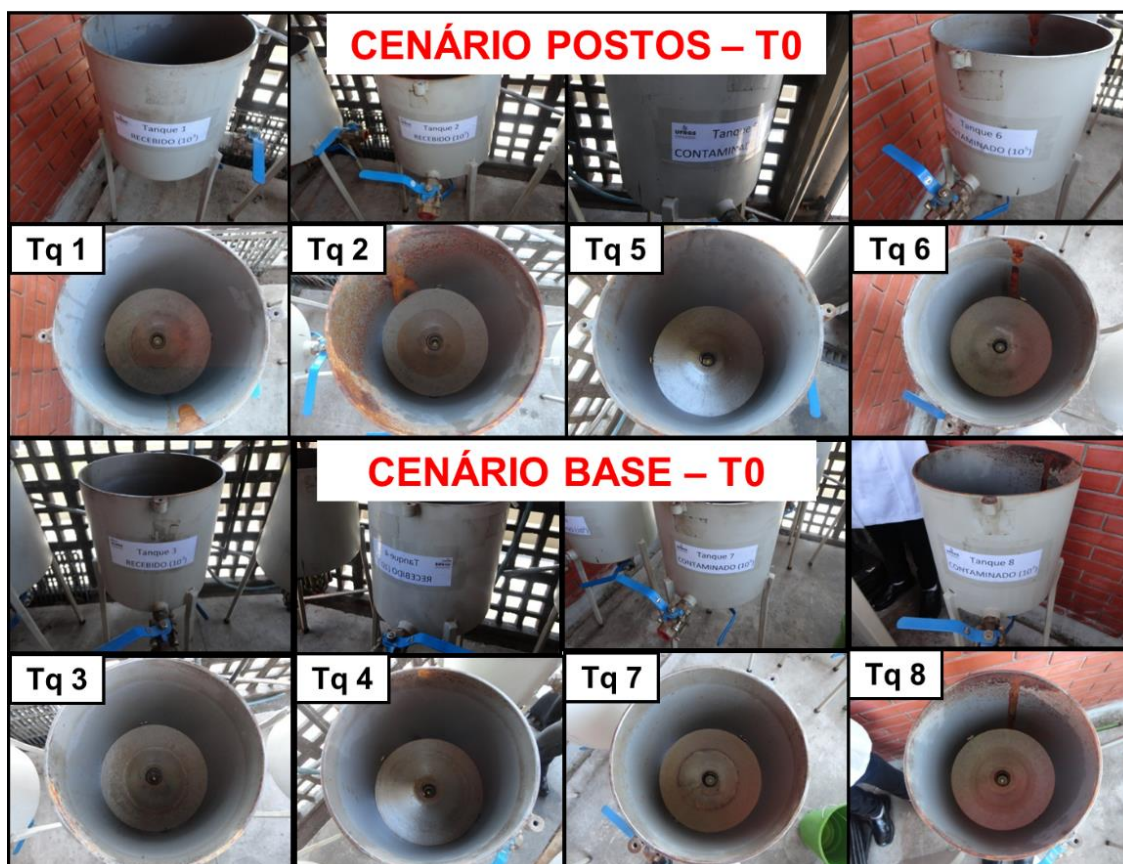


Figura 3. Vista externa e interna dos tanques (Tq) no tempo zero (24/01/2013).

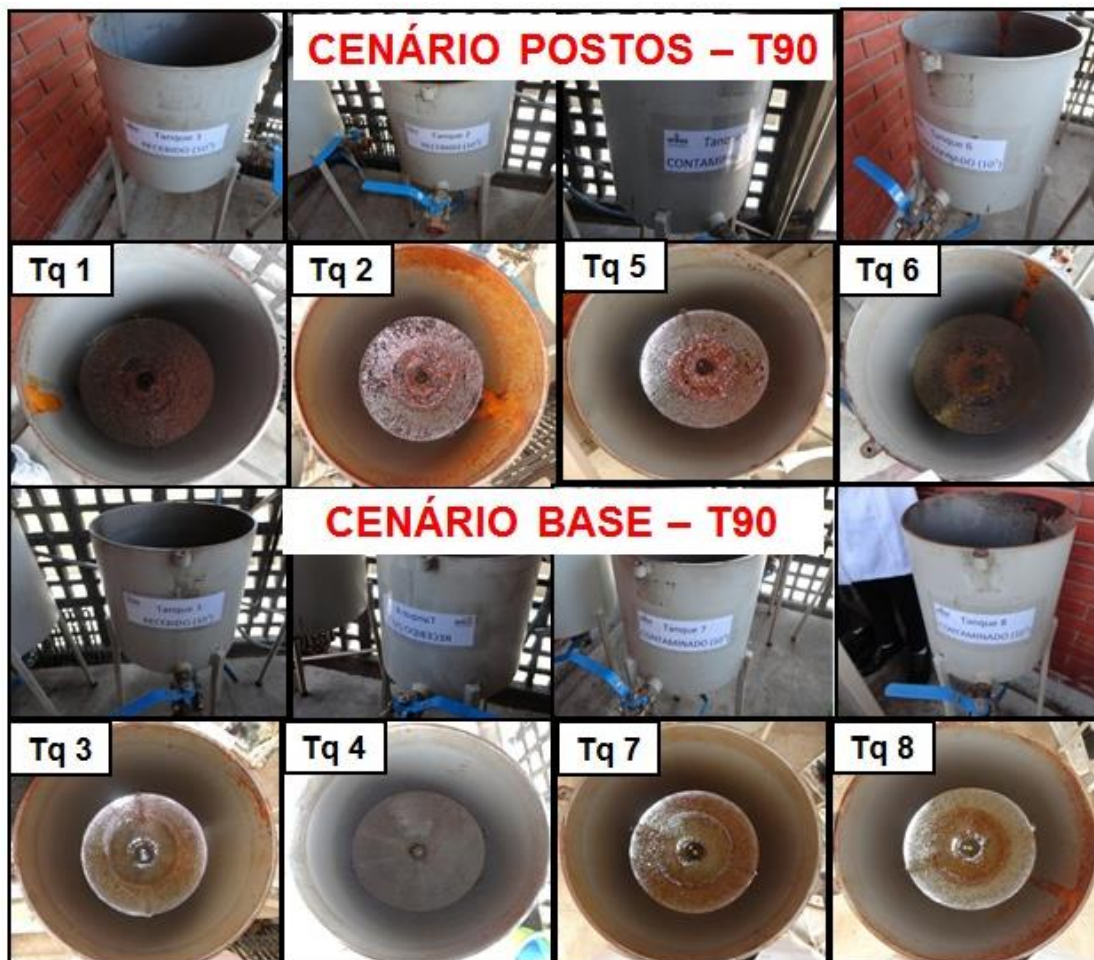


Figura 4. Vista externa e interna dos tanques (Tq) após os 90 dias de armazenamento (24/04/2013).

Lee & Little (2010) avaliaram a corrosão em tanques de estocagem com diferentes ligas metálicas (aço inoxidável, alumínio e aço carbono) expostas ao biodiesel puro (B100); convencional *high sulfur diesel* (HSD); *ultra low sulfur diesel* (ULSD) e blendas de biodiesel B5 e B10 com ULSD em contato com água destilada e adição de microrganismos. Os autores verificaram produtos de corrosão de coloração ferruginosa (marron-alaranjados) no aço carbono após 6 meses de exposição ao ULSD e HSD. Embora eles tenham detectado a presença de biofilmes em todas as combinações de combustível e ligas metálicas, o aço carbono exibiu corrosão uniforme ativa (comportamento eletroquímico positivo) em ULSD e HSD e corrosão passiva (comportamento eletroquímico negativo) em B100, B20 e B5. O alumínio foi suscetível a corrosão localizada na interface de todos os combustíveis.

Alguns tanques utilizados nesta pesquisa já apresentavam algum grau de corrosão na superfície, em função de pequenas falhas na estrutura devido ao

jateamento com granalha de ferro. O armazenamento simulado com uma fase aquosa, podem ter contribuído para acelerar o processo após 90 dias.

Com relação ao aspecto da mistura B10, no cenário Base, sem fase aquosa, não houve a formação de sedimentos no frasco amostral, porém pode-se observar microgotículas na fase óleo (Figura 5) após 90 dias de experimento. No cenário Postos, com fase aquosa, foi observado a presença de sedimentos que podem ser de origem química ou biológica (Figura 6).

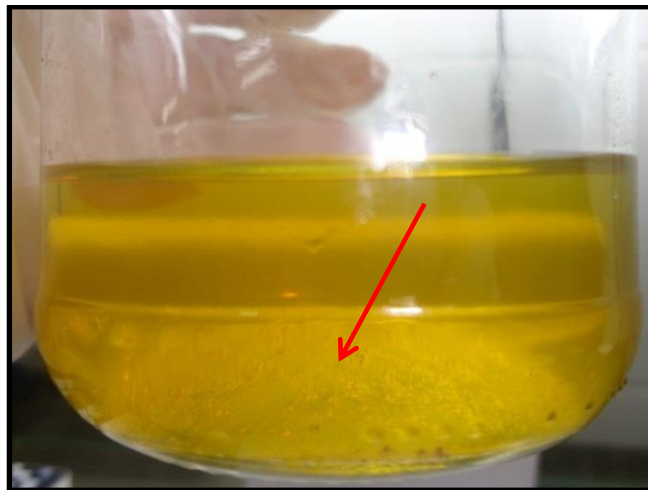


Figura 5. Aspecto da mistura B10 S10 com microgotículas de água, coletadas em tanques sem a adição de água (Tanques 3, 4, 7, 8), após 90 dias de experimento.



Figura 6. Aparência interna do tanque e aspecto do material coletado (origem química ou biológica) encontrado no fundo dos tanques com adição de água (Tanques 1, 2, 5, 6), após 90 dias de experimento.

O valor da estabilidade oxidativa, no início do experimento, estava na faixa de 26 horas (Tabela 2). Alguns dos valores, em horas, da estabilidade à oxidação (Rancimat), estão representados no tempo 60 dias em função de problemas amostrais no tempo 90. Ao final dos 90 dias, para a condição com água, foram observadas valores do Rancimat que variaram de 7 até 11 horas nos dois níveis de contaminação microbiana e no tempo 60 dias entre 6 e 9 horas (Tabela 3).

Tabela 3. Monitoramento das propriedades referentes a estabilidade química da mistura B10 ao final de 90 dias de avaliação.

Taques piloto	Nível de contaminação microbiana	Propriedades					
		EO (h)	KF (ppm)	D (kg/m ³)	IA (mgKOH/g)	S (ppm)	B (%v/v)
Tq 1 com água	Baixo	7,76	86,6	842,29	0,149	7,827	9,64
Tq 2 com água	Baixo	11,66	87,5	841,57	0,132	7,673	9,55
Tq 3 sem água	Baixo	7,50*	-	-	-	-	-
Tq 4 sem água	Baixo	8,36	82,6	843,58	0,127	7,172	9,88
Tq 5 sem água	Médio	9,03	85,8	842,08	0,135	7,419	9,62
Tq 6 com água	Médio	9,86	88,2	840,91	0,125	8,307	9,45
Tq 7 sem água	Médio	8,93*	86,5	842,41	0,133	7,519	9,76
Tq 8 sem água	Médio	9,18*	-	-	-	-	-
Parâmetros:							
Reg. Téc. ANP				815-			
4/2013		Min.	Máx.	853	Anotar	Até	Até
2/2016		20 h	200	kg/m ³		10	10 %
Resolução ANP			ppm			ppm	
69/2014							

(-) amostras extraviadas e/ou insuficientes.

*OBS: valores do tempo 60 dias em virtude de amostras extraviadas e/ou insuficientes para o tempo 90 dias.

EO = estabilidade oxidativa por Rancimat

KF = Karl Fischer (teor de água)

D = massa específica a 20 ° C (densidade)

IA = índice de acidez

S = teor de enxofre

B = teor de biodiesel

Conforme o Regulamento Técnico da ANP 03/2014 é mencionado um limite mínimo de 8 horas para a estabilidade oxidativa do biodiesel (EN 14112) e período de

indução mínima de 20 horas para a mistura BX-B30 (Regulamento Técnico ANP 2/2016), dessa forma, nem o biodiesel puro utilizado para compor inicialmente a mistura, nem a mistura B10 estiveram de acordo com o que mencionam as regulamentações seguidas (Tabelas 2 e 3).

A oxidação do combustível é um processo complexo que está diretamente relacionado a sua composição, as condições de armazenamento, oxigênio disponível, a propriedade dos materiais em contato com o combustível, entre outros fatores (Grishin & Zinina, 2015). O processo de hidrotratamento, para a remoção de compostos sulfurados no óleo diesel e obtenção do diesel com ultra baixo teor de enxofre (ULSD), foi relatado como mais suscetível a oxidação em virtude do acúmulo de hidroperóxidos na sua composição e aumento do índice de acidez (Grishin & Zinina, 2015). No nosso trabalho, a mistura B10 S10 pode ter influenciado negativamente na estabilidade oxidativa que apresentou desconformidade com o Regulamento Técnico ANP 2/2016.

Na análise do teor de água, o biodiesel puro (B100), utilizado na confecção da mistura B10, apresentou o valor de 777,3 ppm (Tabela 2), ou seja, fora de especificação que é de 200 ppm (ANP 03/2014), sendo admitido uma variação de 50 mg kg⁻¹ e 150 mg kg⁻¹ para produtor e distribuidor, respectivamente. No entanto, a concentração de água na mistura B10, no início dos experimentos, foi de 174 ppm. O teor de água (Karl Fischer) reduziu com o tempo de estocagem, partindo-se de valores na faixa de 174 ppm e tendo ficado abaixo do limite de 200 ppm, para a mistura (ANP 04/2013), durante os 90 dias, nas duas condições de simulação de cenário Base (sem água) e no cenário Posto (com água) (Tabela 3).

Com relação à massa específica a 20 °C (densidade), observou-se que ao final de 90 dias, para as duas condições (com água e sem água adicionada), os valores ficaram muito próximos à condição inicial do experimento (Tabela 2). Nossos resultados estão em consonância com os valores de massa específica para o óleo diesel B (815 a 853 kg/m³), conforme o Regulamento Técnico da ANP 4/2013 (Tabela 3).

Quanto à acidez, foi observado que no biodiesel puro o índice de acidez foi de 0,25 (Tabela 2) e a Norma Técnica ANP 03/2014 recomenda o valor máximo de 0,50 mg KOH/g para o biodiesel. Os valores apresentaram a tendência de redução do valor inicial, durante os 90 dias, em todas as condições avaliadas (Tabela 3). Para o óleo

diesel B não há um valor especificado, recomendando a Resolução 69/2014, complementar ao Regulamento Técnico 04/2013, anotar os valores obtidos.

Os teores de enxofre foram monitorados na mistura B10/ S10 no tempo 90 dias (Tabela 3). O acompanhamento dos teores de enxofre apresentaram-se com pequenas variações, sendo que em uma das repetições, foi constatado o teor de 5,5 (Tanque 3 recebido e sem água), no entanto, todos os tanques estão em conformidade com a especificação (ANP 4/2013) com máximo de 10 mg kg^{-1} de enxofre para o diesel S10.

Quanto ao teor de biodiesel (EN 14078) partiu-se de 9,95 % no tempo zero para B10 S10 (Tabela 2) e as amostras apresentaram-se de acordo com o esperado para a mistura utilizada, sem variações expressivas durante os 90 dias de estocagem simulada (Tabela 3). Na análise de metanol/ etanol (EN 14110) o valor obtido para B100 foi de 0,02 % apresentando conformidade com o Regulamento Técnico ANP 03 /2014 que menciona máximo de 0,20 % de massa.

A lubricidade da mistura B10 foi verificada no tempo zero (184 μm) nos Tanques 1 (sem água) e 4 (com água) aos 90 dias. No Tanque 1 foi observado lubricidade de 208 μm e no Tanque 4, de 194 μm , ambos os tanques estão de acordo com ANP 04/2013 que apresenta limites de lubricidade de 460 μm . A redução da lubricidade é uma das propriedades perdidas com o processo de hidrotratamento para a remoção do enxofre no combustível, mas a adição de 1 a 2 % de biodiesel restaura a lubricidade do ULSD, além do uso de aditivos (Knothe, 2005). A mistura B10, utilizada neste experimento pode ter auxiliado na manutenção dos níveis de lubricidade ao final de 90 dias de experimento.

A viscosidade cinemática a 40 °C foi avaliada somente no tempo zero e tanto para o biodiesel, quanto para o diesel e mistura B10 (Tabela 2) apresentou valores dentro do esperado para os Regulamentos Técnicos ANP 03/2014 (3 - 6 mm^2/s para o biodiesel) e 04/2013 (2,0 - 4,5 mm^2/s para o diesel e misturas).

Foi realizada uma análise por componentes principais (PCA) para verificar a correlação entre os parâmetros de estabilidade química na mistura B10 em todos os tanques e tratamentos ao longo de 90 dias (Figura 7). De forma geral, houve uma tendência de aumento da densidade (massa específica) e uma redução da estabilidade oxidativa ao longo do tempo (30, 60, 90 dias) (Figura 7B). O gráfico de escores da PCA (PC2) mostra que com o passar do tempo ocorreu modificações nas amostras de todos os tanques, com base no tempo zero (B10 S10) (Figura 7A). Em

especial, o Tanque 04 (sem água e contaminação) sugere um ligeiro aumento de densidade (massa específica) desde o tempo 30. Por outro lado, os Tanques 2, 5 e 6 (com água) apresentaram as menores densidades, comparados aos demais tanques e elevada estabilidade oxidativa no tempo 30 dias, conforme tendência observada na Tabelas 3.

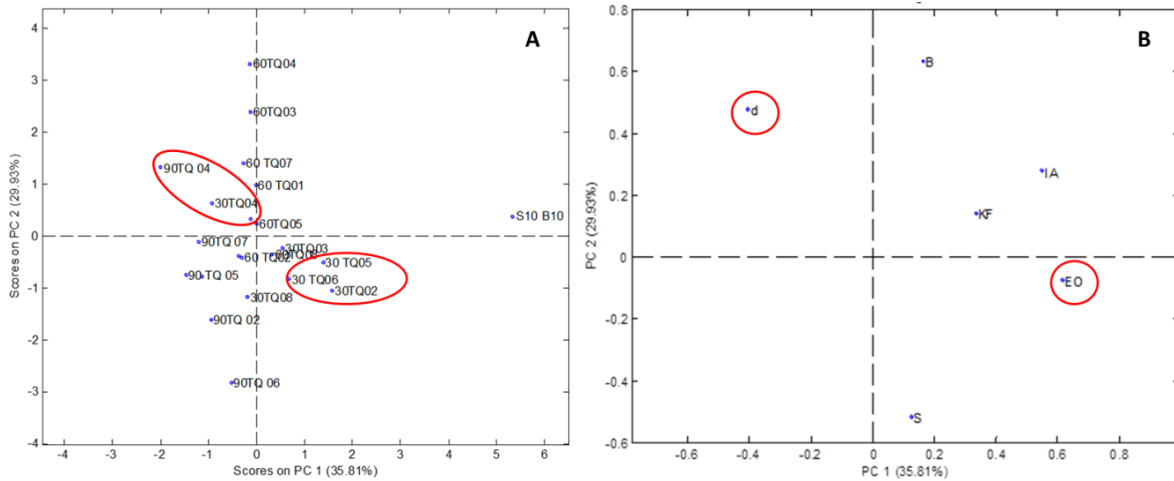


Figura 7. Gráficos PC1 X PC2 de escores (A) e de pesos (B) para a análise por componentes principais empregando os parâmetros: % biodiesel (B); massa específica (d); índice de acidez (IA); teor de água (KF); estabilidade oxidativa (EO) e teor de enxofre (S).

Na Figura 8, a componente principal 3 (PC3) da PCA mostra que com o passar do tempo houve um aumento no teor de água (Karl Fischer) em todas as amostras independente de possuírem água nos tanques corroborando com os dados da Tabela 3.

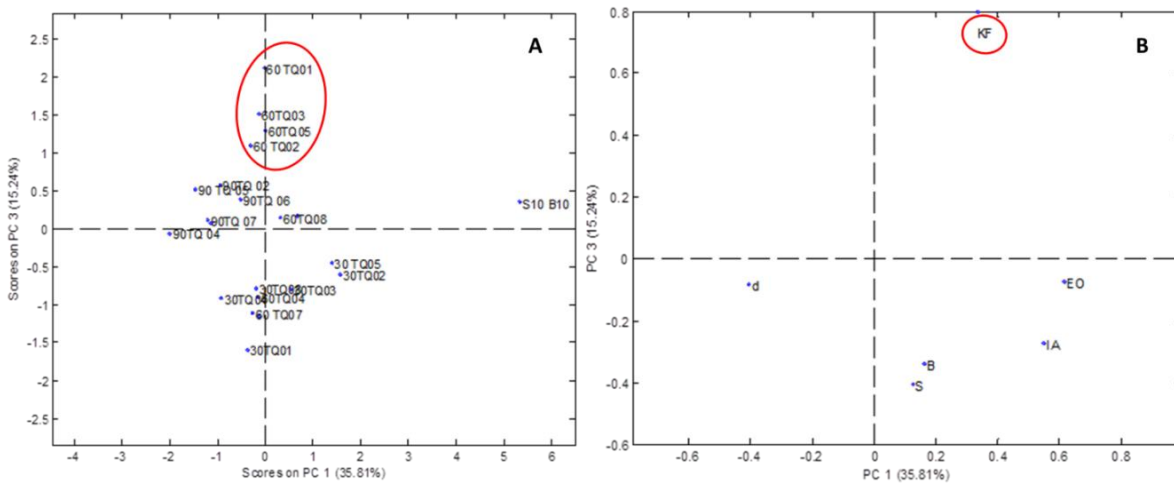


Figura 8: Gráficos PC1 X PC3 de escores (A) e de pesos (B) para a análise por componentes principais empregando os parâmetros: % biodiesel (B); massa específica (d); índice de acidez (IA); teor de água (KF); estabilidade oxidativa (EO) e teor de enxofre (S).

Por outro lado, especialmente do tempo 30 para 60 e principalmente nos Tanques 1, 2, 5 (com água) e 3 (sem água), essa tendência foi mais pronunciada, mas de qualquer maneira estando em consonância com o Regulamento Técnico ANP 3/2014.

7.3.2 Análises bióticas

7.3.2.1 Estimativa da contaminação microbiana

Os tanques de estocagem simulada com a mistura B10 foram monitorados, considerando-se que apresentavam contaminação microbiana, classificada como aceitável (condição de recebido) e média contaminação, onde se adicionou microrganismos, não caracterizados, conforme sugerido na norma ASTM E 1259-10. A condição limitante para o desenvolvimento microbiano em tanques de estocagem é a presença de água. Neste estudo, foi simulada a presença e ausência de água no fundo dos tanques, correspondendo ao cenário de Postos e Base, respectivamente. Os resultados da estimativa de microrganismos, presentes durante os 90 dias de estocagem para todos os tanques, são apresentados na Figura 9.

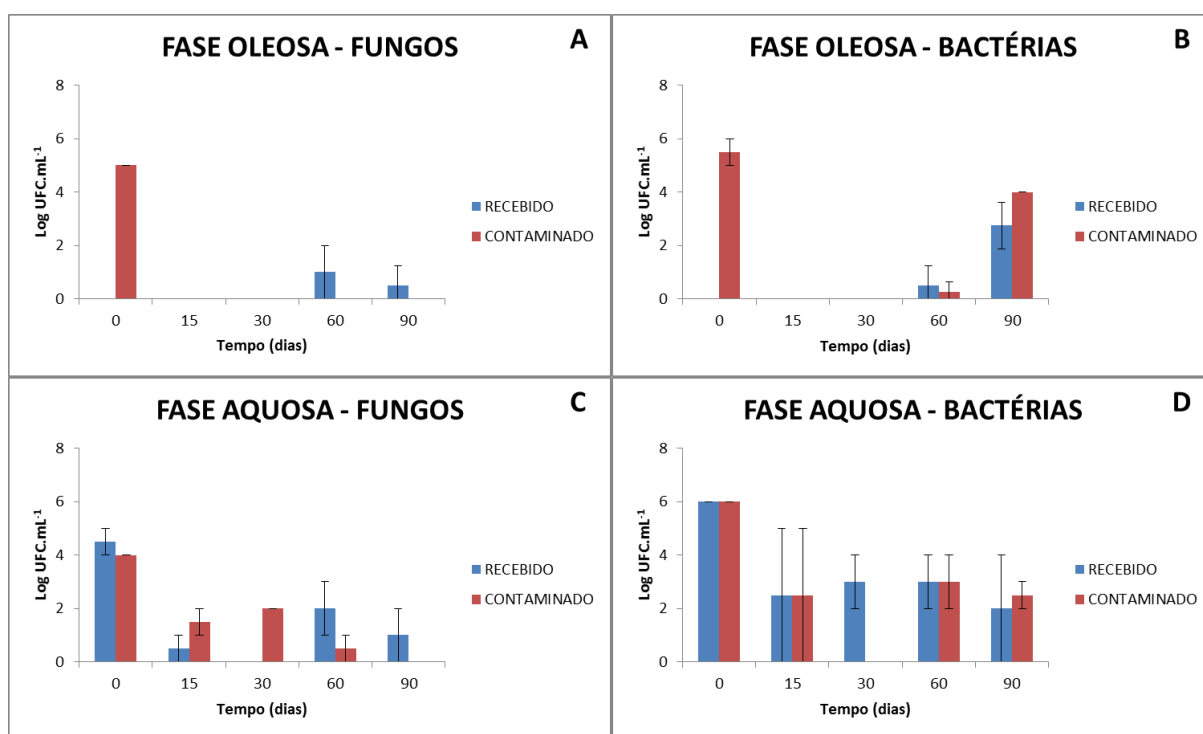


Figura 9. Estimativa de microrganismos cultiváveis da fase oleosa (todos os tanques) e aquosa (Tanques 1, 2, 5 e 6) da mistura B10 pela técnica de laminocultivos, na condição de recebido e média contaminação. **A:** fase oleosa - Fungos; **B:** fase oleosa - Bactérias; **C:** fase aquosa - Fungos; **D:** fase aquosa - Bactérias.

A Figura 9A mostra o monitoramento para fungos na fase oleosa, sendo que o seu número inicial foi cerca de 10^5 propágulos mL^{-1} e observou-se que durante

os 90 dias de estocagem, os fungos não se desenvolveram na condição de contaminado. Tanto na condição de recebido como contaminado a estimativa de fungos ficou abaixo do limite de detecção. Esse resultado sugere que a ausência de água (Tanques 3, 4, 7 e 8) pode ter sido a responsável pela falta de crescimento desse grupo microbiano. No entanto, para as bactérias, o método de laminocultivo mostrou aumento na população aos 90 dias, provavelmente pela incorporação de alguns ppms de água na fase óleo (Figura 9B), e essa condição pode ser verificada na Figura 5. Nos Tanques 1, 2, 5, e 6 foi observado que mesmo com a presença de água, a estimativa dos microrganismos (fungos e bactérias) cultiváveis, ficou na faixa considerada aceitável para sistemas de combustíveis (Hill e Hill, 2009), durante 90 dias de avaliação (Figuras 9C e 9D).

Tanto na condição de Postos (com adição de água), quanto na condição de Base (sem a adição de água) foi realizada uma estimativa de microrganismos cultiváveis, a partir de laminocultivos, a fim de visualizar alguma mudança na população microbiana. No entanto, a Figura 10 apresenta a confirmação de que, independente da presença de água, durante 90 dias, não foi observado expressivo aumento na população dos microrganismos (fungos e bactérias) tanto das amostras da fase aquosa quanto oleosa. Os resultados indicaram que o número de microrganismos está na faixa de contaminação considerada aceitável para combustíveis que é de aproximadamente 10^3 UFC L⁻¹.

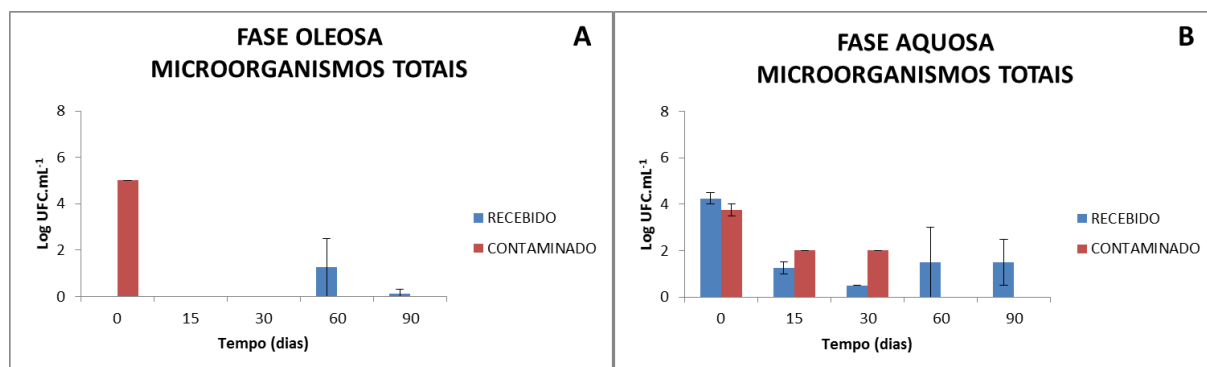


Figura 10. Estimativa de microrganismos cultiváveis na fase oleosa (todos os tanques) e fase aquosa (Tanques 1, 2, 5, e 6) da mistura B10 pela técnica de laminocultivos, na condição de recebido e média contaminação. **A:** fase oleosa - Microrganismos totais; **B:** fase aquosa - Microrganismos totais.

Dodos e colaboradores (2011), utilizaram o método de laminocultivos para detecção da contaminação microbiana total da fase aquosa em contato com diesel ULSD (*ultra low sulfur diesel*) e LSD (*low sulfur diesel*) com 5 %, 10 % e 20 % de

misturas de biodiesel e observaram que B20 ULSD (6 ppm S) foi o mais suscetível ao crescimento microbiano ($10^5 - 10^6$ UFC mL⁻¹) do que a mistura B10 e B5 ULSD (10^4 UFC mL⁻¹), após 16 semanas de avaliação. Neste trabalho, utilizando a mistura B10 S10 (7,02 ppm S), foi constatado que todos os tanques com fase oleosa e, mesmo aqueles com fase aquosa, apresentaram nível de contaminação abaixo de 10^3 UFC mL⁻¹, seja por bactérias, fungos ou microrganismos cultiváveis totais ao final de 90 dias. A exceção ocorreu na detecção de bactérias na fase oleosa onde os tanques contaminados apresentaram cerca de 10^4 UFC mL⁻¹ (Figura 9B), considerada média contaminação. As possíveis alterações na estabilidade oxidativa desse estudo podem estar relacionadas com presença de contaminações (Dodds et al., 2011).

7.3.2.2 Microrganismos deteriorantes em meios de cultivo seletivo

A investigação de grupos microbianos importantes nos processos de biocorrosão, em sistemas de óleos combustíveis armazenados, foi realizada nos tanques que tiveram a adição de água (Tanques 1, 2, 5, 6). No entanto, a presença de BRS não foram detectadas, com a metodologia avaliada (Postgate E), ao final dos 90 dias de experimento. A detecção do grupo de bactérias redutoras de ferro foi observada, no inóculo não caracterizado (tempo zero), utilizado no experimento, a partir de meio seletivo para esse grupo microbiano (citrato férrico amoniacal verde). As ferroredutoras são capazes de reduzir íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), sendo consideradas anaeróbios facultativos (Little & Lee, 2014). Algumas espécies podem precipitar óxido férrico (Fe_2O_3) durante o metabolismo heterotrófico (Khan et al., 2010). Segundo Sobolev & Roden (2001), na oxidação bacteriana do ferro (Fe^{3+}) ocorre o acoplamento das reações de oxidação e redução pela produção de óxidos amorfos ou óxidos férricos (Fe^{3+}) cristalinos que estão prontamente disponíveis para bactérias que reduzem o ferro (Fe^{3+}), tais como *Thiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus* sp. e *Bacillus megaterium*. A corrosão de origem biológica ou corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é um tipo de corrosão influenciada por microrganismos e seus metabólitos principalmente no contato de metais com o meio aquoso (Little et al. 1992). A detecção de bactérias redutoras de ferro, no inóculo utilizado no experimento, sugere uma possível influência na corrosão, observada nos sedimentos dos tanques que foram adicionados água (Tanques 1, 2, 5, 6), embora não tenham sido detectadas na fase aquosa desses tanques pelo método de cultivo utilizado (citrato férrico amoniacal verde).

7.3.2.2.1 Identificação molecular com sequenciamento total do gene rRNA 16S

Os resultados das colônias provenientes do inóculo não caracterizado (tempo zero) e que se desenvolveram no meio de cultivo seletivo, ágar citrato amoniacal verde, identificaram dois isolados de *Bacillus aryabhatai* com 99 % de similaridade no sequenciamento total do gene rRNA 16S.

O gênero *Bacillus* é bem relatado na literatura por conter espécies relacionadas a corrosão de metais (Emde et al., 1992; Khan et al., 2010); contaminação de óleo diesel (Gaylarde et al., 1999), biofilmes (Marangoni et al., 2013), biodegradação de biodiesel e suas misturas (Bücker et al., 2014; Soriano et al., 2015). Emde e colaboradores (1992), detectaram as bactérias redutoras de ferro como predominante grupo de microrganismos isolados de tubulações em sistemas de distribuição de água com corrosão microbiologicamente influenciada (MIC). *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*; *P. aeruginosa*; *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp. and *Edwardsiella* sp. foram as mais prevalentes.

A bactéria *Bacillus aryabhatai* foi a primeira vez isolada de amostras da atmosfera em altitudes entre 27 e 41 km que correspondem a camada estratosférica (Shivaji et al., 2009) e posteriormente nos mais diversos nichos ecológicos como solo, rizosfera, profundezas oceânicas e relacionada com a degradação do inseticida organofosfato (Pailan et al., 2015). No nosso trabalho, foi identificado *B. aryabhatai* de amostras provenientes de tanques de diesel S500 e misturas B4/B5, aclimatadas com a mistura B10 S10 para esse experimento. Esse resultado confirma a versatilidade do gênero *Bacillus* nos mais diversos ambientes e sugerem o pioneiro registro de *Bacillus aryabhatai* isolado de diesel e misturas de biodiesel.

7.3.2.3 Produção de sedimentos biológicos e químicos

Os resultados referentes ao peso seco da biomassa podem ser visualizados na Figura 11 na condição de Postos (com água). Aos 90 dias de estocagem, os Tanques contaminados 5 e 6 apresentaram cerca de 15 % e 24 %, respectivamente, a mais biomassa comparados aos Tanques 1 e 2 (condição de recebido). Esses resultados podem estar relacionados com a média contaminação dos Tanques 5 e 6 embora estes sedimentos possam ser em função da degradação abiótica e corrosão química dos tanques devido aos sedimentos gerados nos tanques sem adição de contaminação (Figura 6).

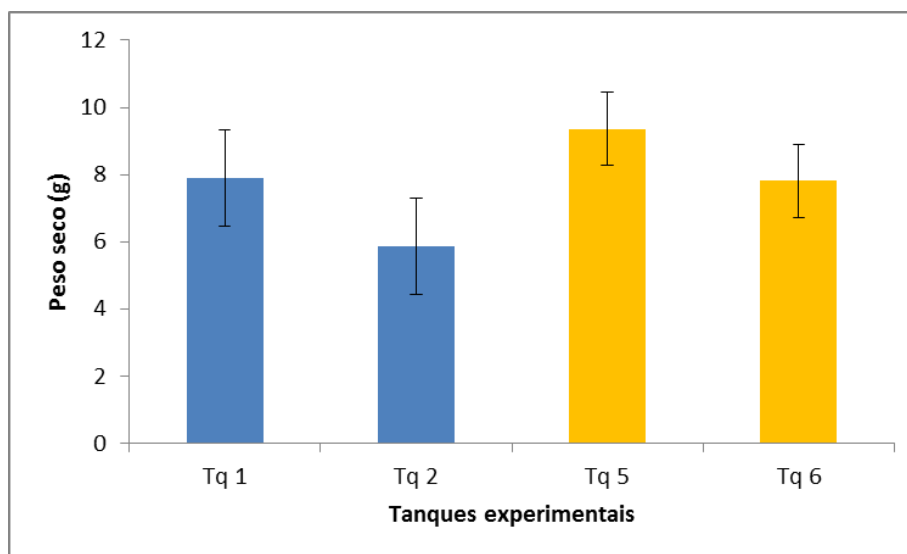


Figura 11. Produção de biomassa/sedimentos formada na condição de Postos (com adição de água) nos tanques com baixa (Tanques 1 e 2) e média contaminação microbiana (Tanques 5 e 6) no tempo 90 dias.

Jakeria et al. (2014) verificaram que a autoxidação do biodiesel degrada mais rapidamente o combustível devido ao longo tempo de exposição e contato com a superfície metálica que o crescimento microbiano e contaminação pela água. Nesse experimento, podemos inferir sobre biomassa de origem microbiana, mas também depósitos de hidróxido de ferro proveniente da redução do íon férrico por bactérias ferroredutoras misturados a sedimentos gerados da autoxidação e perda de estabilidade da mistura B10 após 90 dias.

7.3.3 Avaliação da degradação

Os resultados de degradação da fase oleosa de todos os tanques ao longo de 90 dias de estocagem simulada estão apresentados no dendrograma da Figura 12. Na análise por espectroscopia no infravermelho foi possível detectar mudanças estruturais que possivelmente estão relacionadas a porção das metilas terminais dos ésteres do ácidos graxos do biodiesel, decorrentes da degradação (química ou biológica) na mistura B10 nos diferentes tempos comparados aos controles (tempo zero). Os Tanques 6, 7 e 8 (tanques contaminados) apresentaram maior tendência a degradação que os demais tanques nos primeiros 15 dias (grupo em verde). Com o passar do tempo (60 e 90 dias), todos os tanques apresentam semelhantes tendência de degradação, com exceção dos Tanques 1 e 2 (recebido com água), onde a evolução foi menos pronunciada.

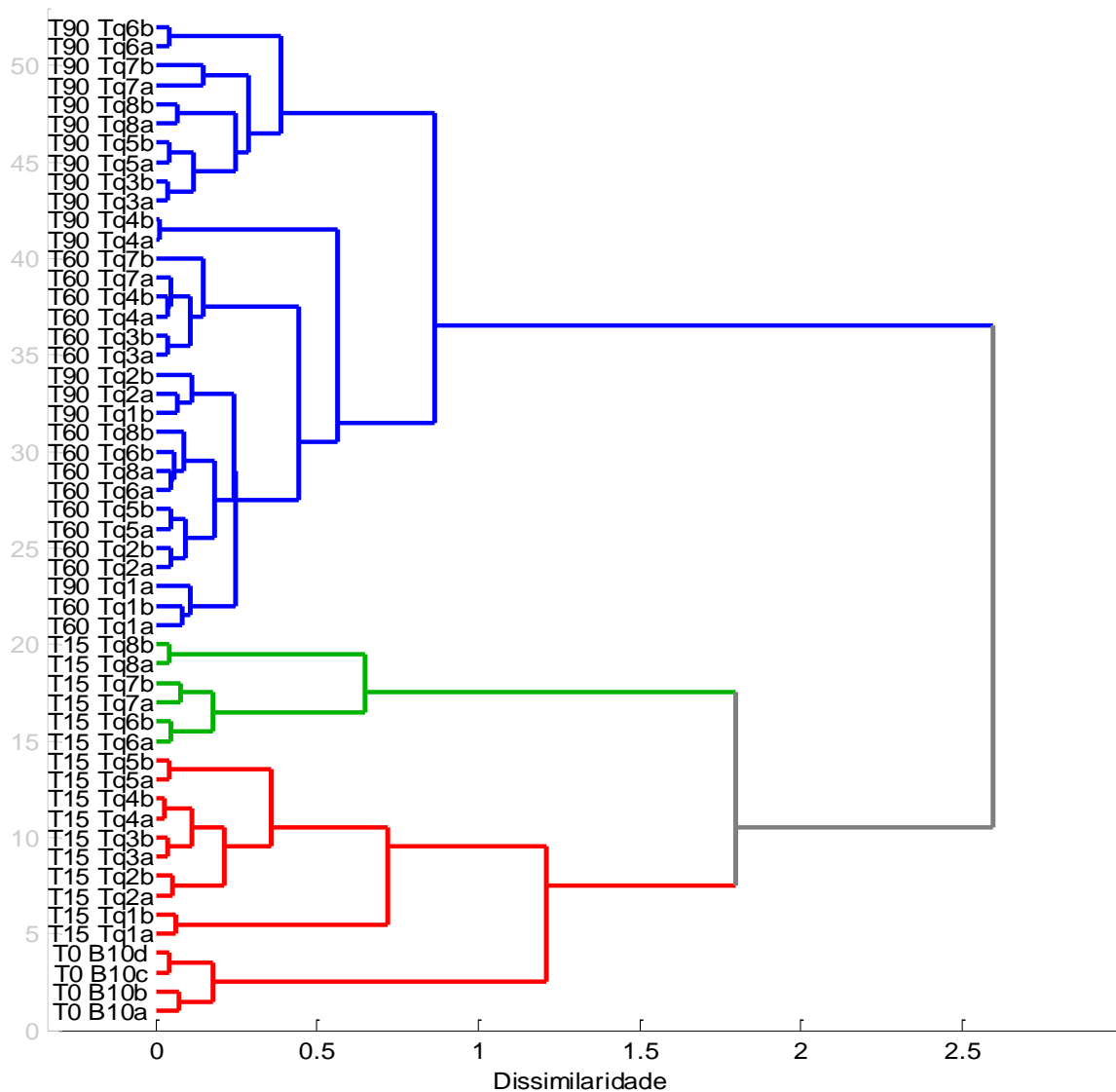


Figura 12. Dendrograma obtido para os espectros no infravermelho da fase oleosa da mistura B10 para todos os tanques nos tempos 0, 15, 30, 60, 90.

Na PCA (Figura 13) foi possível confirmar a tendência de degradação observada na análise hierárquica de agrupamento (Figura 12). No tempo 90 dias todos os tratamentos sofreram degradação, semelhante ao observado no tempo 60 dias, porém os Tanques 6, 7 e 8 (contaminados) apresentaram maior tendência a degradação em relação aos demais tanques.

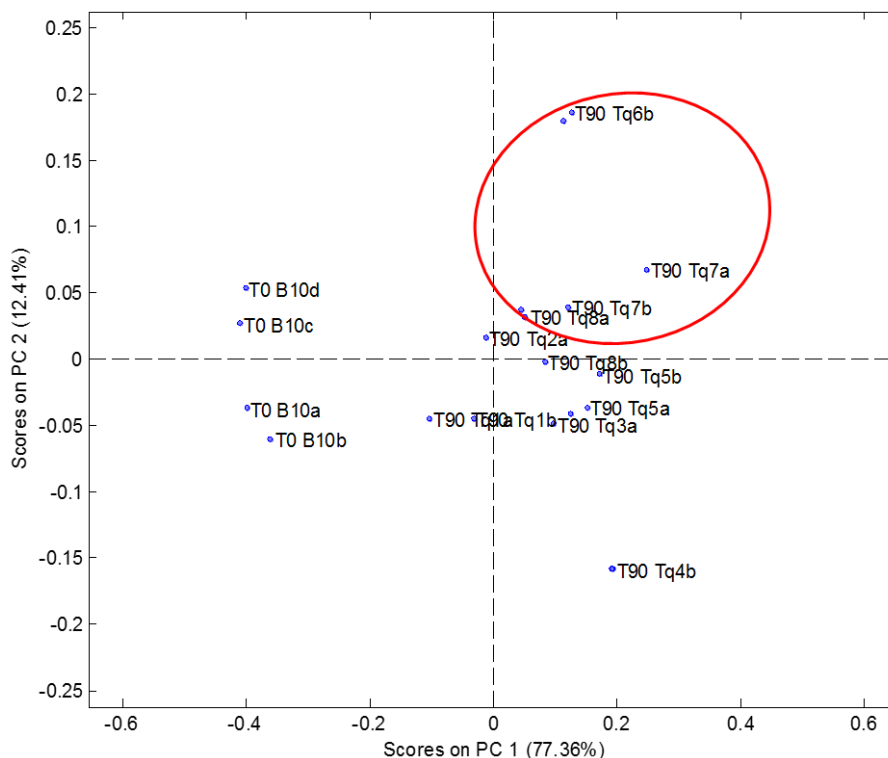


Figura 13. Gráfico de escores PC1 x PC2 para a análise por componentes principais (PCA) dos espectros no infravermelho para a fase oleosa da mistura B10 de todos os tanques no tempo 90 dias de estocagem.

A Figura 14 mostra a degradação da fração do biodiesel no tempo 90 dias. Foi possível verificar que houve aparente degradação da metila terminal do grupo éster como fonte de carbono preferencial para todos os tanques visualizados pelos sinais, entre $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo CH_3 e estiramento do grupo carbonila como produto de degradação entre $1720 - 1700 \text{ cm}^{-1}$. Especialmente para os tanques que foram contaminados (Tanques 6, 7, 8), esses resultados sugerem degradação de origem microbiana.

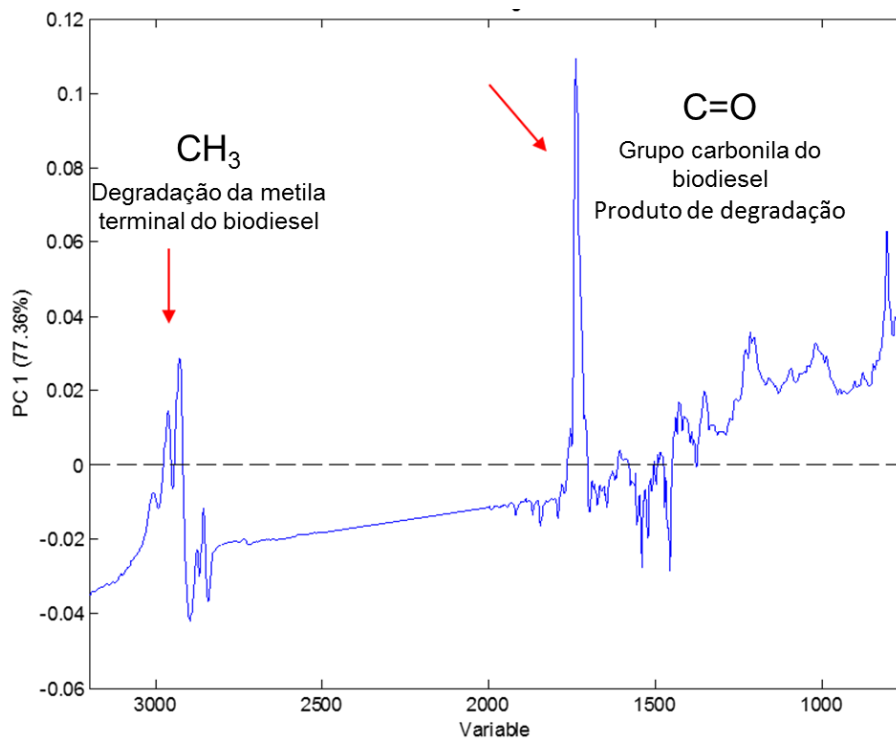


Figura 14. Gráfico dos pesos obtido pela análise no infravermelho da fase oleosa de todos os tanques no tempo 90 dias de estocagem.

A análise no infravermelho demonstrou a degradação da fração éster do biodiesel de todos os tratamentos, porém a tendência de degradação dos tanques que receberam a contaminação microbiana, tanto aos 15 dias, quanto aos 90 dias de experimento confirmam a literatura a respeito da biodegradabilidade do biodiesel (Pasqualino et al., 2006; Sørensen et al., 2011; Silva et al., 2012; Bücken et al., 2014). O biodiesel é biologicamente mais suscetível a degradação microbiana pela presença de ésteres de ácidos graxos - FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) e cadeia de hidrocarbonetos com dois átomos de oxigênio (Zhang et al., 1998). Muitos microrganismos possuem enzimas que facilmente podem atacar essa estrutura. Na degradação cometabólica os FAMES são oxidados na posição beta do carbono (segundo carbono ligado ao grupo funcional) e degradado a ácido acético e ácido graxo via β -oxidação (Aktas et al., 2010). Os produtos de degradação são utilizados no metabolismo respiratório ou diretamente nos lipídeos celulares (Vieira et al., 2006).

A redução de compostos sulfurados no diesel é extremamente positiva do ponto de vista ambiental. Por outro lado, pode afetar negativamente as propriedades de funcionamento do combustível, como por exemplo, diminuição da resistência da oxidação térmica e capacidade de lubrificação do combustível (Grishin & Zinina,

2015). Embora resultados similares tenham sido reportados na literatura os dados de estabilidade ao armazenamento com aspectos físico/químicos, análises microbiológicas juntamente com resultados de degradação gerados nessa pesquisa podem auxiliar na compreensão dos processos de biodeterioração da mistura B10 brasileira.

7.4 Conclusões

A avaliação da estabilidade ao armazenamento da mistura B10, confeccionada com óleo diesel S10 durante 90 dias de armazenagem simulada no verão da Região Sul do Brasil mostrou que a degradação abiótica manteve as propriedades de aparência, massa específica a 20 °C, teor de enxofre, teor de biodiesel, teor de água, viscosidade cinemática a 40 °C, lubricidade a 60 °C, índice de acidez e teor de metanol/etanol dentro dos limites exigidos pela ANP. No entanto, com relação à estabilidade oxidativa (Rancimat) foi observado redução nos valores em todo o período experimental. Os níveis de contaminação microbiana para a fase aquosa e oleosa nas duas condições avaliadas, baixa e média contaminação (10^5 células/esporos mL^{-1}), permaneceram dentro dos limites aceitáveis para sistemas de combustíveis utilizando a estimativa por laminocultivos. A excessão ocorreu para a condição de contaminado na fase oleosa que sugere situação de alerta para a contaminação bacteriana (10^4 UFC mL^{-1}) ao final de 90 dias.

A presença de bactérias que reduzem o ferro, detectadas no inóculo utilizado, pode ser um indicativo dos sedimentos encontrados na condição Postos (com água) ao final do experimento.

Os resultados de degradação, pela análise de infravermelho, das amostras de óleo indicaram que a fração biodiesel foi degradada ao longo do tempo quando comparados aos controles (tempo zero). A presença de água não foi determinante para a degradação, mas a condição de contaminado (Tanques 6, 7 e 8) apresentou maior degradação da fração biodiesel, no tempo 15 dias, que os controles e os tanques conforme recebido. Ao final dos 90 dias foi observada a degradação em todos os tratamentos.

Agradecimentos

O financiamento deste projeto foi concedido pela CNPq e CAPES/FAPERGS. Agradecemos também a Ipiranga Produtos de Petróleo S/A pelo fornecimento dos combustíveis e suporte técnico.

Referências

- ABNT NBR 14954/2011 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Combustível destilado - Determinação da aparência.** 8p.
- Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Ray RY, Davidova IA, Lyles CN, Suflita JM. 2010. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. *Energy Fuels.* 24:2924-28.
- Aquino LP, Hernandez RPB, Chicoma DI, Pinto HPF, Aoki IV. 2012. Influence of light, temperature and metallic ions on biodiesel degradation and corrosiveness to copper and brass. *Fuel.* 102:795-807.
- ASTM D445-15a - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity).** 2015. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2015. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D445>. Acesso em: 29 Ago 2016.
- ASTM D664-11a - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration.** 2011. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2011. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D664>. Acesso em: 29 Ago 2016.
- ASTM D4052-15 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Density, Relative Density, and API Gravity of Liquids by Digital Density Meter.** 2015. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2015. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D4052>. Acesso em: 21 Jan 2016.
- ASTM D4176-04 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Free Water and Particulate Contamination in Distillate Fuels (Visual Inspection Procedures).** 2014. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2014. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D4176>
- ASTM D5453-16 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Determination of Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Spark Ignition Engine Fuel, Diesel Engine Fuel, and Engine Oil by Ultraviolet Fluorescence.** 2016. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2016. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D5453>. Acesso em: 29 Ago 2016.
- ASTM D6304-07 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration (Withdrawn 2016).** 2007.

West Conshohocken, PA: ASTM International; 2007. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D6304>. Acesso em: 29 Ago 2016.

ASTM E1259-10 - American Society for Testing and Materials. **Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C**. 2010. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2010. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E1259>. Acesso em: 21 Jan 2016.

Bücker F, Barbosa CS, Quadros PD, Bueno MK, Fiori P, Huang C, Frazzon APG, Ferrão MF, Camargo FAO, Bento FM. 2014. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int Biodeter Biodegr*. Doi 10.1016/j.ibiod.2014.05.030.

Bücker F, Santestevan N, Jacques RJS, Peralba MCR, Camargo FAO, Gaylarde CC, Bento FM. 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int Biodeter Biodegr*. 65(1):172-78.

Bushnell LD, Haas HF. 1941. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *J Bacteriol*. 41(5):653-73.

Cazarolli JC, Guzatto R, Samios D, Peralba MCR, Cavalcanti EHS, Bento FM. 2014. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int Biodeter Biodegr*. 95:1-9. Doi 10.1016/j.ibiod.2013.09.025.

CETESB. 1988. Bactérias heterotróficas que precipitam o ferro – contagem: método de ensaio. **Norma Técnica I5207**. p. 1-11.

DIN EN 12156-1:2006 - International Organization for Standardization. **Diesel fuel – Assessment of lubricity using the high-frequency reciprocating rig (HFRR) – Part 1: Test method**. German version EN ISO 12156-1:2006.

DIN EN 14078:2014-09 - International Organization for Standardization. **Liquid petroleum products – Determination of fatty acid methyl ester (FAME) content in middle distillates – Infrared spectrometry method**. German version EN 14078:2014.

DIN EN 14110:2003 - International Organization for Standardization. **Fat and oil derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of methanol content**. 2003.

DIN EN 14112. **Fat and Oil Derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of Oxidation Stability (Accelerated Oxidation Test)**. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2003.

DIN EN 15571. **Machines and Plants for Mining and Tooling of Natural Stone - Safety - Requirements for Surface Finishing Machines**. German version pren15571:2013.

- Dodos GS, Konstantakos T, Longinos S, Zannikos F. 2011. Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Proceedings of the 12th International Conference Science and Technology**, 8-10 September. Rhodes/Greece. p. A431-39.
- Emde KME, Smith DW, Facey R. 1992. Initial investigation of microbially influenced corrosion (MIC) in a low temperature water distribution system. *Wat Res.* 26(2):169-75.
- Fazal MA, Haseeb ASMA, Masjuki HH. 2010. Comparative corrosive characteristics of petroleum diesel and palm biodiesel for automotive materials. *Fuel Process Technol.* 91:1308-15.
- Gaylarde CC, Bento F, Kelley J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Braz J Microbiol.* 30:1-10.
- Grishin DF, Zinina ND. 2015. Review: Environmentally Friendly Diesel Fuels with Low and Ultralow Sulfur Content and Additives to Them. *Russ J Appl Chem.* 88(7):1106-21.
- Herrick JB, Madsen EL, Batt CA, Ghiorse WC. 1993. Polymerase Chain Reaction Amplification of NaphthaleneCatabolic and 16S rRNA Gene Sequences from Indigenous Sediment Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 59(3):687-94.
- Hill EC, HILL GC. 2009. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. **Proceedings of the 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels - IASH**. 18-22 October. Prague/ Czech Republic.
- Jakeria MR, Fazal MA, Haseeb ASMA. 2014. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renew Sustainable Energy Rev.* 30: 154-63.
- Khan MR, Saha ML, Begum N, Mohammad NI, Hoque S. 2010. Isolation and characterization of bacteria from rusted iron materials. *Bangladesh J Bot.* 39(2):185-91.
- Knothe G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol.* 86:1059-70.
- Knothe G. 2007. Review: Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process Technol.* 88:669-77.
- Knothe G, Steidley KR. 2005. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity. *Energ Fuel.* 19:1192-1200.
- Lee JS, Ray RI, Little BJ. 2010. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling.* 26(6):623-35.

- Lei **11.097.** 2005. DOU 14.1.2005. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml?f=templates\\$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml?f=templates$fn=default.htm&sync=1&vid=anp:10.1048/enu). Acesso em: 27 maio 2016.
- Lei **13.263.** 2016. DOU 24.03.2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=24/03/2016>. Acesso em: 27 maio 2016.
- Little B, Lee J. 2014. Microbiologically influenced corrosion: an update. *Int Mater Rev.* 59(7):384-93.
- Little B, Wagner P, Mansfeld F. 1992. An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochim Acta.* 37(12):2185-94.
- Lôbo IP, Ferreira SLC. 2009. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim Nova.* 32(6):1596-608.
- Lyles CN, Aktas DF, Duncan KE, Callaghan EV, Stevenson BS, Suflita JM. 2013. Impact of Organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environ Sci Technol.* 47:6052-62.
- Marangoni PRD, Robl D, Dalzoto PR, Berton MAC, Vicente VA, Pimentel IC. 2013. Microbial Diversity of Biofilms on Metallic Surfaces in Natural Waters Case Study in a Hydropower Plant on Amazon Forest. *JWRHE.* 2(4):140-48.
- Mushrush GW, Willauer HD, Wynne JH, Lloyd CT, Bauserman JW. 2011. Storage Tank Stability of Soybean-derived Biodiesel. *Energ Source Part A.* 33(24):2303-08. Doi 10.1080/15567030903530590.
- Pailan S, Gupta D, Apte S, Krishnamurthi S, Saha P. 2015. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. *Int Biodeterior Biodegrad.* 103:191-95. Doi:10.1016/j.ibiod.2015.05.006.
- Pasqualino JC, Montané D, Salvadó J. 2006. Syntetic effects os biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass Bioenerg.* 30:874-79.
- Passman FJ. 2012. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - A review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 81:88-104.
- Passman FJ, Dobranick JK. 2005. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. **Proceedings of the 9th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels - IASH.** Sidges/Spain. p. 18-22.
- Pawelec B, Navarro RM, Campos-Martin JM, Fierro JLG. 2011. Towards near zero-sulfur liquid fuels: a perspective review. *Catal Sci Technol.* 1:23-42.

Postgate JR. 1984. **The Sulphate reducing bacteria**, Cambridge University Press, Cambridge/London. 208 p.

Regulamento Técnico ANP 2/2016. **Parte integrante da Resolução 30 de 23.06.2016 da Agência Nacional do Petróleo – ANP**. DOU 24.06.2016. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em: 07 Julho 2016.

Regulamento Técnico ANP 3/2014. **Parte integrante da Resolução 45 de 25.8.2014 da Agência Nacional do Petróleo – ANP**. DOU 26.8.2014. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Regulamento Técnico ANP 4/2013. **Parte integrante da Resolução 50 de 23.12.2013 da Agência Nacional do Petróleo – ANP**. DOU 24.12.2013. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document_frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document_frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 50. 2013. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 50 de 23.12.2013**. DOU 24.12.2013. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 69. 2014. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 69 de 23.12.2014**. DOU 24.12.2014. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em: 04 Ago 2015.

Shivaji S, Chaturvedi P, Manorama R, Padmanaban DA, Sgouche YS, Pawar S, Vaishampayan P, Dutt CBS, Dutt GN, Manchanda RK, Rao UR, Bhargava PM, Narlikar JV. 2009. *Janibacter hoylei* sp. nov. *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov isolated from cryo tubes used for collecting air from the upper atmosphere. Int J Syst Evol Microbiol. 59:2977-86.

Silva GS, Marques ELS, Dias JCT, Lobo IP, Gross E, Brendela M, Cruz RS, Rezende RP. 2012. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. Appl Soil Ecol. 55:27-35.

Sobolev D, Roden EE. 2001. Suboxic deposition of iron by bacteria in opposing gradients of Fe (ii) and oxygen at circumneutral pH. Appl Environ Microbiol. 67(3):1328–34.

Sørensen G, Pedersen DV, Norgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. 2011. Microbial growth studies in biodiesel blends. Bioresource Technol. 102:5259-64.

Soriano AU, Martins LF, Ventura ESA, Landa FHTG, Valoni EA, Faria FRD, Ferreira RF, Faller MCK, Valério RR, Leite DCA, Carmo FL, Peixoto RS. 2015. Microbial

aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int Biodeterior Biodegrad.* 99:102-14.

Srivastava NK, Nandan NK. 2012. Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. *IJEPR.* 1(1):119-25.

Stanislaus A, Marafi A, Rana SM. 2010. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal Today.* 153:1-68.

Suflita JM, Lyles CN, Aktas DF, Sunner J. 2014. Biocorrosion issues associated with the use of ultra-low sulfur diesel and biofuel blends in the energy infrastructure. In: **Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications.** European of Corrosion (EFC), Elsevier Science. Web: 22 July 2015.

Vieira TM, Silva EP, Antoniosi Filho NR, Vieira JDG. 2006. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma, **Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel. Artigos técnico-científico.** Estação Gráfica/Brasília. p. 218-22.

Yemashova NA, Murygina VP, Zhukov DV, Zakharyantz AA, Gladchenko MA, Appanna V, Kalyuzhnyi SV. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 6:315-37.

Zhang X, Peterson CL, Reece D, Mbller G, Haws R. 1998. Biodegradability of biodiesel in the environment. **Trans ASAE.** 41:1423-30.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Nessa pesquisa foi levantada a hipótese de que a redução nos teores de enxofre no diesel poderia aumentar a contaminação microbiana e conseqüentemente promover os processos de deterioração do combustível e corrosão de tanques armazenadores. Para responder a essa questão foram realizados experimentos, os quais estão organizados em quatro capítulos na Tese, com seus resultados e discussões independentes. Nessa seção estão apresentados os principais resultados de forma sistemática e discutidos os aspectos mais relevantes que foram levantados dentro de cada capítulo como: presença de biodiesel como substrato prontamente disponível ao ataque microbiano, matéria prima de origem e processo de hidrotreamento na redução de compostos sulfurados do diesel com conseqüente alteração molecular.

O **Capítulo 1** teve como principal objetivo avaliar o crescimento e produção de biomassa pelos fungos *Pseudallescheria boydii* e *Peacilomyces variotii* com comprovada capacidade deteriorogênica no diesel puro e na mistura B10 com diferentes teores de enxofre por 14 dias. Nesse experimento foi utilizado óleo diesel com os diferentes percentuais de enxofre S50, S500 e S1800, conforme a legislação vigente na época (Resolução ANP 65/2011) e disponibilidade de distribuição do combustível de uso rodoviário no país. Os resultados mostraram que *P. boydii* apresentou maior capacidade biodegradadora (Figura 1) e significativo crescimento ($p < 0,05$) (Figura 4) comparada a *P. variotii* na mistura B10, independente dos teores de enxofre. No diesel puro foi verificado o crescimento fúngico, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os fungos e entre os diferentes teores de enxofre (Figura 3). Por outro lado, a análise no infravermelho evidenciou distintas características moleculares dos combustíveis de acordo com os diferentes teores de enxofre (Figuras 5 e 7). Nesse capítulo, o óleo diesel puro S1800 foi o mais degradado que os demais especialmente quando *P.boydii* está presente no microcosmos (Figura 6). Tanto o óleo diesel puro S500 quanto a mistura B10 S500 apresentaram menor biodegradabilidade, atribuída ao maior teor de cadeias ramificadas e teor de hidrocarbonetos aromáticos (Tabela 3).

O **Capítulo 2** teve como objetivo geral avaliar a suscetibilidade do diesel puro com ultra baixo teor de enxofre – ULSD (≤ 10 ppm S); baixo teor de enxofre – LSD (≤ 50 ppm S); alto teor de enxofre – HSD (≤ 500 ppm S) e ultra alto teor de enxofre

– UHSD (≤ 1800 ppm S) à contaminação microbiana ao longo de 40 dias de armazenagem simulada. Nesse experimento foram utilizados os óleos dieleis, conforme a legislação vigente na época (Resolução ANP 65/2011), sendo que o LSD (≤ 50 ppm S) (estava saindo do mercado nacional para a entrada definitiva do ULSD (≤ 10 ppm S)). A nomenclatura empregada em cada teor de enxofre refere-se aos teores máximos, em mg kg^{-1} (ppm), que podem ser detectados em cada categoria. O conteúdo de enxofre (ASTM D5453) em cada óleo foi determinado neste trabalho, e observamos valores distintos daqueles mencionados comercialmente, mas todos em consonância com o Regulamento Técnico ANP 04/2013 (ANEXO 6). Assim, os valores observados foram: ULSD (5 ppm); LSD (7 ppm); HSD (408 ppm) e UHSD (1366 ppm) no tempo zero. Após 40 dias os valores de cada teor permaneceram similares, apresentando uma variação máxima de 6 % para o UHSD e 12 % para o HSD em relação ao tempo zero entre os tratamentos. A variação observada pode ser atribuída a metodologia e parâmetros de calibração utilizados por cada uma das empresas (Material suplementar do Capítulo 2 - S1 e S2). Os resultados desse capítulo revelaram que a contaminação normal do combustível (conforme recebido), $\sim 10^3$ UFC L^{-1} , não apresentou diferença significativa na produção de biomassa ($p > 0,05$) em relação aos controles (estéril) ao longo de 40 dias. Por outro lado, quando adicionado o inóculo não caracterizado (ASTM E1259-10), com cerca de 10^5 células/ esporos mL^{-1} , foi evidenciado um aumento de 75 % na biomassa formada comparativamente a contaminação normal e controles. Ao final de 40 dias, o diesel UHSD (S1800) apresentou estatisticamente superior biomassa (~ 48 mg) e o ULSD (S10) menor biomassa (~ 8 mg) produzida em comparação com os demais tratamentos (Figura 2). De forma geral a comunidade microbiana (rDNA 16S e 18S) mais abundante na região interfacial foi Firmicutes (47,7 %), Bacteroidetes (25,7 %), Actinobacteria (17 %) e Ascomycota (99,8 %). Na análise de diversidade foi constatado que a abundância relativa bacteriana variou entre os diferentes teores de enxofre, ao longo do tempo, mas o índice geral de diversidade de Shannon sugere que a maior diversidade está no ULSD (Figura 5), indicando que a comunidade mais diversa não é necessariamente a mais abundante. A análise no infravermelho sugere degradação abiótica em função da degradação em todos os tratamentos e controles após 40 dias. Na análise de RMN ^1H foi revelado alto teor de ramificações no ULSD comparado UHSD.

O **Capítulo 3** teve como objetivo principal avaliar o comportamento da biomassa microbiana em termos de composição, metabólitos e degradação da mistura

brasileira B10, confeccionada com óleo diesel com diferentes teores de enxofre ao longo de 40 dias. Nesse experimento foram utilizados os dieseis ULSD (≤ 10 ppm S); alto teor de enxofre – HSD (≤ 500 ppm S) conforme a legislação vigente na época (Resolução ANP 50/2013), e o UHSD (≤ 1800 ppm S) foi avaliado como limite superior. Os principais resultados desse capítulo revelam que a maior produção de biomassa microbiana foi no tratamento com adição de inóculo não caracterizado ($\sim 10^6$ células/ esporos mL⁻¹) comparado a condição de contaminação natural do combustível ($\sim 10^3$ UFC L⁻¹), porém a biomassa não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes teores de enxofre (Figura 1). Todos os tratamentos sofreram degradação (Informação suporte do Cap.3 - Figura S1) e a mistura B10 confeccionada com óleo diesel S500, foi mais suscetível a degradação devido a redução das metilas terminais do biodiesel e fração de hidrogênios aromáticos (Figura 2 e Informação suporte do Capítulo 3 - Tabela S2). No perfil de rDNA 16S e 18S (Illumina MiSeq) *Pseudomonas* (Proteobacteria) foi o gênero bacteriano predominante na interface, mas na fase aquosa alterações na abundância de *Pandoraea* (Proteobacteria) e *Propionispora* (Firmicutes) foram observadas (Figura 3). Os Filos Ascomycota e Basidiomycota foram os mais abundantes na identificação fúngica (Figura 4). A abundância da comunidade microbiana, foi afetado pelas fases do microcosmo e diretamente relacionada a disponibilidade de oxigênio e biodisponibilidade da fonte de carbono. Na análise de HPLC/Q-ToF - MS foram detectados os 16 prováveis metabólitos pertencentes a biossíntese de ácidos graxos saturados e insaturados (metabolismos de lipídeos) com abundância relativa de 2-10 vezes superior aos controles ($p < 0.05$) (Tabela 1 e Figura 6).

Finalizando, o **Capítulo 4** teve como objetivo principal acompanhar a estabilidade química e biológica ao armazenamento simulado da mistura B10 com óleo diesel S10 por 90 dias em tanques de aço carbono (20 L), com e sem 1 % de água de drenagem, na condição de recebido e contaminado. Nesse experimento piloto foi utilizado o diesel S10, numa condição mais próxima a realidade e conforme legislação para a de redução do conteúdo de enxofre no diesel (Resolução ANP 50/2013). Os resultados desse capítulo mostram que entre aos 90 dias de estocagem simulada a propriedade de estabilidade oxidativa (Tabela 3) sofreu tendência de redução e os demais parâmetros (aspecto; teor de água; massa específica a 20 °C; índice de acidez; viscosidade cinemática a 40 °C; teor de biodiesel; teor de enxofre; lubricidade a 60 °C e teor de metanol/etanol), atenderam às especificações exigidas

pela ANP - Regulamento Técnico 04/2013 (ANEXO 6) e Resolução complementar 69/2014; Regulamentos Técnicos 03/2014 (ANEXO 8) e 2/2016 (ANEXO 7). A contaminação microbiana para as duas condições avaliadas (normal e média) foi classificada como dentro de níveis aceitáveis para combustíveis (Figuras 9 e 10), com sugestão de alerta para contaminação bacteriana ($\sim 10^4$ UFC mL⁻¹) na fase oleosa (Figura 9B). A presença de bactérias que reduzem o ferro, como a bactéria identificada, *Bacillus aryabhatai*, detectada no inóculo utilizado, pode ter sido um indicativo dos sedimentos encontrados na condição Postos (com água) ao final do experimento (Figura 11). Somente a presença de água não foi determinante para a degradação, mas a condição de contaminado (Tanques 6, 7 e 8) apresentou maior degradação da fração biodiesel, no tempo 15 dias, que os controles e os tanques conforme recebido sugerindo degradação microbiana. Ao final dos 90 dias foi observado a degradação em todos os tratamentos.

Em pelo menos 3 capítulos (**Capítulos 1, 3 e 4**) foram utilizados o biodiesel para compor a mistura diesel/biodiesel 10 % e, por isso, será discutido a presença desse biocombustível como substrato prontamente disponível aos microrganismos. Nós temos o apoio da literatura para afirmar que o biodiesel é mais facilmente metabolizado que o diesel (Pasqualino et al., 2006; Sørensen et al., 2011; Bücken et al., 2014). A biodegradabilidade do biocombustível se dá pela presença de ácidos graxos de cadeia longa e dois átomos de oxigênio ligados na porção terminal tornando-o biologicamente ativo, que favorecem o ataque de enzimas hidrolases (lipases e esterases) no metil ou etil éster produzindo um ácido graxo e um álcool associado (Kouker & Jaeger, 1987; Zhang et al., 1998; Aarthy et al., 2014). A degradação dos ácidos graxos é completada na β -oxidação com sucessiva redução de dois átomos de carbono e incorporação no metabolismo respiratório ou nos lipídeos celulares (Aktas et al., 2010). Do ponto de vista estrutural, as cadeias curtas dos FAMES e moléculas saturadas são mais difíceis de ser biodegradadas que cadeias com número igual ou superior a C₁₅ e insaturadas (Passman, 2012). No caso do biodiesel de soja, a matéria prima mais utilizada no Brasil (César et al., 2013), e por isso utilizada nesse estudo, possui genericamente cadeias carbônicas entre 16 e 18 átomos com cerca de 80 % de ácidos graxos insaturados (Passman, 2012), representando um substrato ideal para a biodegradação. Além disso, em função da sua instabilidade química, o biodiesel apresenta maior probabilidade de se degradar naturalmente, quando exposto a ação da umidade e oxigênio do ar, gerando

sedimentos de natureza química (gomas, monoglicerídeos, esterol-glicosídeos, compostos inorgânicos, ácidos orgânicos e inorgânicos), além da higroscopicidade e poder de solvência (Passman, 2012; Yang et al., 2014).

No **Capítulo 1** podemos comparar a biodegradabilidade dos combustíveis, diesel e mistura B10, pois utilizamos as mesmas condições experimentais e fungos degradadores na concentração inicial de 10^5 esporos mL^{-1} . A presença do biodiesel pode ter favorecido a biodegradabilidade da mistura B10, em relação ao óleo diesel puro. Esse fato pode ser verificado onde *P. boydii* teve um significativo crescimento na mistura B10 comparado ao diesel puro. Também devem ser consideradas a presença de enzimas de degradação, que, nesse caso, mostraram a habilidade de *P. boydii* oxidar mais rapidamente e crescer na mistura B10 que o fungo *P. variotii*. O fungo *P. boydii* já foi descrito pela capacidade de crescer em biodiesel de diferentes matérias primas (linhaça, soja e oliva) e na produção da enzima lipase se destacando como degradador de biodiesel (Cazarolli et al., 2014). No **Capítulo 3**, a degradação da mistura B10 HSD (S500), por RMN H^1 , foi verificada pela redução das metilas terminais do biodiesel e a fração de hidrogênios aromáticos do diesel sugerindo cometabolismo, processo este já confirmado por alguns autores quando utilizado blendas de diesel/biodiesel (Silva et al., 2012; Lisiecki et al., 2014). Somente nesse capítulo foi investigada a presença de metabólitos resultantes da degradação da mistura B10. Curiosamente, a mistura B10 ULSD (S10) sofreu menor degradação das metilas terminais e hidrogênios aromáticos que os demais teores de enxofre, mas foi detectado o Ácido Caprílico (Ácido Octanóico) numa quantidade 10 vezes mais abundante que nos controles aos 40 dias. Provavelmente ocorreu a formação do intermediário ácido a partir da hidrólise do éster metílico de origem e consequente β -oxidação formando uma série de resíduos de baixo peso molecular com dois átomos de carbono a menos que o precursor (Aktas et al., 2010). A presença de água e oxigênio também devem ser consideradas nesse cenário, uma vez que a formação de ácidos carboxílicos, a partir de ésteres metílicos, podem ser mediadas por reações químicas entre o combustível e os fatores abióticos citados. Tais ácidos podem ser de cadeias longas ou curtas e se depositar na fase aquosa ou mesmo mantido na fase oleosa (Mushrush et al., 2011). Por outro lado, foram detectados prováveis metabólitos oriundos da biodegradação de FAME típicos do biodiesel de soja em quantidades significativamente superior ($p < 0.05$) aos encontrados nos controles, sugerindo que a degradação foi de origem microbiana. De qualquer forma, mais

estudos devem realizados para elucidar a presença de ácidos graxos como metabólitos microbianos.

De forma geral foi verificado que os óleos diesel e mistura B10 ULSD e LSD que correspondem a um valor real máximo de até 8,3 ppm S, apresentaram uma tendência de cadeias com maior teor de ramificações e aromáticos. Numa relação inversa, foi observado para o diesel com maior teor de enxofre (UHSD) o real valor de 1366 ppm S, um menor teor de cadeias ramificadas e hidrogênios aromáticos. Sabemos que a complexidade molecular, presença de ramificações e compostos aromáticos representam limitações para um grande número de microrganismos em degradar tais compostos considerados mais recalcitrantes (Yemashova et al., 2007; Passman, 2012). Esse perfil foi mostrado pelo RMN H^{-1} e pode ser conferido nos **Capítulos 1, 2 e 3**. Apesar da espectroscopia no infravermelho mostrar a degradação em todos os tratamentos e controles ao longo do tempo, em todos os experimentos, sugerindo degradação abiótica, a relação com a formação de biomassa pode correlacionar dados de biodegradação. Nesse sentido, no **Capítulo 2**, foi verificada a significativa produção de biomassa microbiana ao final do experimento no UHSD com menor teor de ramificações e hidrogênios aromáticos. Assim como para o óleo ULSD, foi observado menor valor de biomassa e cadeias com elevada ramificações de aromáticos. Curiosamente, nos **Capítulo 1 e 3** não foi verificada significativa diferença na produção de biomassa, seja por fungos ou inóculo misto, em relação aos teores de enxofre. Porém, o HSD e a mistura B10 HSD apresentaram estruturas moleculares opostas. No **Capítulo 1** a mistura B10 HSD e o HSD apresentaram elevado teor de ramificações e compostos aromáticos e menor biodegradabilidade. No **Capítulo 3** a mistura B10 HSD apresentou redução das metilas terminais e hidrogênios aromáticos sendo mais suscetíveis à degradação. Essas diferenças, observadas tanto na mistura B10 quanto no óleo diesel puro HSD, pode estar relacionada com a origem do petróleo e o grau de dessulfurização. Dependendo da origem do hidrocarboneto, esse pode ser classificado de acordo com a estrutura molecular e presença de grupos funcionais como alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), aromáticos (mono e poliaromáticos), alfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetona, ésteres e porfirinas), e compostos polares como as resinas (piridinas, quinilonas, carbazóleos, amidas, tiofenos, entre outros) (Seabra, 2008). O óleo diesel possui cerca de 40 % de alifáticos e alcanos cíclicos e cerca de 22 % de aromáticos (com um ou dois anéis), mais os compostos sulfurados

que podem variar entre 0,04 a 6 % (v/v) (Abbad-Anadloussi et al., 2003; Cyplik et al., 2011; Suflita et al., 2014; Al-Degs & Al-Ghouti, 2015).

O enxofre é considerado um antagonista do crescimento microbiano, portanto a sua presença pode auxiliar no controle do crescimento e desenvolvimento de microrganismos em tanques de estocagem. Londry & Suflita (1998) encontraram tiofenos, tióis, ácidos tiofênicos e sulfetos aromáticos presentes em altas concentrações (20.000 ppm S) que poderiam inibir uma variedade de processos metabólicos em culturas anaeróbias enriquecida com borra oleosa. No processo de remoção do enxofre (hidrotratamento) algumas propriedades do combustível são alteradas e, segundo alguns autores, podem permitir a suscetibilidade à contaminação microbiana. Tais alterações se referem a remoção de compostos nitrogenados e oxigenados da molécula incorporando água (Srivastava & Nandan, 2012), redução de compostos aromáticos (Passman, 2012), formação de compostos residuais de menor peso molecular (Lyles et al., 2013) e mudanças nas propriedades de lubricidade, estabilidade oxidativa, acidez, condutividade, densidade e viscosidade do combustível (Knothe & Steidley, 2005; Yemashova et al., 2007; Stanislaus et al., 2010; Passman, 2012; Srivastava & Nandan, 2012).

Contrariando a literatura acima citada, na nossa pesquisa, a presença de diesel com alto teor de enxofre parece ter estimulado o crescimento do consócio microbiano evidenciado pela redução de ramificações moleculares (**Capítulo 2**), ao invés de ação biocida. Resultados similares, porém, com BRS também foram encontrados por Lutterbach et al. (2011). Da mesma forma, **em todos os capítulos**, o óleo diesel com baixo e ultra baixo teor de enxofre parece ter inibido o crescimento microbiano. Recentemente, alguns estudos têm abordado a contaminação microbiana em diesel e misturas de diesel/biodiesel contendo teores de enxofre reduzidos (Passman & Dobranic 2005; Lee et al., 2010; Dodos et al., 2011; Dunn, 2011; Passman, 2012; Srivastava & Nandan, 2012; Lyles et al., 2013). Estas contestações sugerem que podem estar muito mais relacionadas com o processo de remoção de enxofre (hidrotratamento) do que com a concentração de enxofre no diesel.

Nos **Capítulos 1 e 3** foram observadas alterações na biomassa fúngica ou microbiana, respectivamente, mas sem diferença significativa entre os teores de enxofre, porém alterações moleculares foram verificadas em **todos os estudos**. Se o conteúdo de enxofre tivesse ação antimicrobiana, como menciona alguns autores acima citados, isso deveria ter sido mais evidente em nossos resultados. Esses

resultados sugerem que outros fatores que não os teores de enxofre possam estar envolvidos na degradação do óleo diesel puro. As alterações moleculares, observadas no nosso experimento, podem estar relacionadas ao processo de hidrotratamento no qual utiliza elevada temperatura e pressão para reduzir os compostos sulfurados. De acordo com Maier (2000), a estrutura e propriedades físico-químicas dos combustíveis podem ser determinantes no grau de biodegradabilidade, tais como os efeitos estéricos e eletrônicos. Os efeitos estéricos envolvem a extensão na qual os grupos substituintes ou a presença de ramificações na molécula do combustível pode comprometer o reconhecimento pelos sítios ativos das enzimas degradadoras e a velocidade da degradação. Além disso, o transporte do substrato através da membrana celular, especialmente por enzimas transmembrânicas, pode ficar prejudicado.

Comparativamente ao biodiesel, o óleo diesel apresenta uma elevada complexidade estrutural devido a mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, sem o oxigênio ligado a porção terminal, o que dificulta o acesso para muitos microrganismos necessitando da expressão de enzimas como as oxigenases (mono e dioxigenases) (Zhang et al., 1998; Van Hamme, 2003). De forma geral, as cadeias de hidrocarbonetos mais prontamente utilizadas são os C₁₀ a C₁₈ e apresentam um padrão de acordo com a facilidade de degradação (*n*-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos) (Das & Chandran, 2011). Genericamente, na degradação aeróbia de alifáticos (maior grupo estrutural presente no diesel) os microrganismos (enzimas monoxigenase) incorporam o oxigênio diretamente na molécula substrato promovendo a oxidação de um grupo metil terminal, para um álcool primário, que será oxidado a aldeídos e novamente oxidado a ácido graxo (Solano-Serena et al., 2008; Yemashova et al., 2007). Após essa etapa a degradação dos ácidos graxos segue a mesma rota que o biodiesel na β -oxidação.

No **Capítulo 2** (diesel) e **3** (mistura B10) foram verificados o perfil das comunidades microbianas por rDNA 16 e 18S. No **Capítulo 2** os resultados sugerem que o conteúdo de enxofre, presente no diesel, não alterou a diversidade bacteriana, mas alterações na abundância de alguns Filos foram observadas ao longo do tempo. A análise de PCA correlacionou o Filo Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria com UHSD e Firmicutes com ULSD. O Filo Firmicutes contém espécies esporuladas e anaeróbias sugerindo melhor adaptação ao substrato mais recalcitrante. Em fungos, o Filo Ascomycota foi relacionado com UHSD e Chytridiomycota, Basidiomycota e

Glomeromycota com ULSD, LSD e HSD. Os microrganismos possuem o metabolismo altamente especializado para degradar hidrocarbonetos e, além da composição da molécula fatores como a biodisponibilidade, suscetibilidade ao ataque microbiano, pH, temperatura e aeração também garantem o potencial da biodegradação (Seabra et al., 2008; Barbosa et al., 2008; Das & Chandran, 2011).

No **Capítulo 3** o Filo predominante na interface foi Proteobacteria e na fase aquosa Firmicutes. No **Capítulo 2** a interface foi predominantemente ocupada pelo Filo Firmicutes sugerindo que, além de disponibilidade de oxigênio, fonte de carbono e nutrientes ao longo do gradiente, a competição microbiana e demais fatores acima citados podem ter ocorrido. No caso dos fungos, o Filo Ascomycota foi indubitavelmente majoritário também no **Capítulo 2**. O Filo Ascomycota contém uma variedade de espécies fúngicas, entre as quais podemos destacar as leveduras do Gênero *Candida*. Várias leveduras já mostraram o potencial em utilizar *n*-alcanos e outros hidrocarbonetos alifáticos como fonte de energia usando o complexo enzimático citocromo P450 que desempenha um importante papel na degradação de derivados de petróleo (Das & Chandran, 2011). Nas duas pesquisas (**Capítulos 2 e 3**) grande parte dos grupos microbianos identificados a partir do perfil de DNA já foram descritos como contaminantes ou na biodegradação de combustíveis e derivados fósseis (Bento & Gaylarde 1996; Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; White et al., 2011; Bento et al., 2005; Passman, 2012; Bücken et al., 2014). Apesar de ter sido verificado uma elevada diversidade microbiana no óleo diesel puro (**Capítulo 2**), em especial de fungos, comparativamente ao **Capítulo 3**, com a mistura B10, essas variações podem estar relacionadas à tecnologia de sequenciamento de nova geração, onde foi utilizado dois sistemas com a mesma funcionalidade, porém que variam conforme a geração de número de sequências lidas, comprimento do fragmento e tempo de corrida (Illumina HiSeq X MiSeq), embora Caporaso et al. (2012), não tenha verificado diferenças entre os dois sistemas em experimentos de ecologia microbiana.

No **Capítulo 4** foi avaliada a mistura B10 com somente o óleo diesel S10. Com esse experimento piloto foi possível verificar que as propriedades relacionadas a estabilidade química da mistura B10, de forma geral, apresentaram-se em consonância o Regulamento Técnico ANP (03/2014), que diz que armazenagem deve ser de, no máximo 30 dias, para a garantia da qualidade do combustível. Dentro do período avaliado (90 dias), a presença de água livre ou emulsionada não foi suficiente

para promover a acelerada degradação da mistura B10, mas talvez, alterações sugeridas na estabilidade oxidativa, possivelmente tem relação com a presença de água. De acordo com Grishin & Zinina (2015), a estabilidade oxidativa pode estar diretamente relacionada a composição do combustível, as condições de armazenamento, oxigênio disponível e a propriedade dos materiais em contato com o combustível. Além disso, o processo de hidrotreatamento, foi relatado como mais suscetível a oxidação em virtude do acúmulo de hidroperóxidos na sua composição aumentando o índice de acidez (Grishin & Zinina, 2015). O óleo diesel S10 sofreu maior remoção dos compostos sulfurados, e talvez, por essa razão, tenha apresentado baixa contaminação nos tanques avaliados. Como mencionado anteriormente, o biodiesel de soja apresenta grande quantidade de ácidos graxos insaturados estando mais suscetível a problemas de estabilidade oxidativa (Knothe, 2010). Além disso a presença de cerca de 11 % de oxigênio na sua composição, menor quantidade de hidrocarbonetos que o óleo diesel (Hoekman et al., 2012), o longo tempo da armazenagem aqui estabelecidas (90 dias) e a composição dos tanques, aço carbono jateado com granalha de ferro, muito provavelmente contribuíram para essa possível alteração. Por fim, em termos de contaminação da mistura B10, todos os tanques apresentaram níveis aceitáveis após 90 dias, com exceção da fase oleosa, caracterizada como alerta, mas de qualquer forma a formulação S10, utilizada nesse experimento, não foi mais suscetível a contaminação microbiana como sugerem alguns autores (Pasma & Dobranick, 2005; Dodos et al., 2011). Com a proximidade do aumento da mistura B7 para B10 até 2019 (Lei 13.263, DOU 24.03.2016) e a atual utilização do óleo diesel com ultra baixo teor de enxofre (S10), podemos sugerir, dentro das condições experimentais aqui utilizadas, que essa formulação poderá apresentar aspectos positivos para o diesel brasileiro em termos de contaminação e conseqüente armazenamento.

9. CONCLUSÕES

Baseado no conjunto de análises obtidas a partir dos experimentos de estocagem simulada com o diesel puro e mistura B10, com distintos teores de enxofre na avaliação do comportamento de fungos deteriogênicos ou em consórcio microbiano não caracterizado foi possível concluir que:

- Os fungos *Pseudallescheria boydii* e *Paecilomyces variotii* apresentaram distintas capacidades deteriogênicas possivelmente atribuídas a presença de enzimas de degradação adequadas ao substrato: diesel puro e mistura B10 com diferentes teores de enxofre.

- O óleo diesel puro possui uma complexidade estrutural e na composição que variam de acordo com a origem e processo de refino que podem afetar o nível e a intensidade da biodegradação.

- A adição de biodiesel ao petrodiesel pode favorecer a degradação da mistura, seja pela inerente natureza química ou pelo processo de cometabolismo.

- O óleo diesel ou mistura diesel/biodiesel, com baixo teor de enxofre parece apresentar maior teor de ramificações e compostos aromáticos que o diesel ou mistura diesel/biodiesel, que contenha alto teor de enxofre.

- O perfil de rDNA 16S e 18S dos Filos mais abundantes encontrados no diesel puro: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Ascomycota e na mistura B10: Proteobacteria, Firmicutes, Ascomycota e Basidiomycota possivelmente foram influenciados pelos nutrientes, disponibilidade de oxigênio e biodisponibilidade da fonte de carbono.

- Os prováveis metabólitos: Ácido Mirístico, Ácido Palmítico, Ácido Esteárico, Ácido Oleico, Ácido Linolêico e Ácido α -Linolênico, identificados na fase aquosa, indicam uma possível biodegradação da mistura B10 e podem se tornar potenciais biomarcadores das atividades microbianas relacionadas a biocorrosão e biodeterioração do diesel e mistura de biodiesel.

- A redução nos teores de enxofre, não representa a principal razão para a suscetibilidade à contaminação microbiana aeróbia. Fatores como a origem do petróleo, composição molecular e processo de hidrotreatamento representam importantes variáveis na alteração das características do combustível juntamente com a adição de biodiesel.

REFERÊNCIAS

- Aarthy M, Saravanan P, Gowthaman MK, Rose C, Kamini NR. 2014. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chem Eng Res Des.* 92:1591-691.
- Abbad-Andaloussi S, Warzywoda M, Monot F. 2003. Microbial Desulfurization of Diesel Oils by Selected Bacterial Strains. *Oil gas sci. technol.* 58(4):505-13.
- Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Ray RY, Davidova IA, Lyles CN, Suflita JM. 2010. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. *Energy Fuels.* 24:2924-28.
- Al-degs Y, Al-ghoute M. 2015. Influence of diesel acidification on dibenzothiophene removal: a new desulfurization practice. *Sep Purif Technol.* 139:1-4.
- ASTM D5453-16 - American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Determination of Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Spark Ignition Engine Fuel, Diesel Engine Fuel, and Engine Oil by Ultraviolet Fluorescence.** 2016. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2016. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D5453>. Acesso em: 29 Ago 2016.
- ASTM E1259-10 - American Society for Testing and Materials. **Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C.** 2010. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2010. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E1259>. Acesso em: 21 Jan 2016.
- Barbosa AM, Geise EC, Covizzi LG. 2008. Biodegradação de Compostos Aromáticos. In: **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA/Jaguariúna. p. 261-280.
- Bento FM, Beech IB, Gaylard CC, Englert GE, Muller IL. 2005. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World J Microbiol Biotechnol.* 21(2):135-42.
- Bento FM, Gaylarde CC. 1996. Microbial contamination of stored diesel oil. *Braz J Microbiol.* 27:71-75.
- Bento FM, Gaylarde CC. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. *Int Biodeter Biodegr.* 47:107-12.
- Bücker F, Barbosa CS, Quadros PD, Bueno MK, Fiori P, Huang C, Frazzon APG, Ferrão MF, Camargo FAO, Bento FM. 2014. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int Biodeter Biodegr.* Doi 10.1016/j.ibiod.2014.05.030.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6:1621-24.

- Cazarolli JC, Guzzato R, Samios D, Peralba MCR, Cavalcanti EHS, Bento FM. 2014. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int Biodeter Biodegr.* 95:1-9. Doi 10.1016/j.ibiod.2013.09.025.
- César J, Alves L, Poppi RJ. 2013. Talanta Biodiesel content determination in diesel fuel blends using infrared (NIR) spectroscopy and support vector machines (SVM). *Talanta.* 104:155-61.
- Cyplik P, Schmidt M, Szulc A, Marecik R, Lisiecki P, Heipieper HJ, Owsianiak M, Vainshtein M, Chrzanowski L. 2011. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresour Technol.* 102:4347-52.
- Das N, Chandran P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnol Res Int.** Article ID 941810. 13p. Doi 10.4061/2011/941810.
- Dodos GS, Konstantakos T, Longinos S, Zannikos F. 2011. Effects os microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Proceedings of the 12th International Conference Science and Technology**, 8-10 September. Rhodes/Greece. p. A431-39.
- Dunn RO. 2011. Fuel Properties of Biodiesel/Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) lends. *J Am Oil Chem Soc.* 88:1977-87.
- Gaylarde CC, Bento F, Kelley J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Braz J Microbiol.* 30:1-10.
- Grishin DF, Zinina ND. 2015. Review: Environmentally Friendly Diesel Fuels with Low and Ultralow Sulfur Content and Additives to Them. *Russ J Appl Chem.* 88(7):1106-21.
- Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew Sust Energy Rev* 16:143-69. Doi 10.1016/j.rser.2011.07.143.
- Knothe G. 2010. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Prog Energy Combust Sci.* 36:364-73.
- Knothe G, Steidley KR. 2005. Lubricity of Components of Biodiesel and Petrodiesel. The Origin of Biodiesel Lubricity. *Energ Fuel.* 19:1192-1200.
- Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Appl Environ Microb.* 53(1):211-13.
- Lee JS, Ray RI, Little BJ. 2010. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling.* 26(6):623-35.

- Lei **13.263**. 2016. DOU 24.03.2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=24/03/2016>. Acesso em: 27 maio 2016.
- Lisiecki P, Chrzanowski L, Szulc A, Lawniczak L, Białas W, Dziadas M, Owsianiak M, Staniewski J, Cyplik P, Marecik R, Jelen H, Heipieper HJ. 2014. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel*. 116:321-27.
- Londry KL, Suflita JM. 1998. Toxicity effects of organosulfur compounds on anaerobic microbial metabolism. *Environ Toxicol Chem*. 17(7):1119-1206.
- Lutterbach MTS, Galvão MM, Araújo M, Contador LS Oliveira V, Pimenta, GS. 2011. Real-time PCR Applied to Quantification of SRB in Bottom Water from Fuel Tanks. **NACE International Corrosion Conference & Expo**, n. 11233. 9 p.
- Lyles CN, Aktas DF, Duncan KE, Callaghan EV, Stevenson BS, Suflita JM. 2013. Impact of Organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environ Sci Technol*. 47:6052-62.
- Maier RM. 2000. Microorganisms and Organic Pollutants. In: **Environmental Microbiology**, Academic Press/San Diego. p. 363-402.
- Mushrush GW, Willauer HD, Wynne JH, Lloyd CT, Bauserman JW. 2011. Storage Tank Stability of Soybean-derived Biodiesel. *Energ Source Part A*. 33(24):2303-08. Doi 10.1080/15567030903530590.
- Pasqualino JC, Montané D, Salvadó J. 2006. Syntetic effects os biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass Bioenerg*. 30:874-79.
- Passman FJ. 2012. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - A review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 81:88-104.
- Passman FJ, Dobranick JK. 2005. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. **Proceedings of the 9th International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels - IASH**. Sidges/Spain. p. 18-22.
- Regulamento Técnico ANP 2/2016. **Parte integrante da Resolução 30 de 23.06.2016 da Agência Nacional do Petróleo – ANP**. DOU 24.06.2016. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em: 07 Julho 2016.
- Regulamento Técnico ANP 3/2014. **Parte integrante da Resolução 45 de 25.8.2014 da Agência Nacional do Petróleo – ANP**. DOU 26.8.2014. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm&f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm&f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.
- Regulamento Técnico ANP 4/2013. **Parte integrante da Resolução 50 de 23.12.2013 da Agência Nacional do Petróleo – ANP**. DOU 24.12.2013. Disponível em:

[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document_frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document_frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 50. 2013. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 50 de 23.12.2013.** DOU 24.12.2013. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document_frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2013/dezembro/ranp%2050%20-%202013.xml?fn=document_frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 65. 2011. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 65 de 9.12.2011.** DOU 12.12.2011. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document_frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml?fn=document_frameset.htm$f=templates$3.0). Acesso em: 04 Ago 2015.

Resolução ANP 69. 2014. **Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 69 de 23.12.2014.** DOU 24.12.2014. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em: 04 Ago 2015.

Seabra PN. 2008. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados. In: **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA, Jaguariúna/SP. p. 547-70.

Silva GS, Marques ELS, Dias JCT, Lobo IP, Gross E, Brendela M, Cruz RS, Rezende RP. 2012. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Appl Soil Ecol.* 55:27-35.

Solano-Serena F, Marchal R, Vandecasteele JP. 2008. Biodegradation of aliphatic and alicyclic hydrocarbons. In: **Petroleum Microbiology - Concepts, Environmental implications, Industrial applications**, Editions Technip, Paris/France. p. 173-240.

Sørensen G, Pedersen DV, Norgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. 2011. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresource Technol.* 102:5259-64.

Srivastava NK, Nandan NK. 2012. Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. *IJEPR.* 1(1):119-25.

Stanislaus A, Marafi A, Rana SM. 2010. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal Today.* 153:1-68.

Suflita JM, Lyles CN, Aktas DF, Sunner J. 2014. Biocorrosion issues associated with the use of ultra-low sulfur diesel and biofuel blends in the energy infrastructure. In: **Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications**. European of Corrosion (EFC), Elsevier Science. Web: 22 July 2015.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol R.* 67(4):503-49.

- White J, Gilbert J, Hill G, Hill ED, Huse S, Weightman A, Mahenthiralingam E. 2011. Culture-Independent Analysis of Bacterial Fuel Contamination Provides Insight into the Level of Concordance with the Standard Industry Practice of Aerobic Cultivation. *Appl Environ Microb.* 77(13):4527-38.
- Yang Z, Hollebone BP, Wang Z, Yang C, Brown C, Landriault M. 2014. Storage stability of commercially available biodiesels and their blends under different storage conditions. *Fuel.* 115:366-77.
- Yemashova NA, Murygina VP, Zhukov DV, Zakharyantz AA, Gladchenko MA, Appanna V, Kalyuzhnyi SV. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 6:315-37.
- Zhang X, Peterson CL, Reece D, Mbller G, Haws R. 1998. Biodegradability of biodiesel in the environment. *Trans ASAE.* 41:1423-30.

ANEXO 1

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S10



Número: 0043-13 T

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A **S10** Código: 6DH

Local de Amostragem: TQ 373507
 Data/ hora Amostragem: 19/01/13 10:55
 Data/ hora Recebimento: 19/01/13 11:00

Laboratório: Transpetro/Lab Rio Grande
 Endereço: 2ª Seção Barra S/N Pier Petroleiro
 Rio Grande - RS CEP 96204-020
 Telefone: (53)3234-3200 Fax: (53)3234-4215

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	D 4176	PASS (1)	PASS	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max (3)	L1,0	N/A
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	820 a 850	837,5	kg/m3
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 4,5	3,260	mm2/s
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max (2)	0,000	% volume
AGUA (KARL FISCHER)	D 6304	200 max	58	mg/kg
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	65,0	grau C
ENXOFRE TOTAL	D 7039	10 max	6,9	mg/kg
CONDUTIVIDADE ELETRICA	D 2624	25 min (4)	107	pS/m
TEMPERATURA OBSERVADA	D 2624	Anotar	26	grau C

Notas:

- Todos os limites especificados sao valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.

(1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.

(2) Aplicável na importação, antes da liberação do produto para comercialização.

(3) Limite requerido ao óleo diesel A isento de corante.

(4) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento/bombeio do combustível pelo Produtor e Distribuidor.

- Após descarga do NT Seychelles

Tipo de Amostragem: COMPOSTA DE UM UNICO TANQUE

Tipo de Operação: Descarga de navio

Data de Emissão: 19/01/2013 15:07:28 Página: 1 de 1

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.
 Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:
 Raquel Madruga Mesquita
 CRQ: 05407218

ANEXO 1A

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S10



Número: 2334-14 G

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A **S10** Código: 6DH

Local de Amostragem: TQ 24576B
 Data/ hora Amostragem: 22/09/14 02:00
 Data/ hora Recebimento: 22/09/14 02:39

Laboratório: REFAP/OT/QP
 Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001
 92420-221 Canoas - RS
 Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2246

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	D 4176	PASS (1)	PASS	N/A
COR	VIS 000	INAM (4)	INAM	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max (3)	0,8	N/A
10% RECUPERADOS	D 86	180,0 min	207,6	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 295,0	264,2	grau C
95% RECUPERADOS	D 86	370,0 max	346,6	grau C
PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	0 max	-8	grau C
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	815,0 a 850,0	832,6	kg/m3
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 4,5	2,661	mm2/s
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1 max	1A	N/A
INDICE DE NEUTRALIZACAO	D 974	Anotar	0,00	mg KOH/g
CINZAS	D 482	0,010 max	<0,0010	% massa
RCR NOS 10% FINAIS DA DESTILACAO	D 524	0,25 max	0,02	% massa
NUMERO DE CETANO - NCD	D 6890	48 min	53,2	N/A
CONTAMINACAO TOTAL	EN 12692	24 max	<6,0	mg/kg
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max (2)	0,000	% volume
TEOR DE AGUA	D 6304	200 max	74	mg/kg
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	65,0	grau C
ENXOFRE TOTAL	D 7039	10,0 max	6,0	mg/kg
CONDUTIVIDADE ELETRICA	D 2624	25 min	170	pSm
TEMPERATURA OBSERVADA	D 2624	Anotar	18,4	grau C
NUMERO DO LACRE	PE LACRE	Anotar	0028802	N/A

Notas:

- Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.
- RESOLUÇÃO ANP nº50 DE 23 DEZEMBRO DE 2013 - DOU 24.12.13.
- (1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.
- (2) Aplicável na importação, antes da liberação do produto para comercialização.
- (3) Limite requerido ao óleo diesel A isento de corante.
- (4) Coloração entre o incolor e o amarelado, podendo o tipo B apresentar-se ligeiramente alterado para as tonalidades marrom e alaranjada.

Data de Emissão: 22/09/2014 10:54:04 Página: 1 de 2

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.
 Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:
 Q de Petróleo Priscila Perin Guastalli
 CRQ: 09302440

ANEXO 2

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S50



Número: 0725-12 S

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL S50		Código: 65P	
Local de Amostragem: TQ 373507		Laboratório: REFAP/DC/DP	
Data/ hora Amostragem: 25/03/12 09:40		Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001	
Data/ hora Recebimento: 25/03/12 17:56		92420-221 Canoas - RS	
		Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2246	
Produto: OLEO DIESEL A S50		Código: 65P	
Local de Amostragem: TQ 373507		Laboratório: REFAP/DC/DP	
Data/ hora Amostragem: 25/03/12 09:40		Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001	
Data/ hora Recebimento: 25/03/12 17:56		92420-221 Canoas - RS	
		Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2246	
Característica	Método	Resultado	Unidade
INDICE DE NEUTRALIZACAO	D 974	0,04	mg KOH/g
NUMERO DE CETANO	D 613	52,8	N/A
COR ASTM INICIAL	D 5304	L1,0	N/A
ENXOFRE TOTAL	D 7039	7,0	mg/kg
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,000	% volume
HIDROCARBONETOS POLICICLICOS AROMATICOS	D 6591	1,7	% massa
CONDUTIVIDADE ELETRICA	D 2624	442	pS/m
PONTO INICIAL DE EBULICAO	D 86	173,3	grau C
TURBIDEZ AMBIENTE	D 4176	1	N/A
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1A	N/A
TOL.AGUA - RETENCAO DE AGUA	D 1094	<1	N/A
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	835,2	kg/m3
PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	-20	grau C
ASPECTO	VIS 000	PASS	N/A
COR ASTM	D 1500	1,0	N/A
PONTO DE FULGOR	D 93	67,0	grau C
AGUA (KARL FISCHER)	D 8304	65	mg/kg
LUBRICIDADE	D 6079	360	u
TEMPERATURA OBSERVADA	D 2624	21,7	grau C
PONTO DE EBULICAO MEDIO VOLUMETRICO	X 350	264,4	grau C
COR	VIS 000	INAM	N/A
LUBRICIDADE A 60 GRAUS CELSIUS	D 6079	360	u
TOL.AGUA-CONDICOES INTERFACIAIS	D 1094	1B	N/A
TURBIDEZ A 20 GC	D 4176	1	N/A
05% RECUPERADOS	D 86	194,1	grau C
10% RECUPERADOS	D 86	204,6	grau C
TOL.AGUA-GRAU DE SEPARACAO	D 1094	(2)	N/A
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,508	mm2/s
SLOP 10-90	X 350	1,6	grau C
EFEITO DE TEMPO DE ASPIRACAO	D 6371	-20	grau C

Data de Emissão: 26/03/2012 14:24:34 Página: 1 de 2	Original Assinado Por: Responsável: Eng. Processamento Luiz Carlos Hoff CRQ: 5º Região 05301033
Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada. Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.	

RECEBIDO
 12 ABR 2012
 Eng. Processamento

ANEXO 3

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S500



Número: 1108-12 G

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A S500 Código: 658

Local de Amostragem: TQ 88676G Data/ hora Amostragem: 09/05/12 05:00 Data/ hora Recebimento: 09/05/12 05:30	Laboratório: REFAP/DC/DP Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001 92420-221 Canoas - RS Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2246
---	--

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	VIS 000	PASS ⁽¹⁾	PASS	N/A
COR	VIS 000	INAM ⁽²⁾	INAM	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max	L1,5	N/A
10% RECUPERADOS	D 86	Anotar	170,8	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 310,0	256,7	grau C
85% RECUPERADOS	D 86	360,0 max	348,4	grau C
90% RECUPERADOS	D 86	Anotar	370,9	grau C
ENXOFRE TOTAL	D 4294	500 max	435,000	mg/kg
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	820,0 a 865,0	850,6	kg/m ³
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 5,0	2,601	mm ² /s
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1 max	1A	N/A
PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	0 max	-17	grau C
CINZAS	D 482	0,010 max	<0,001	% massa
RCR NOS 10% FINAIS DA DESTILACAO	D 524	0,25 max	0,09	% massa
NUMERO DE CETANO	D 613	42 min	43,5	N/A
LUBRICIDADE A 60 GRAUS CELSIUS	D 6079	520 max ⁽³⁾	393	u
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max	0,000	% volume
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	48,0	grau C

Notas:

- Todos os limites especificados sao valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.
- Atende a Resolução ANP nº 65 de 09 de dezembro 2011.Regulamento Técnico ANP nº08/2011.
- ALERTA DE SEGURANÇA: Produto com possibilidade de baixa condutividade. Manusear atendendo as normas aplicáveis de segurança.
- (1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.
- (2) Usualmente de Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada.
- (3) Poderá ser determinada pelos métodos ISO 12156 ou ASTM D6079, sendo aplicáveis os limites de 460 µm e 520 µm, respectivamente. A medição da lubricidade poderá ser realizada após a adição do biodiesel, no teor estabelecido na legislação vigente.

Data de Emissão: 09/05/2012 14:56:58 Página: 1 de 1

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.

Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:
Eng. Processamento Luiz Carlos Hoff
CRQ: 5º Região 05301033

ANEXO 3A

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S500



Número: 2331-14 G

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A S500 Código: 658

Local de Amostragem: TQ 24501D	Laboratório: REFAP/OT/QP
Data/ hora Amostragem: 21/09/14 11:15	Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001 92420-221 Canoas - RS
Data/ hora Recebimento: 21/09/14 13:10	Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2246

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	D 4176	PASS (1)	PASS	N/A
COR	VIS 000	INAM (2)	INAM	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max	1,6	N/A
10% RECUPERADOS	D 86	Anotar	187,8	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 310,0	289,5	grau C
85% RECUPERADOS	D 86	360,0 max	349,3	grau C
90% RECUPERADOS	D 86	Anotar	368,5	grau C
ENXOFRE TOTAL	D 4294	500 max	448	mg/kg
MASSA ESPECÍFICA A 20 GC	D 4052	815,0 a 865,0	846,0	kg/m ³
VISCOSIDADE CINEMÁTICA A 40 GC	D 445	2,0 a 5,0	2,895	mm ² /s
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1 max	1A	N/A
PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	0 max	0	grau C
CINZAS	D 482	0,010 max	<0,0010	% massa
RCR NOS 10% FINAIS DA DESTILAÇÃO	D 824	0,25 max	0,18	% massa
ÍNDICE DE CETANO CALCULADO	D 4737	45 min	46,3	N/A
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	53,0	grau C
CONDUTIVIDADE ELÉTRICA	D 2624	25 min (3)	72	pS/m
TEMPERATURA OBSERVADA	D 2624	Anotar	29,9	grau C
NÚMERO DO LACRE	PE LACRE	Anotar	0028899	N/A

Notas:

- Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.
- Cor Vermelha - Corante adicionado na entrega do Produto.
- RESOLUÇÃO ANP nº50 DE 23 DEZEMBRO DE 2013 - DOU 24.12.13.
- (1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.
- (2) INAM = Incolor a amarelada, isenta de corantes.
- (3) Aditivo melhorador de condutividade elétrica adicionado na concentração de 2,0 mg/L.

Data de Emissão: 21/09/2014 22:36:57 Página: 1 de 1

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.
Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:
Q de Petróleo Priscila Perin Guastalli
CRQ: 09302440

ANEXO 4

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S1800



Número: 1124-12 G

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A S1800		Código: 65S		
Local de Amostragem: TQ 88601C		Laboratório: REFAP/DC/DP		
Data/ hora Amostragem: 10/05/12 13:30		Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001		
Data/ hora Recebimento: 10/05/12 15:00		92420-221 Canoas - RS		Fax: (51)3415-2246
		Telefone:(51)3415-2243		

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	VIS 000	PASS (1)	PASS	N/A
COR	VIS 000	INAM (2)	INAM	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max	1,5	N/A
ENXOFRE TOTAL	D 4294	1800 max	1530,000	mg/kg
10% RECUPERADOS	D 86	Anotar	210,8	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 310,0	277,0	grau C
85% RECUPERADOS	D 86	370,0 max	349,5	grau C
90% RECUPERADOS	D 86	Anotar	369,4	grau C
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	820 a 880	855,9	kg/m3
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 5,0	3,347	mm2/s
PONTO DE ENTUPIAMENTO	D 6371	0 max	-18	grau C
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1 max	1A	N/A
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max	0,000	% volume
CINZAS	D 482	0,010 max	<0,001	% massa
RCR NOS 10% FINAIS DA DESTILACAO	D 524	0,25 max	0,11	% massa
INDICE DE CETANO CALCULADO	D 4737	45 min	45,4	N/A
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	60,0	grau C

Notas:

- Todos os limites especificados sao valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.
- Cor Vermelha - Corante adicionado na entrega do Produto.
- Atende a Resolução ANP nº 65 de 09 de dezembro 2011.Regulamento Técnico ANP nº08/2011.
- ALERTA DE SEGURANÇA: Produto com possibilidade de baixa condutividade. Manusear atendendo as normas aplicáveis de segurança.


(1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.

(2) Usualmente de Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada.

Data de Emissão: 11/05/2012 04:06:58	Página: 1 de 1
Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada. Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.	
Original Assinado Por: Responsável: Eng. Processamento Luiz Carlos Hoff CRQ: 5º Região 05301033	

ANEXO 4A

CERTIFICADO DE ENSAIO DO ÓLEO DIESEL A S1800



Alberto Pasqualini - Refap S/A

Número: **0863-12 G**

CÓPIA

CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A **S1800**

Local de Amostragem: **TQ 886010**

Data/ hora Amostragem: **11/04/12 07:00**

Data/ hora Recebimento: **11/04/12 08:15**

Laboratório: REFAP/OCOP

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001
92420-221 Canoas - RS

Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2248

Código: **655**

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
1 ASPECTO	VIS 000	PASS (1)	PASS	N/A
2 COR	VIS 000	INAM (2)	INAM	N/A
3 COR ASTM	D 1500	3,0 max	L1,5	N/A
4 WATERFIRE TOTAL	D 4294	1800 max	793,000	mg/kg
5 10% RECUPERADOS	D 86	Anotar	172,8	grau C
6 50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 310,0	272,5	grau C
7 85% RECUPERADOS	D 86	370,0 max	345,1	grau C
8 90% RECUPERADOS	D 86	Anotar	261,8	grau C
9 MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	820 a 880	843,8	kg/m3
10 VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 5,0	2,841	mm2/s
11 PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	7 max	3	grau C
12 CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1 max	1A	N/A
13 ÁGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max	0,000	% volume
14 CINZAS	D 482	0,010 max	-0,001	% massa
15 SORR NOS 10% FINAIS DA DESTILAÇÃO	D 524	0,25 max	0,09	% massa
16 ÍNDICE DE CETANO CALCULADO	D 4737	45 min	46,6	N/A
17 PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	46,0	grau C

Notas:

- Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.
- Cor Vermelha - Corante adicionado na entrega do Produto.
- Atende a Resolução ANP nº 65 de 09 de dezembro 2011 Regulamento Técnico ANP nº 09/2011.
- ALERTA DE SEGURANÇA: Produto com possibilidade de baixa condutividade. Manusear atendendo as normas aplicáveis de segurança.
- (1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.
- (2) Usualmente de incolor e amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marron e alaranjada.

Data de Emissão: **11/04/2012 15:32:26**

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.

Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.



Original Assinado Por:

Responsável:
Eng. Processamento Luiz Carlos Hoff
CRQ: 5ª Região 05301033

Página: 1 de 1

ANEXO 5

CERTIFICADO DE QUALIDADE DO BIODIESEL B100


	CERTIFICADO DA QUALIDADE Nº 046.12 – 17/09/12 FC-BIO-2C Cadastrado na ANP(Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Cadastro: 017 Processo ANP: 48600.001798/2009-11.	
---	---	---

Identificação do Produtor		Granol Indústria Comércio e Exportação S/A	
Produto		Éster Metílico de Óleo Misto * (Biodiesel -B100) *80% Óleo de Soja - 20% Sebo Bovino	
Produzido	11/07/2012	Analisado	16/09/2012
Número do Lote		GC-12-CS-046	
Lote estocado no tanque		205-2-013	
Quantidade de produto no tanque		1.595.183 L	
Numeração dos lacres do tanque		2985042/4107104/8541578/5218355	
Numeração dos lacres das amostras testemunho		8541538/4107254	

Característica	Unidade	Método de Ensaio	Resultado	ANP 04/2012 Limites	Laboratório
Aspecto a 25°C	-	VISUAL	LII	LII	Granol Cachoeira do Sul
Massa Específica a 20°	kg/m³	NBR 7148	879	850 - 900	Granol Cachoeira do Sul
Viscosidade Cinemática a 40° C	mm²/s	NBR 10441	4,8	3,0 - 6,0	Granol Cachoeira do Sul
Teor de água	mg/kg	EN ISO 12937	335	Máx. 380	Granol Anápolis
Contaminação Total	mg/kg	EN 12662	6	Máx. 24	Granol Cachoeira do Sul
Ponto de fulgor	°C	ASTM D93	140	Mín. 100	Granol Cachoeira do Sul
Teor de éster	% massa	EN 14103	98,0	Mín. 96,5	Granol Cachoeira do Sul
Resíduo de Carbono	% massa	ASTM D4530	0,03	Máx. 0,05	Granol Anápolis
Cinzas Sulfatadas	% massa	NBR 6294	< 0,01	Máx. 0,02	Granol Cachoeira do Sul
Enxofre Total	mg/kg	ASTM D 5453	3,2	Máx. 10	Granol Anápolis
Sódio e Potássio	mg/kg	NBR 15553	3,9	Máx. 5	Granol Anápolis
Cálcio e Magnésio	mg/kg	NBR 15553	1,5	Máx. 5	Granol Anápolis
Fósforo	mg/kg	NBR 15553	< 0,01	Máx. 10	Granol Anápolis
Corrosividade ao Cobre, 3 h a 50° C	-	NBR 14359	1	Máx. 1	Granol Anápolis
Ponto de entupimento de filtro a frio	°C	NBR 14747	+ 4	*	Granol Cachoeira do Sul
Índice de acidez	mg KOH/g	NBR 14448	0,44	Máx. 0,50	Granol Cachoeira do Sul
Glicerol livre	% massa	EN 14105	< 0,01	Máx. 0,02	Granol Cachoeira do Sul
Glicerol total	% massa	EN 14105	0,20	Máx. 0,25	Granol Cachoeira do Sul
Monoacilglicerol	% massa	EN 14105	0,63	Máx. 0,80	Granol Cachoeira do Sul
Diacilglicerol	% massa	EN 14105	0,15	Máx. 0,20	Granol Cachoeira do Sul
Triacilglicerol	% massa	EN 14105	0,10	Máx. 0,20	Granol Cachoeira do Sul
Metanol	% massa	EN 14110	0,03	Máx. 0,20	Granol Cachoeira do Sul
Índice de Iodo	g/100g	EN 14111	110,50	Anotar	Granol Cachoeira do Sul
Estabilidade à oxidação a 110° C	h	EN 14112	7,90	Mín. 6	Granol Cachoeira do Sul

LII = Limpido e isento de impurezas.

* Limites conforme tabela II do Regulamento Técnico ANP Nº 4/2012.


Ana Beatriz Machado Costa
 CRQ 07100689 – V Região
 Bacharel Química Ambiental

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

Fone (051) 3722 - 6550

ANEXO 5A

CERTIFICADO DE QUALIDADE DO BODIESEL B100



CERTIFICADO DE QUALIDADE

BODIESEL - B100

MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS: **ÓLEO DE SOJA (65%), GORDURA ANIMAL (35%) E METANOL**

PRODUÇÃO: 18/01/2013	ENSAIO: 21/01/2013	BOLETIM N°: 130112
CERTIFICADO N°: 674	LOTE: 674	TANQUE: 0304
LACRE AMOSTRA: 4505	ENTRADA: 98400	SAÍDA: 5592635

Característica	Unidade	Resultado	Especificações	Métodos
Aspecto/Temperatura 26,5 °C	-	LII	LII	Visual
Massa Específica a 20 °C	kg/m ³	876,2	850-900	NBR 7148
Massa Específica a 26,5 °C	kg/m ³	872,5	850-900	NBR 7148
Viscosidade Cinemática a 40	mm ² /s	4,335	3,0-6,0	NBR 10441
Teor de água	mg/kg	336,5	350 (máx.)	ASTM D6304
Contaminação Total	mg/kg	23,5	24 (máx.)	EN 12662
Ponto de Fulgor	°C	167,0	100,00 (mín.)	NBR 14598
Teor de éster	% massa	97,8	96,5 (mín.)	EN 14103
Resíduo de Carbono	% massa	0,002	0,05 (máx.)	NBR 15586
Cinzas Sulfatadas	% massa	0,014	0,020 (máx.)	NBR 6294
Enxofre total	mg/kg	8,8	10 (máx.)	ASTM D5453
Sódio + Potássio	mg/kg	3,7	5 (máx.)	NBR 15553
Cálcio + Magnésio	mg/kg	0,02	5 (máx.)	NBR 15553
Fósforo	mg/kg	4,0	10 (máx.)	NBR 15553
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C	-	1	1 (máx.)	NBR 14359
Ponto de entupimento de filtro a frio	°C	6	8 (máx.)	NBR 14747
Índice de acidez	mgKOH/g	0,19	0,50 (máx.)	ASTM D664
Glicerol livre	% massa	0,019	0,02 (máx.)	ASTM D6584
Glicerol total	% massa	0,182	0,25 (máx.)	ASTM D6584
Metanol ou Etanol	% massa	-	0,20 (máx.)	EN 14110
Estabilidade à oxidação a 110°C	h	10,5	6 (mín.)	EN 14112
Monoacilglicerol	% massa	0,559	0,80 (máx.)	ASTM D 6584
Diacilglicerol	% massa	0,076	0,20 (máx.)	ASTM D 6584
Triacilglicerol	% massa	0,069	0,20 (máx.)	ASTM D 6584
Índice de lodo	g/100g	96,14	ANOTAR	EN 14111

Ensaio realizado pelo Laboratório de Controle de Qualidade Oleoplan Cadastro nº 048 - Veranópolis/RS

LII: Límpido e isento de impurezas

Veranópolis, 21 de Janeiro de 2013.

Rubens Cagliani 
Engenheiro Químico – CRQ 05302824

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

ANEXO 5B

CERTIFICADO DE QUALIDADE DO BIODIESEL B100



OLEOPLAN S.A ÓLEOS VEGETAIS PLANALTO

CERTIFICADO DE QUALIDADE

BIODIESEL - B100

COMPOSIÇÃO: **ÓLEO DE SOJA (73%), GORDURA ANIMAL (25%), ÓLEO RECUPERADO (2%) E METANOL.**


PRODUÇÃO: 19/09/2014 ENSAIO: 23/09/14 BOLETIM N°: 140913
 CERTIFICADO N°: 997 LOTE: 997 TANQUE: 04 08
 LACRE AMOSTRA: 4124 ENTRADA: 5556945 SAÍDA: 2223442

Característica	Unidade	Resultado	Especificações	Métodos
Aspecto/Temperatura	21,0 °C	-	LII	Visual
Massa Específica a 20 °C	kg/m ³	877,7	850-900	NBR 7148
Massa Específica a 21,0 °C	kg/m ³	877,5	850-900	NBR 7148
Viscosidade Cinemática a 40	mm ² /s	4,392	3,0-6,0	NBR 10441
Teor de água	mg/kg	161,9	200 (máx.)	ASTM D6304
Contaminação Total	mg/kg	17,4	24 (máx.)	EN 12662
Ponto de Fulgor	°C	172,8	100,00 (mín.)	NBR 14598
Teor de éster	% massa	98,4	96,5 (mín.)	EN 14103
Enxofre total	mg/kg	8,9	10 (máx.)	ASTM D5453
Sódio + Potássio	mg/kg	5,0	5(máx.)	NBR 15553
Cálcio + Magnésio	mg/kg	0,35	5 (máx.)	NBR 15553
Fósforo	mg/kg	5,49	10 (máx.)	NBR 15553
Ponto de entupimento de filtro a frio	°C	5	5 (máx.)	NBR 14747
Índice de acidez	mgKOH/g	0,32	0,50(máx.)	ASTM D664
Glicerol livre	%massa	0,012	0,02 (máx.)	ASTM D6584
Glicerol total	%massa	0,197	0,25 (máx.)	ASTM D6584
Metanol ou Etanol	%massa	-	0,20 (máx.)	EN 14110
Estabilidade à oxidação a 110°C	h	11,0	6 (mín.)	EN 14112
Monoacilglicerol	%massa	0,695	0,70 (máx.)	ASTM D 6584
Diacilglicerol	%massa	0,029	0,20 (máx.)	ASTM D 6584
Triacilglicerol	%massa	0,009	0,20 (máx.)	ASTM D 6584
Índice de Iodo	g/100g	98	ANOTAR	EN 14111

Ensaio realizado pelo Laboratório de Controle de Qualidade Oleoplan Cadastro nº 048 - Veranópolis/RS

LII: Limpido e Isento de Impurezas

Veranópolis, 24 de Setembro de 2014

Rubens Caglioni 
Engenheiro Químico – CRQ 05302824

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

IPIRANGA
Base de Canoas

25 SET. 2014

RECEBIDO

ANEXO 6

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 4/ 2013

Parte integrante da Resolução ANP 50/ 2013

Tabela I – Especificações do óleo diesel de uso rodoviário.

CARACTERÍSTICA (1)	UNIDADE	LIMITE		MÉTODO	
		TIPO A e B		ABNT NBR	ASTM/ EN
		S10	S500		
Aspecto (2) (22) (23)	-	Límpido e isento de impurezas		14954	D4176
Cor	-	(3)	Vermelho (4)		
Cor ASTM, máx. (5)	-	3,0		14483	D1500 D6045
Teor de biodiesel (6)	% volume	(7)		15568	EN 14078
Enxofre total, máx. (21)	mg/kg	10,0 (8)	-	-	D2622 D5453 D7039 D7212 (9) D7220
		-	500	14533 (9)	D2622 D4294 (9) D5453 D7220
Destilação					
10% vol., recuperados, mín.	°C	180,0	Anotar	9619	D86
50% vol., recuperados		245,0 a 295,0	245,0 a 310,0		
85% vol., recuperados, máx.		-	360,0		
90% vol., recuperados		-	Anotar		
95% vol., recuperados, máx		370,0	-		
Massa específica a 20°C	kg/m ³	815,0 a 850,0 (10)	815,0 a 865,0	7148 14065	D1298 D4052
Ponto de fulgor, mín.	°C	38,0		7974 14598	D56 D93

					D3828
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	2,0 a 4,5	2,0 a 5,0	10441	D445
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(11)		14747	D6371
Número de cetano, mín. ou Número de cetano derivado (NCD), mín.	-	48	42 (12)	-	D613 D6890 D7170
Resíduo de carbono Ramsbottom no resíduo dos 10% finais da destilação, máx.	% massa	0,25		14318	D524
Cinzas, máx.	% massa	0,010		9842	D482
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx	-	1		14359	D130
Teor de Água (13), máx.	mg/kg	200	500	-	D6304 <i>EN ISO 12937</i>
Contaminação total (14), máx.	mg/kg	24	-	-	<i>EN 12662</i>
Água e sedimentos, máx. (14)	% volume	-	0,05	-	D2709
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (15), máx.	% massa	11	-	-	D5186 D6591 (16)
Estabilidade à oxidação (15), máx.	mg/100mL	2,5	-	-	D2274 (17) D5304(17)
Índice de acidez (24)	mg KOH/g	Anotar	-	14248	D974 D664
Lubricidade, máx.	µm	(18)			ISO 12156 D6079
Condutividade elétrica, mín. (19)	pS/m	25	25 (20)	- -	D2624 D4308

Nota:

(1) Poderão ser incluídas nesta especificação outras características, com seus respectivos limites, para óleo diesel obtido de processo diverso de refino e processamento de gás natural ou a partir de matéria prima distinta do petróleo.

(2) Deverá ser aplicado o procedimento¹ para cada método.

(3) Usualmente de incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada devido à coloração do biodiesel.

(4) O corante vermelho, especificado conforme a Tabela III, deverá ser adicionado no teor de 20 mg/L de acordo com o artigo 11.

(5) Limite requerido antes da adição do corante.

(6) Aplicável apenas para o óleo diesel B.

(7) No percentual estabelecido pela legislação vigente. Será admitida variação de $\pm 0,5$ % volume. A norma EN 14078 é de referência em caso de disputa para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel B.

(8) Para efeito de fiscalização nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +5 mg/kg no limite da característica teor de enxofre do óleo diesel B S10, nos segmentos de distribuição e revenda de combustíveis.

(9) Aplicável apenas para óleo diesel A.

(10) Será admitida a faixa de 815 a 853 kg/m³ para o óleo diesel B.

(11) Limites conforme Tabela II.

(12) Alternativamente, fica permitida a determinação do índice de cetano calculado pelo método NBR 14759 (ASTM D4737), quando o produto não contiver aditivo melhorador de cetano, com limite mínimo de 45. No caso de não-conformidade, o ensaio de número de cetano deverá ser realizado. O produtor e o Importador deverão informar no Certificado da Qualidade nos casos em que for utilizado aditivo melhorador de cetano. Ressalta-se que o índice de cetano não traduz a qualidade de ignição do óleo diesel contendo biodiesel e/ou aditivo melhorador de cetano.

(13) Aplicável na produção e na importação do óleo diesel A S10 e a ambos os óleos diesel B na distribuição.

(14) Aplicável na importação, antes da liberação do produto para comercialização.

(15) Os resultados da estabilidade à oxidação e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos poderão ser encaminhados ao distribuidor até 48 h após a comercialização do produto de modo a garantir o fluxo adequado do abastecimento.

(16) Poderá ser determinado, alternativamente, pelo método EN 12916, aplicável ao óleo diesel B contendo até 5% de biodiesel. Os métodos ASTM D5186 e D6591 não se aplicam ao óleo diesel B.

(17) Os métodos ASTM D2274 e D5304 aplicam-se apenas ao óleo diesel A.

(18) Poderá ser determinada pelos métodos ISO 12156 ou ASTM D6079, sendo aplicáveis os limites de 460 µm e 520 µm, respectivamente. A medição da lubricidade deverá ser realizada bimestralmente mediante a elaboração de amostra composta de óleo diesel A em mistura com biodiesel.

(19) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento/bombeio do combustível pelo produtor, importador e distribuidor. Para o óleo diesel A S500 deverá ser informado no Certificado da Qualidade a concentração de aditivo antiestático adicionada.

(20) A condutividade elétrica será determinada em amostra composta constituída da mistura de aditivo antiestático mais corante com o produto a ser comercializado. O teor de corante nesta amostra deverá estar conforme o indicado na Tabela III.

(21) Em caso de disputa, a norma ASTM D5453 deverá ser utilizada.

(22) Em caso de disputa, o produto será considerado como não especificado na característica Aspecto, caso ao menos um entre os parâmetros teor de água e água e sedimentos, para o óleo diesel S500, e um entre os parâmetros teor de água e contaminação total, para o óleo diesel S10, esteja não conforme.

(23) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e água e sedimentos, para o óleo diesel S500, ou teor de água e contaminação total, para o óleo diesel S10. O produto será reprovado caso ao menos um desses parâmetros esteja fora de especificação.

(24) Em caso de disputa, a norma ASTM D974 deverá ser utilizada.

Tabela II - Ponto de Entupimento de Filtro a Frio

UNIDADES DA FEDERAÇÃO	LIMITE MÁXIMO, °C											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
SP - MG - MS	12	12	12	7	3	3	3	3	7	9	9	12
GO/DF - MT - ES - RJ	12	12	12	10	5	5	5	8	8	10	12	12
PR - SC - RS	10	10	7	7	0	0	0	0	0	7	7	10

Tabela III - Especificação do corante vermelho para o óleo diesel S500 (1)

Característica	Especificação	Método
Aspecto	Líquido	Visual
Color Index	Solvente Red	-
Cor	Vermelho intenso	Visual
Massa Específica a 20°C, kg/m ³	990 a 1020	Picnômetro
Absorvância, 520 a 540 nm	0,600 - 0,650	(*)

(*) A Absorvância deve ser determinada em uma solução volumétrica de 20 mg/l do corante em tolueno P.A., medida em célula de caminho ótico de 1 cm, na faixa especificada para o comprimento de onda.

(1) O aditivo antiestático deverá ser misturado ao corante vermelho em proporção tal que garanta a mínima condutividade elétrica ao óleo diesel exigida pela especificação.

ANEXO 7

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 2/ 2016

Parte integrante da Resolução ANP 30/ 2016

Tabela I - Especificação do óleo diesel BX a B30.

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE			MÉTODO
		S10	S500	S1800 não rodoviário	
Aspecto (1)		LII (2)			Visual
Cor		(3)	Vermelho (4)	(5)	Visual
Cor ASTM, máx.		3,0			NBR 14483 ASTM D6045 ASTM D1500
Massa Específica (20°C) (6)	kg/m ³	817,8 a 865,0	817,8 a 875,5	822,4 a 886,0	NBR 7148 NBR 14065 ASTM D1298 ASTM D4052 NBR 15983 ASTM D 7042
Viscosidade a 40°C (7)	mm ² /s	1,9 a 4,1	2,0 a 5,0		NBR 10441 ASTM D445
Teor de Biodiesel, % vol.	% volume	(8)			NBR 15568 EN 14078 ASTM D7861 ASTM D7371 (9)
Enxofre, máx.	mg/kg	10	-		ASTM D5453 ASTM D2622 ASTM D7039 ASTM D7220 (9)
		-	500	1800	ASTM D2622 ASTM D5453 ASTM D7039
Destilação / 10% vol., máx. (10)	°C	180	Anotar		NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160
Destilação / 50% vol. (10)	°C	245,0 a 295,0	245,0 a 310,0		
Destilação / 85% vol. (10)	°C	Anotar			
Destilação / 90% vol. (10)	°C	Anotar			
Destilação / 95% vol. (10)	°C	Anotar			

Continuação...

Ponto de fulgor, °C, mín.	°C	38			NBR 7974 NBR 14598 ASTM D56 ASTM D93 ASTM D3828
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(11)			NBR 14747 ASTM D6371
Resíduo de Carbono - 10% amostra, máx.	%massa	0,25			NBR 14318 ASTM D524
Cinzas, máx.	%massa	0,01			NBR 9842 ASTM D482
Corrosividade ao cobre		1			NBR 14359 ASTM D130
Teor de água, máx.	mg/kg	200	500		ASTM D6304 EN ISO 12937
Água e sedimentos, máx.	% vol	-	0,05		ASTM D2709
Estabilidade à oxidação, mín.	h	20			EN15751
Contaminação total, máx. (12)	mg/kg	24	Anotar		EN12662
Número de Acidez, máx.	mg KOH/g	0,3			NBR 14248 ASTM D664
Condutividade elétrica, mín. (13)	pS/m	25	25	Anotar (14)	ASTM D2624 ASTM D4308
Número de cetano ou número de cetano derivado (NCD), mín.	-	48	42	42	ASTM D613 ASTM D6890 ASTM D7170 ASTM D7668

Nota:

(1) Em caso de disputa ou para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total, para o óleo diesel BX a B30 (S10) e teor de água e água e sedimentos para o óleo diesel BX a B30 (S500), e somente teor de água no óleo diesel BX a B30 (S1800). O Aspecto será considerado não conforme caso ao menos um desses parâmetros esteja fora de especificação.

(2) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio.

(3) Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada devido à coloração do biodiesel.

(4) O corante vermelho deverá ser especificado conforme a Resolução ANP nº 50/2013, ou outra que venha substituí-la.

(5) Coloração de amarelo a alaranjado, podendo apresentar-se ligeiramente alterado para a tonalidade marrom devido à coloração do biodiesel.

(6) As normas NBR 14065 e ASTM D4052 devem ser utilizadas como referência.

(7) As normas ASTM D445 e NBR 10441 devem ser utilizadas como referência.

(8) Será admitida variação de $\pm 0,5\%$ em volume para misturas de óleo diesel com teor de biodiesel inferior a 20% e variação de $\pm 1,0\%$ em volume para óleo diesel B20 a B30. A norma EN 14078 deve ser utilizada como referência.

(9) Aplicável somente para mistura de óleo diesel A com até 20% de biodiesel.

(10) Para óleo diesel BX a B20, somente os métodos NBR 9619 e ASTM D86 devem ser utilizados. O método ASTM D1160 deve ser utilizado para óleo diesel B21 a B30, sendo neste caso os limites "anotar" para as temperaturas de 10% e 50% recuperados.

(11) Limites conforme Tabela II.

(12) Deverá ser utilizada somente a versão da norma de 1998 ou 2008 (EN 12662:1998 ou EN 12662:2008)

(13) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento/bombeio do combustível pelo distribuidor.

(14) Caso a condutividade elétrica medida seja inferior a 25 (pS/m) deverá ser dado destaque do resultado no certificado da qualidade para que o distribuidor seja alertado quanto à adoção de medidas de segurança.

Tabela II - Ponto de Entupimento de Filtro a Frio.

UNIDADES DA FEDERAÇÃO	LIMITE MÁXIMO, °C											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
SP - MG - MS	12	12	12	7	3	3	3	3	7	9	9	12
GO/DF - MT -ES - RJ	12	12	12	10	5	5	5	8	8	10	12	12
PR - SC - RS	10	10	7	7	0	0	0	0	0	7	7	10

ANEXO 8

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 3/ 2014

Parte integrante da Resolução ANP 45/ 2014

Tabela I - Especificações do Biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1) (2)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850 a 900	7148	1298	EN ISO 3675
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0 (3)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	15995	-	EN 12662 (5)
Ponto de fulgor, mín. (4)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas, máx. (6)	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554		
15555					
15553					
15556	-	EN 14108 (5)			
EN 14109 (5)					
EN 14538 (5)					
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553	-	EN 14538 (5)
Fósforo, máx. (7)	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107 (5)

Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx. (6)	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (6)	-	Anotar	-	613	
6890 (8)	EN ISO 5165				
Ponto de entupimento de filtro afrio, máx.	°C	(9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448-	664-	EN 14104 (5)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771		
15908 (5)-	6584 (5)				
-	EN 14105 (5)				
Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25	15344		
15908 (5)	6584 (5)-	EN 14105 (5)			
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7	15342 (5)		
15344					
15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)			
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5)		
15344					
15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)			
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5)		
15344					
15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)			
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (11)	h	6 (12)	-	-	EN 14112 (5)
					EN 15751 (5)

Nota:

(1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio. Em caso de disputa, o produto só poderá ser considerado como não especificado no Aspecto, caso os parâmetros teor de água e/ou contaminação total estejam não conformes.

(2) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total. O produto será reprovado caso pelo menos um desses dois últimos parâmetros esteja fora de especificação.

(3) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +50 mg/kg no limite do teor de água no biodiesel para o produtor e de +150 mg/kg para o distribuidor.

(4) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.

(5) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica.

(6) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da Tabela de Especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados à ANP pelo Produtor de biodiesel, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de material graxo, o Produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de materiais graxos utilizados.

(7) Em caso de disputa, deve ser utilizado o método EN 14107 como referência.

(8) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano.

(9) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.

(10) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa.

(11) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível.

(12) A estabilidade à oxidação a 110 °C terá seu limite mínimo de 8 horas, a partir de 1º de novembro de 2014.

Tabela II - Ponto de Entupimento de Filtro a Frio

UNIDADES DA FEDERAÇÃO	LIMITE MÁXIMO, °C											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
SP - MG - MS	14	14	14	12	8	8	8	8	8	12	14	14
GO/DF - MT - ES - RJ	14	14	14	14	10	10	10	10	10	14	14	14
PR - SC - RS	14	14	14	10	5	5	5	5	5	10	14	14