

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, BIODEGRADAÇÃO E CONTROLE DE
BIOFILMES FORMADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO SIMULADO DE
MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL**

Francielle Bucker

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientador: Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2015

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, BIODEGRADAÇÃO E CONTROLE DE
BIOFILMES FORMADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO SIMULADO DE
MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL**

Francielle Bucker

Graduada em Licenciatura Ciências Biológicas
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Tese apresentada como um dos requisitos
no Curso de Doutorado na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, no Programa
de Pós Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Bücker, Francielle
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, BIODEGRADAÇÃO E
CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS DURANTE O
ARMAZENAMENTO SIMULADO DE MISTURAS DE DIESEL E
BIODIESEL / Francielle Bücker. -- 2015.
205 f.

Orientador: Fátima Menezes Bento.

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, 2015.

1. Contaminação de combustíveis. 2. Biodiesel. 3.
Sequenciamento de alto rendimento, qPCR. 4. Biocida.
5. Comunidade microbiana. I. Menezes Bento, Fátima,
orient. II. Título.

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

FRANCIELLE BÜCKER
BIÓLOGA
UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

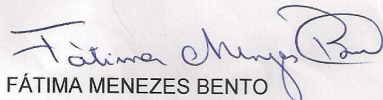
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

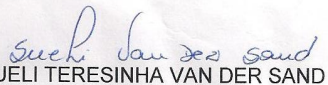
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

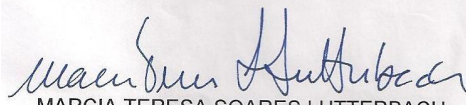
Porto Alegre (RS), Brasil

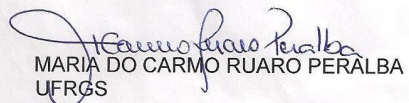
Aprovada em: 23/03/2015
Pela Banca Examinadora

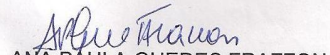
Homologado em: 12/08/2015
Por:

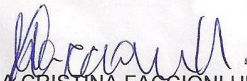

FÁTIMA MENEZES BENTO
Orientador


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA


MARCIA TERESA SOARES LUTTERBACH
INST. NACIONAL DE TECNOLOGIA/RJ


MARIA DO CARMO RUARO PERALBA
UFRGS


ANA PAULA GUEDES FRAZZON
UFRGS


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

É com imensa alegria e satisfação que vejo realizada a conclusão de um dos objetivos de minha vida. Esta realização somente foi possível com a ajuda de muitas pessoas que me auxiliaram durante o trabalho, cujas dificuldades encontradas foram superadas com a colaboração e apoio de todos. Foram muitas as pessoas que contribuíram, que é impossível mencionar o nome de todas nesta página, mas elas estarão sempre em minhas recordações. Mas alguns agradecimentos especiais são para:

a Professora Fátima Menezes Bento, pela orientação, amizade e a confiança depositada em mim durante a realização deste trabalho;

aos meus pais Marli e Wilmuth pelo constante incentivo; e aos meus irmãos Leticia e Alessandro, por sempre estarem ao meu lado;

ao Maciel, meu importante incentivador e companheiro nesta conquista;

aos colegas de Laboratório Lab BIO Aline, Sabrina, Juciana, todos aqueles que por deixaram sua marca e presença pelo apoio, amizade e ajuda sempre que precisei.

Um obrigada especial aos colegas e amigos do 209.

Obrigada às amigas Elisandra e a Thaisa, pela convivência, amizade e carinho!

A Patricia Quadros que contribuiu de maneira tão significativa nesta tese.

A querida Professora Ana Frazzon, pelo zelo, cuidado e orientações.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela contribuição em minha formação acadêmica, em especial a Sueli que me cativou para Microbiologia, ainda na Graduação.

Agradeço a CNPq e CAPES, pelo financiamento do projeto e concessão de bolsa de estudos. Também agradeço a Ipiranga Produtos de Petróleo por fornecer os combustíveis e pelo suporte técnico. Os autores agradecem a Eric Tripplet pelo suporte nas análises ILLUMINA, na Universidade da Florida, USA.

*Não faça do hábito um estilo de vida.
Ame a novidade.*

...

*Tente o novo todo dia.
o novo lado,
o novo método,
o novo sabor,
o novo jeito,
o novo prazer,
o novo amor.
a nova vida.*

Tente.

Clarice Lispector

RESUMO

BIODEGRADAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOFILMES FORMADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO SIMULADO DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL E SEU CONTROLE ¹

O uso crescente de biodiesel na matriz energética mundial, como alternativa ao uso dos combustíveis fósseis, tem mobilizado setores da sociedade na tentativa de preservar a qualidade ao longo de toda a cadeia de produção, distribuição e armazenamento. A suscetibilidade à contaminação microbiana do biodiesel nas misturas diesel e biodiesel, durante o armazenamento é uma das vulnerabilidades deste biocombustível. Neste trabalho avaliou-se o efeito do biodiesel, nas concentrações B5, B10, B50 e B100 sobre o crescimento microbiano na interface óleo-água por sequenciamento de alto rendimento, DGGE e qPCR; e, avaliou-se a biodegradação do combustível por GC/qMS e infravermelho, em microcosmos com microrganismos nativos do combustível e com adição de inóculo não caracterizado. As concentrações (0, 500, 1000 ppm) do biocida 3'-metilene bis(5-methyloxazolidine)(MBO)puro, e presente em um pacote de aditivos multifuncional (50%) foram avaliadas para controlar a contaminação microbiana. Observou-se que o biodiesel teve um efeito positivo sobre o crescimento microbiano, em que B100 e B50 apresentaram os maiores valores de biomassa na interface óleo-água. A análise por sequenciamento de alto rendimento mostrou que a população bacteriana apresentou abundâncias relativas diferentes nas misturas avaliadas para os principais filos encontrados *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. *Cladosporium* sp. foi o fungo predominante em B100 e B50. Verificou-se, por qPCR, que o biofilme apresentou cerca de 70% de fungos e 30% de bactérias em sua composição. As maiores porcentagens de biodegradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel ocorreram em B5. Em B10 e B50 ocorreram as maiores porcentagens de degradação dos n-alcanos. Entre as concentrações testadas, apenas 500 ppm MBO 50% (a.s.) não controlou, e provocou mudanças na comunidade, além de promover o crescimento microbiano. Os resultados mostraram que teor de biodiesel e o perfil da comunidade inicial (inóculo ou nativa) interferem na composição final do biofilme e na biodegradação do combustível durante o armazenamento simulado.

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. (205 p.) Março, 2015.

ABSTRACT

FUEL BIODEGRADATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICROBIAL BIOFILMS IN SIMULATED STORED DIESEL/BIODIESEL BLENDS AND THE EFFECT OF BIOCIDES¹

The growing use of biodiesel in the world energy matrix as an alternative to fossil fuels, demand studies about the effect of biofuel addition in microbial contamination during storage. Understand their impact on the fuel and prevent damage is fundamental during the storage time to ensure to the consumer a final product with quality. We assessed the effect of biodiesel B5, B10, B50 and B100 on microbial growth in oil-water interface, in microcosms with fuel native microorganisms or with uncharacterized inoculum. We evaluated the microbial community by high-throughput sequencing, DGGE and qPCR; we evaluated fuel biodegradation by GC/qMS and infrared. The effect of 3'-methylenebis(5-methylloxazolidine) (MBO) biocide were tested in different concentrations (0, 500, 1000 ppm) as pure and present in an additive multifunctional package to control the microbial contamination. We observed a positive effect of biodiesel in microbial growth, and B100 and B50 show the greatest biomass values at oil-water interface. High-throughput sequencing revealed different relative abundances of microbial communities in the evaluated blends, and the principal phyla found were *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. *Cladosporium* sp. were the predominant fungi in B100 and B50. FAMES showed the greatest biodegradation percentage in B5; and, n-alkanes in B10 and B50. qPCR analysis revealed that the biofilm is composed by 70% fungi and 30% bacteria. 500 ppm (as supplied) MBO 50% did not control the microbial growth and an interfacial biofilm was formed. Our results show that biodiesel level in the fuel and the initial community (native or inoculum) affect the final biofilm composition, and influence the fuel biodegradation in simulated storage.

¹Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (205 p.) March, 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Combustíveis.....	5
2.1.1 Diesel.....	8
2.1.2 Biodiesel	8
2.2 Biodeterioração de combustíveis	11
2.3 Fatores determinantes para a contaminação microbiana de diesel e biodiesel.....	12
2.3.1 Suscetibilidade do diesel e biodiesel à degradação abiótica	14
2.3.2 Suscetibilidade do diesel e do biodiesel a biodegradação	18
2.3.3 Biodegradação do diesel e do biodiesel	21
2.4 Comunidades microbianas associadas ao armazenamento de diesel e biodiesel	26
2.4.1 Caracterização da comunidade microbiana por métodos dependentes de cultivo	27
2.4.2 Caracterização da comunidade microbiana por métodos independentes de cultivo	29
2.5 Consequências da contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis.....	36
2.6 Métodos analíticos para análise do combustível	39
2.7 Controle da contaminação microbiana durante o armazenamento.....	42
2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
3. CAPÍTULO 1	
COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO NA ESTOCAGEM SIMULADA DE DIESEL (B0), BODIESEL (B100) E MISTURAS DE DIESEL E BODIESEL (B5, B10, B50).....	62
Resumo	64
Destaques	65
3.1.Introdução.....	66
3.2.Material e Métodos	68
3.2.1.Combustível.....	68
3.2.3.Contaminação microbiana	68
3.2.4.Estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis	68
3.2.5.Crescimento microbiano	69
3.2.6.Degradação dos ésteres de ácidos graxos do por GC/qMS.....	69
3.2.7.Análise por Infravermelho	71
3.2.8.Extração de DNA	72
3.2.9.Sequenciamento de alto rendimento.....	72

3.2.10. Análise estatística	74
3.3. Resultados e Discussão	74
3.3.1.Crescimento microbiano	74
3.3.3.Análise da biodegradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel(GC×qMS)	80
3.3.3.1.B100.....	81
3.3.3.2.Misturas B5, B10, B50	82
3.3.4.Análise por Infravermelho (IV)	85
3.3.5.Estrutura da comunidade microbiana por sequenciamento de alto rendimento.....	87
2.3.5.1Fungos	87
3.3.5.2.Bactérias	88
3.4.Conclusões	96
Referências Bibliográficas	97

4.CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DETERIOGÊNICA POR MÉTODOS NÃO CULTIVÁVEIS DURANTE ARMAZENAMENTO DE DIESEL, BIODIESEL E MISTURAS (B5, B10, B50).....	105
Resumo	107
4.1 Introdução.....	108
4.2 Material e Métodos	111
4.2.1 Combustível.....	111
4.2.2 Condições de estocagem simulada.....	112
4.2.3 Contaminação microbiana	112
4.2.4 Interface óleo- água	113
4.2.4.1 Crescimento microbiano	113
4.2.4.2 Extração de DNA	113
4.2.4.3 Análise por PCR quantitativo (qPCR).....	114
4.2.4.3.1 Desenho de oligonucleotídeos para qPCR	114
4.2.4.3.2 Padronização das reações de quantificação absoluta	115
4.2.5 Fase aquosa	116
4.2.6 Fase oleosa - Degradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel e alcanos do diesel por cromatografia gasosa monodimensional acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar (GC/qMS) Análise qualitativa e quantitativa.....	117
4.2.7 Análise estatística	119
4.3.1Crescimento microbiano	120
4.3.2 Estrutura da comunidade microbiana-Quantificação de bactérias degradadoras de alcanos, bactérias e fungos por qPCR.....	121
4.3.4 Fase aquosa	124
4.3.4.1Tensão Superficial	124
4.3.4.2 Índice de emulsificação IE ₂₄	124
4.3.4.3 pH	124
4.3.5. Biodegradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel	125
4.3.5.1 B100.....	126
4.3.5.2 Misturas B5, B10, B50.....	127

4.3.6 Biodegradação dos n-alcenos (C ₁₀ –C ₂₀) do diesel	127
4.5 Conclusões	136
Referências Bibliográficas	137

5. CAPÍTULO 3

FUEL BIODEGRADATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICROBIAL BIOFILMS IN STORED DIESEL/BIODIESEL BLEND B10 AND THE EFFECT OF BIOCIDES	143
Highlights.....	145
Abstract	146
5.1. Introduction	147
5.2. Materials and Methods.....	148
5.2.1. Fuel.....	148
5.2.2 Biocide test.....	148
5.2.3 Simulated storage	148
5.2.4 Inoculation	149
5.2.5 Analysis	149
5.2.5.1 Microbial growth	149
5.2.5.2 Oil-water interface.....	150
5.2.5.2.1 DNA extraction	150
5.2.5.2.2 Analysis of the microbial population by IlluminaHiSeq- High Throughput Sequencing of the 16S rRNA gene	150
5.2.5.4 Analysis of oil phase.....	151
5.3. Results	151
5.3.1. Microbial growth and biocide action	151
5.3.2 Microbial community revealed by ILLUMINA HiSeq analysis of 16S rRNA gene.....	154
5.3.2.1 Microbial community in untreated fuel.....	156
5.3.2.2 Microbial community: Impact of 500 ppm (a.s.) MBO 50% on the oil/water interface microbial community.....	156
5.3.3 Biodegradation of biodiesel (HATR- FTIR).....	159
5.4. Discussion	161
5.5. Conclusions.....	165
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS	169
6.1 Crescimento Microbiano	169
6.2 Biodegradação de Diesel e Biodiesel.....	171
6.3 Caracterização da Comunidade Microbiana.....	174
6.4 Controle Do Crescimento Microbiano- Biocidas.....	180
7. CONCLUSÕES.....	184
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1: Principais ácidos graxos que compõem o biodiesel	10
TABELA 2: Enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos (C ₉ a C ₂₀) componentes do óleo diesel (Adaptado de: Das & Chandran, 2011).....	22

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Compostos monitorados e seus íons selecionados empregados para análise quantitativa dos mesmos em B5, B10, B50 e B100.....	71
Tabela 2. Valores de peso seco da biomassa formada na interface óleo-água nos tratamentos contendo B0, B5, B10, B50 e B100; aos 10, 20, 30 e 40 dias, na condição de combustível como recebido da distribuidora.....	77
Tabela 3. Análise qualitativa e semi quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel puro (65%soja e 35%sebo) utilizado no estudo.....	81
Tabela 4. Porcentagem da degradação dos ésteres de ácidos graxos avaliados presentes nas misturas B5, B10, B50 e em B100 após 40 dias de incubação.	83
Tabela 5. Abundância relativa (%) das Famílias de Bacteria nas amostras B5, B10, B50 e B100, ao final de 40 dias, e respectiva classificação em relação a Ordem, Classe e Filo a que estas famílias pertencem.....	90

CAPÍTULO 2

Tabela 1.Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) e controles utilizados para a análise por qPCR.	115
Tabela 2. Compostos monitorados e seus íons selecionados empregados para análise quantitativa dos mesmos em B5, B10, B50 e B100.....	119
Tabela 1. Valores de peso seco (mg) da biomassa formada na interface óleo-água nos tratamentos contendo B0, B5, B10, B50 e B100; aos 10, 20, 30 e 60 dias.....	121

Tabela 4. Eficiência do PCR, os coeficientes de correlação e o R^2 obtidos para as curvas padrão.....	122
Tabela 5. Medidas de tensão superficial da fase aquosa avaliada aos 10, 20, 30 e 60 dias de incubação, e pH aos 60 dias.	125
Tabela 6. Análise qualitativa e semi quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel puro (90% soja e 10%sebo) utilizado no estudo.	126
Tabela 7. Porcentagem da degradação dos ésteres de ácidos graxos avaliados presentes nas misturas B5, B10, B50 e em B100 após 60 dias de incubação.	127
Tabela 8. Porcentagem da degradação dos alcançou (C_{10} - C_{20}) avaliados presentes nas misturas B5, B10, B50 e em B0 após 60 dias de incubação. .	128

CAPITULO 3

Table 1. Biomass at the oil/water interface in microcosms with MBO50% and MBO100%, at 1000, 500 and 0 ppm (control), added to fuel as-received and with a microbial inoculum (ASTM E1259-10).	152
Table 2. Total sequences obtained by high throughput sequencing (ILLUMINA HiSeq) and classified with the RDP data bank.	155
Table 3. Relative abundance of 16S rRNA gene, at genera level after 28 and 60 days, from fuel as received and fuel with inoculum, and comparison with the pure inoculum. Only the OTUs with averaged relative abundance >0.01% are listed.....	158

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1: Percentuais de combustíveis consumidos no Brasil calculados sobre volumes convertidos em toneladas equivalentes de petróleo, em 2013, no Brasil (Fonte: www.anp.gov.br).....	6
FIGURA 2: Fontes de matéria primas renováveis para uso na produção de biodiesel no Brasil, de acordo com a vocação de cada região brasileira.....	11
FIGURA 3: Reações enzimáticas envolvidas no processo de degradação de hidrocarbonetos. a) Degradação da fração alifática, exemplo n-alcanos. b) Etapas metabólicas básicas da degradação de hidrocarbonetos aromáticos, exemplo benzeno. (Fonte: Das & Chandran, 2011)	22
FIGURA 4: Provável rota metabólica associada à biodegradação anaeróbia de n-alcanos via adição de um carbono (carboxilação subterminal ao C3)(Fonte: So et al., 2003).....	24
FIGURA 5: As setas indicam a ligações ésteres do biodiesel possivelmente hidrolisadas por lipases ou esterases (Fonte: Casas et al., 2012).	24
FIGURA 6: Processo de hidrólise de um éster de ácido graxo, produzindo um álcool e um ácido graxo. (Fonte: Cooper, 2000).	26
FIGURA 7: Estrutura química do MBO. www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	45

CAPÍTULO 1

Fig.1. Estimativa do número de microrganismos heterotróficos cultiváveis da fase aquosa ($\log \text{NMP} \cdot \text{mL}^{-1}$) nos microcosmos contendo B5, B10, B50 e B100 durante 40 dias de experimento. a) B100; b)B50; c)B10; d)B5,	76
Fig. 2. Espectros de HATR-FTIR da fase óleo para o controle (vermelho) e para o tratamento (azul) após 40 dias.	85
Fig. 3: População microbiana analisada pela comparação das sequências de leitura geradas pela análise metagenômica com os dados do banco de	

classificação RDP. São apresentados os dados de abundância relativa dos microrganismos aos 40 dias.*Outros refere-se a outros microrganismos eucarióticos não cultiváveis e não classificados. 87

Fig. 4. População microbiana analisada pela comparação das sequências de leitura geradas pela análise metagenômica com os dados do banco de classificação RDP. São apresentados os dados de abundância relativa dos microrganismos aos 40 dias. *Outros refere-se a outros microrganismos eucarióticos não cultiváveis e não classificados. 89

Fig. 5. Análise dos componentes principais dos resultados relacionados a biodegradação do biodiesel, aos diferentes percentuais de biodiesel adicionados ao diesel e composição da comunidade bacteriana com sequenciamento de alto rendimento). Azul: variáveis suplementares; vermelho: variáveis ativas91

Fig. 6. Análise dos componentes principais dos resultados relacionados a biodegradação dos ésteres, e a comunidade bacteriana mais abundante(Plataforma Illumina). Azul: variáveis suplementares. Vermelho: variáveis ativas 93

Material Suplementar 1

Curvas analíticas obtidas para a determinação quantitativa dos ácidos graxos por GC/qMS 104

CAPÍTULO 2

Figura 1: Estimativa da população fúngica, bacteriana de bactérias degradadoras de alcanos por qPCR, do biofilme formado na interface óleo-água, aos 10, 20 30 e 60 dias de incubação, dos tratamentos com a) B0, b)B5, c)B10, d)B50, e)B100. Os valores das médias e desvios padrão foram calculados a partir de reações em duplicatas realizadas em uma única reação de PCR.123

Figura 2: Análise dos componentes principais dos resultados relacionados a biodegradação dos ésteres de ácidos graxos (C14:0, C16:0, C17:0, C18:0,

C18:1, C18:2), dos n-alcenos (C ₁₁ -C ₂₀), a mistura de diesel de biodiesel na mistura (B0, B5, B10, B50 e B100) e a biomassa formada na interface óleo-água (mg). Azul: variáveis suplementares; Vermelho: variáveis ativas	130
Material Suplementar 1	
Curvas analíticas obtidas para a determinação quantitativa por GC/qMS de n-alcenos	141
Curvas analíticas obtidas para a determinação quantitativa por GC/Qms de ésteres de ácidos graxo.....	142

CAPÍTULO 3

Figure 1. Microbial counts in fuel as received (Control, 500 and 1000 ppm MBO50%) after 1, 14, 28, 42 and 60 days. a) aqueous phase; b) oil phase...	153
Figure 2. Microbial counts in fuel with inoculum (Control, 500 and 1000 ppm MBO50%), after 1, 14, 28, 42 and 60 days. a) aqueous phase; b) oil phase..	153
Figure 3. Microbial communities analyzed by RDP classifier using 16S rRNA gene hit reads blasted and extracted from metagenomic data sets. Relative abundance at phylum level after 28 and 60 days, and comparison with the added inoculum.....	155
Figure 4. Relative abundance of genera determined by 16S rRNA gene analysis (>1%) in microbial communities from control and inoculated treatments, with and without biocide, after 28 and 60 days.....	157
Figure 5. HATR-FTIR spectra for B10 blend from all treatments.....	160
Figure 6. Dendrogram obtained by infrared analysis. AR: fuel as received; INOC: inoculated fuel. MBO50: MBO 50%. MBO100: MBO100%. 0, 500 and 1000 ppm.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrometro
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
atm	Atmosfera
CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (1.15%)+ 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (0.35%)
CoA	Coenzima A
DBO	2,2-oxybis- (4,4,6-trimethyl-1,3,2-dioxaborinane) + 2,2- (1-methyl-trimethylenedioxy) -bis- (4-methyl-1,3,2-dioxaborinane)
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
EUA	Estados Unidos da América
GC	Cromatografia Gasosa
IV	Infravermelho
MBO	3,3' -methylenebis (5-methyloxazolidine)
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Massa
NIR	Infravermelho Próximo
NMEND	dinitromorfolina (4-(2-nitrobutyl) morpholine (~70%) + 4,4'-(2-ethyl-2-nitrotrimethylene) dimorpholine (~20%)
NMP	Número mais provável
°C	Grau Celsius
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

1. INTRODUÇÃO

O consumo de energia vem aumentando drasticamente nos últimos anos, e este aumento está relacionado ao crescimento do setor de transportes e industrial, de forma a atender a demanda da população. No Brasil, o transporte rodoviário é o principal meio de transporte para deslocamento e escoamento da produção nacional, agrícola e industrial. O óleo diesel é o combustível empregado tanto em caminhões, ônibus, maquinários agrícolas e trens de carga, ocupando uma posição de destaque na matriz energética brasileira. Tendo em vista a exigência da sociedade por soluções sustentáveis, principalmente no setor energético, combustíveis como o biodiesel tem se mostrado alternativas promissoras. O biodiesel não só é menos tóxico ao meio ambiente, como também é biodegradável e é produzido a partir de fontes renováveis, ou mesmo de resíduos.

Tendo em vista o apelo por este tipo de combustível, o Brasil criou, em 2004, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, e o biodiesel foi introduzido de forma compulsória na matriz energética. O uso de 2% de biodiesel ao óleo diesel (mistura denominada B2) tornou-se obrigatório a partir de 2008. O programa previa o aumento desta mistura para 5% (B5) somente a partir de 2013, no entanto, o governo brasileiro, no intuito de fortalecer suas iniciativas, antecipou em três anos essa obrigatoriedade, e a em janeiro de

2010, passou-se a utilizar a mistura B5 em todo o território nacional. Embora existam impasses relacionados à adição do biodiesel ao diesel, em novembro de 2014, passou-se a utilizar 7% de biodiesel adicionado ao diesel puro (B7) na frota nacional.

Juntos, óleo diesel e o biodiesel somam 51,4% dos combustíveis consumidos na matriz energética veicular brasileira. Desta forma, investimentos na área de produção e distribuição procuram garantir um produto com preços competitivos e com qualidade. Neste sentido, estudos sobre a qualidade final deste combustível durante sua distribuição e armazenamento são fundamentais para garantir ao consumidor um produto final de qualidade. Durante o manuseio, transporte e armazenamento podem surgir indesejáveis problemas, como a formação de lodos de origem química e biológica.

A formação de lodos biológicos está associado à contaminação microbiana por fungos, bactérias e leveduras, e muitas vezes, é negligenciada devido à falta de informação sobre a suscetibilidade do combustível a contaminação microbiana. Como consequências da contaminação microbiana alguns problemas como a redução da qualidade do combustível, entupimento e saturação prematura de filtros, assim como degastes de bicos e injetores do motor são verificados. Em tanques de armazenamento antigos são constatados problemas de corrosão interna e externa que provocam vazamentos de combustível, comprometendo o solo, subsolo e aquíferos.

Algumas medidas simples podem ser tomadas para evitar o desenvolvimento microbiano, tais como a drenagem periódica da água formada no fundo dos tanques e a limpeza quando possível. Além disso, podem-se

adicionar produtos antimicrobianos aos combustíveis, estes, dependendo da concentração utilizada, podem prevenir e ou erradicar a contaminação.

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar a comunidade microbiana em biofilmes formados na interface óleo água, de microcosmos contendo diesel, biodiesel e misturas de diesel e biodiesel, por métodos independentes de cultivo avaliar a suscetibilidade do combustível a biodegradação por estes microrganismos. Será avaliada a suscetibilidade destas comunidades a um antimicrobiano e como a comunidade microbiana pode ser alterada em função do biocida aplicado.

Os objetivos específicos do trabalho são:

a) caracterizar a população microbiana da biomassa formada na interface óleo água em microcosmos com diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e diferentes misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B50), a partir do combustível como recebido da distribuidora e contaminado com inóculo, de acordo com a norma ASTM E1259.

b) avaliar a degradação de ésteres de ácidos graxos após o estabelecimento de comunidades microbianas na interface óleo água em microcosmos com biodiesel (B100) e diferentes misturas de diesel e biodiesel (B5, B10 e B50), a partir do combustível como recebido da distribuidora.

c) avaliar a degradação de alcanos após o estabelecimento de comunidades microbianas na interface óleo água em microcosmos com biodiesel (B100) e diferentes misturas de diesel e biodiesel (B5, B10 e B50), e diesel puro a partir do combustível contaminado com inóculo de acordo com a norma ASTM E1259.

d) identificar, quanto à diversidade e composição, a comunidade microbiana formada em microcosmos contendo a mistura B10, a partir do combustível como recebido da distribuidora e quando contaminado com inóculo, de acordo com a norma ASTM E1259.

e) avaliar a efetividade do biocida MBO (3,3'-methylene bis (5-methyloxazolidine) no controle da população microbiana, e caracterizar a diversidade e a composição da comunidade microbiana após sua adição ao combustível.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Combustíveis

Na última década, têm-se observado mudanças significativas em relação ao uso exclusivo de combustíveis derivados do petróleo, pelo uso de combustíveis derivados de fontes renováveis de energia. Estes, chamados de biocombustíveis, são alternativas viáveis para uso como aditivo ou substituto para a base de petróleo diesel (D'Agosto et al., 2015).

O óleo diesel e o biodiesel apresentam um importante papel na matriz energética brasileira, pois impulsionam vários setores no Brasil. São os combustíveis usados para o transporte de diferentes produtos (industriais e agrícolas) no segmento rodoviário, ferroviário e marítimo, desde a produção até a distribuição ao mercado consumidor. Este mercado mantém-se em crescimento constante, segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP) verificou-se um aumento de 4,63% na distribuição diesel/biodiesel no ano de 2013, em relação a 2012, para a frota nacional de ônibus, caminhões, entre outros veículos que utilizam este combustível (ANP, 2014). Conforme se pode visualizar na FIGURA 1, o consumo de diesel e biodiesel representou, em 2014, 51,4% de todo combustível consumido no Brasil (ANP, 2014)

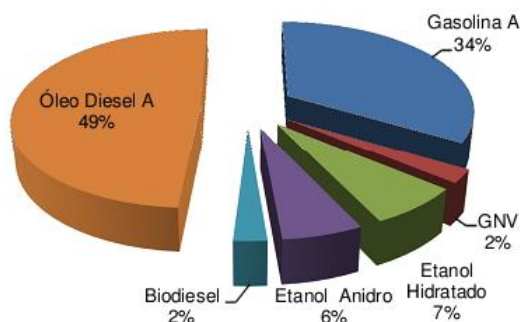


FIGURA 1: Percentuais de combustíveis consumidos no Brasil calculados sobre volumes convertidos em toneladas equivalentes de petróleo, em 2014, no Brasil (ANP, 2014).

No Brasil o uso do biodiesel, derivado de plantas oleaginosas e de gordura animal, tornou-se obrigatório com a Lei 11.097/2005. Esta lei determinou a introdução compulsória do biodiesel à matriz energética brasileira, estabelecendo que a partir de Janeiro de 2008, a adição de 2% de biodiesel ao óleo diesel comercializado em qualquer parte do território nacional, seria obrigatória. A partir de 1º de Julho de 2008, a mistura do biocombustível no diesel passou a ser de 3%, sendo denominado B3.

As bases do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel apresentam a Lei 11.097, de 13 de Janeiro de 2005, fixaram que a partir de 2013, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado deveria ser de 5% (B5). No entanto, com o intuito de fortalecer o Programa e impulsionar o setor de produção de biodiesel no Brasil, a mistura B5 passou a ser vigente em Janeiro de 2010. Em linhas gerais, esse programa tinha como objetivos reduzir a dependência do petróleo; expandir os mercados das oleaginosas; impulsionar a demanda por combustíveis alternativos; e, reduzir a emissão de gases poluentes (Mattei, 2010).

Em 2014, estima-se que cerca de 11,2 milhões de toneladas de oleaginosas tenham sido transformadas em óleo e, posteriormente, em combustível limpo. Com o aumento do volume de biodiesel na mistura com diesel, de 5% para 7%, em novembro de 2014 as usinas passaram utilizar cerca de 15,7 milhões de toneladas de oleaginosas, a partir de 2015 (ANP, 2014).

Além dos investimentos que estão sendo aplicados na cadeia do biodiesel, que envolve desde a produção até a distribuição do combustível ao consumidor, com o objetivo de prover ao mercado nacional um biodiesel de qualidade, vêm ocorrendo mudanças no diesel de petróleo comercializado no Brasil. A pressão da sociedade sobre o uso de tecnologias e produtos que visam a sustentabilidade, na tentativa de minimizar impactos nocivos do uso de combustíveis ao ambiente, acarretou também em mudanças sobre o óleo diesel puro. Em Janeiro de 2013, o diesel S50 (com 50ppm de enxofre) passou a estar disponível no mercado nacional, e foi integralmente substituído pelo diesel S10, contendo no máximo 10 ppm de enxofre, de acordo com a Resolução ANP nº 65/2011. A partir de 1º de Janeiro de 2014, os óleos diesel A S-1800 e B S-1800 passaram a não serem mais comercializados como óleo diesel de uso rodoviário. O óleo diesel S-500 vinha substituindo o S-1800 (antigo óleo diesel interior) foi completamente eliminado do segmento rodoviário no final de 2013 (ANP, 2014).

2.1.1 Diesel

A composição do diesel é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, devido ao processo de destilação fracionada, empregado durante o refino do petróleo. No óleo diesel são encontradas moléculas que variam de 9 a 20 carbonos (C_9 a C_{20}), incluindo alcanos lineares e ramificados, derivados de ciclo-alcanos, benzeno, policíclicos aromáticos, parafinas, oleofinas, isoprenóides e nafta. De uma forma geral, aproximadamente 40% são compostos alifáticos e ciclo alcanos, enquanto 22% são hidrocarbonetos mono ou di aromáticos. Também o compõem, em pequenas quantidades, substâncias contendo enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio (Ward et al., 2009; Das & Chandran, 2011).

2.1.2 Biodiesel

A conscientização da população em relação a sustentabilidade tem promovido e estimulado pesquisas com o uso de fontes alternativas de energia. O biodiesel é uma alternativa interessante em relação ao óleo diesel, pois é considerado menos tóxico e mais facilmente degradável (Passman, 2013; Pullen & Saeed, 2014; Cremonez et al., 2015). Além disso, pode substituir o diesel em diferentes aplicações, como motores de combustão interna e caldeiras sem requerer grandes modificações e sem acarretar na diminuição do desempenho do equipamento; sua combustão não resulta em emissão de sulfatos, compostos aromáticos, liberação de dióxido de carbono; há uma diminuição na emissão de monóxido de carbono e substâncias particuladas, na

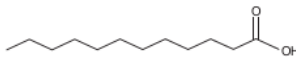
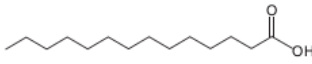
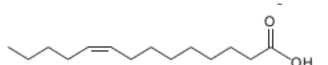
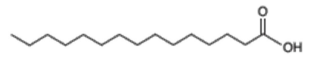
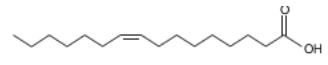

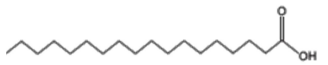
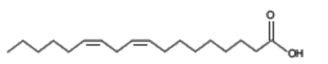
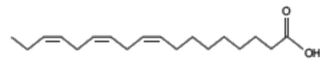
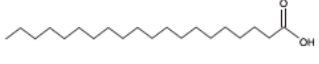
emissão de compostos orgânicos voláteis, bem como de outras substâncias nocivas ao ambiente (Passman & Dobranic, 2005; Atabani et al., 2012; Peng et al., 2012; Salvi & Panwar, 2012; Yaakob et al., 2014 ; Jakeria et al., 2014).

Embora Rudolf Diesel tenha previsto o uso de óleos de origem vegetal em motores de combustão em meados de 1900, a exploração de matérias-primas, que pudessem resultar em biodiesel, iniciou-se apenas na década de 1980 (Salvi & Panwar, 2012). O interesse surgiu na procura por fontes de energias que resultasse na redução da emissão de gases do efeito estufa, bem como, na procura em alternativas aos combustíveis de origem fóssil. No Brasil, a implantação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, regulamentado pela Lei 11.097, de 13 de Janeiro de que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira (ANP, 2014).

O biodiesel é definido como uma composição de alquil ou metil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa. Os ácidos graxos frequentemente encontrados no biodiesel constam na TABELA 2. Os ácidos graxos presentes em um determinado biodiesel dependem do tipo de óleo vegetal ou do tipo de gordura animal utilizado em seu processo de produção. De uma forma geral, os ácidos graxos que compõem o biodiesel proveniente de óleos vegetais são: ácido palmítico (16:0), ácido esterárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2) e ácido linolênico (18:3) (Hoekman et al., 2012). De acordo com a literatura, o perfil de ácidos graxos de óleos vegetais é dominado basicamente por 5 ácidos graxos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3) (Hoekman et al., 2012; Serqueira et al., 2014). O óleo proveniente de gordura animal é composto principalmente

pelos ácidos graxos: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1) (Cunha et al., 2009; Hoekman et al., 2012; Cunha, 2013). No Brasil, o uso majoritário da soja na produção do biocombustível corresponde cerca 80% da matéria prima utilizada (Cesar et al., 2013).

TABELA 2: Principais ácidos graxos que compõem o biodiesel.

Nome comum	Nome Formal	Abreviação	Fórmula Molecular	Estrutura Molecular
Ácido Láurico	Ácido Dodecanóico	12:0	$C_{12}H_{24}O_2$	
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	$C_{14}H_{28}O_2$	
Ácido miristiloléico	Ácido <i>cis</i> -9-tetradecenoico	14:1	$C_{14}H_{26}O_2$	
Ácido Palmítico	Ácido hexadecanoico	16:0	$C_{16}H_{32}O_2$	
Ácido Palmitoleico	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecanoico	16:1	$C_{16}H_{30}O_2$	
Ácido Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	$C_{18}H_{36}O_2$	
Ácido Oléico	Ácido <i>cis</i> -9-Octadecenoico	18:1	$C_{18}H_{34}O_2$	
Ácido Linoléico	Ácido <i>cis</i> -9,12-Octadecadienoico	18:2	$C_{18}H_{32}O_2$	
Ácido Linolênico	Ácido <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3	$C_{18}H_{30}O_2$	
Ácido Araquidônico	Ácido Eicosanóico	20:0	$C_{20}H_{40}O_2$	

Adaptado: (Hoekman et al., 2012).

No Brasil, o uso majoritário da soja na produção do biocombustível corresponde cerca 80% da matéria prima utilizada (Cesar et al., 2013). Na FIGURA 2, são apresentadas as potenciais fontes de matéria primas para

uso na produção de biodiesel, de acordo com a vocação de cada região brasileira.

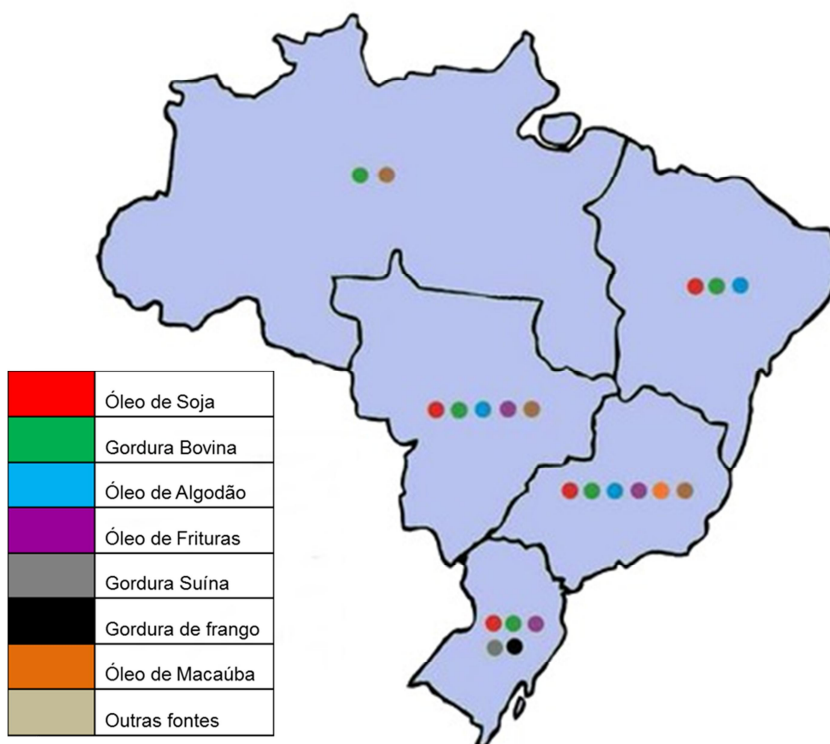


FIGURA 2: Fontes de matéria primas renováveis para uso na produção de biodiesel no Brasil, de acordo com a vocação de cada região brasileira.

2.2 Biodeterioração de combustíveis

A biodeterioração está associada a perda de valor comercial do combustível (Passman, 2013). Um dos primeiros relatos sobre a biodeterioração de combustíveis datam do final do XIV, em que o crescimento do fungo *Botrytis cinerea*, em constituintes fracionamento do óleo cru (Myoshe, 1895), citado por Schwartz & Leathen (1976). A oxidação bacteriana foi evidenciada em gasolina e querosene por Sohngen, em 1915, citado por Videla (1981).

A partir da década de 40, em função da substituição da gasolina pelo querosene na aviação, começaram a surgir trabalhos de investigação principalmente sobre a origem e composição biológica dos sedimentos formados durante a estocagem dos combustíveis. As primeiras referências sobre a relação da corrosão e a presença de microrganismos em combustíveis datam do final da década de 50. No Brasil, a primeira referência de investigação da natureza dos sedimentos, foi com o isolamento do fungo *Cladosporium resinae* em tanques de querosene (Gutheil, 1966).

2.3 Fatores determinantes para a contaminação microbiana de diesel e biodiesel

A contaminação microbiana durante o armazenamento de óleo diesel, biodiesel e das misturas de diesel/biodiesel tem sido avaliada e documentada. Com a introdução de biodiesel tem-se verificado uma maior suscetibilidade da nova mistura (diesel e biodiesel), devido a um aumento na geração de sedimentos biológicos (Bento et al., 2005; DeMello et al., 2007; Aktas et al., 2010, Lee et al., 2010; Cyplik et al., 2011; Sørensen et al., 2011; Zimmer et al., 2013; Cazarolli et al., 2013; Passman, 2013).

O desenvolvimento dos microrganismos em qualquer condição de armazenamento depende de algumas condições que venham a favorecer seu crescimento. Neste sentido, os fatores limitantes ao desenvolvimento microbiano são (essencialmente): a presença de água; e, uma população microbiana que apresente competência enzimática para utilizar o diesel e o biodiesel como fonte de carbono e energia (Passman, 2013). Além dos dois

fatores citados, a formação de sedimentos biológicos está relacionada a concentrações mínimas de nutrientes essenciais (fósforo, potássio, magnésio e outros microelementos) ao metabolismo microbiano, que podem ser providos pelo próprio combustível

A presença de água é fundamental para a atividade microbiana, sendo que apenas 1% de água é suficiente para desencadear o início do desenvolvimento microrganismos (Gaylarde et al., 1999). De acordo com a legislação vigente para a área de combustíveis (Resolução ANP Nº 14, DE 11.5.2012) para que biodiesel esteja dentro das especificações, o volume máximo de água que pode apresentar é de 2mg.Kg^{-1} , no diesel este limite é de 5 mg.Kg^{-1} . A origem da água em um tanque de estocagem pode estar relacionada ao transporte do combustível, penetrando no sistema durante operações de carga e descarga, entrando através de sistema de ventilação imprópria, ou com vedação deficiente, e através da condensação das gotículas de água do ar. Em decorrência do crescimento microbiano, há liberação de água pelas reações metabólicas (Gaylarde et al., 1999; Robbins & Levy, 2005; Passman, 2013). Fatores como oxigênio, temperatura e pH também influenciam o processo, podendo favorecer o desenvolvimento de certos microrganismos em detrimento de outros, em decorrência do metabolismo desenvolvido de acordo com as limitações do ambiente (Passman, 2003). A presença de oxigênio é requerida para o crescimento de microrganismos aeróbios, para a biossíntese de compostos celulares, respiração celular e produção de ATP (Madigan, 2012). O oxigênio, no tanque de armazenamento, pode estar dissolvido no combustível, na água de lastro e estar presente na

parte mais superior do tanque (Robbins & Levy, 2005). Outros microrganismos, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS), crescem somente em condições anaeróbias, ou seja, somente são capazes de sintetizar energia (ATP) na ausência de oxigênio, e depende de aceptores de elétrons como o SO_4^{2-} (Madigan, 2012). Ambientes anaeróbios no tanque podem ser visualizados em biofilmes formados na interface óleo-agua de lastro, nas paredes do tanque, ou mesmo quando o oxigênio dissolvido na água de lastro e no combustível for consumido pela população aeróbia (Passman, 2013; Robbins & Levy, 2005). Para que o processo de biodegradação se estabeleça é necessária a presença de microrganismos com a capacidade de utilizar o diesel e/ou biodiesel como fonte de carbono. A população microbiana com competência para degradá-los pode entrar no sistema através do sistema de ventilação ou de bombeamento, pois são microrganismos presentes tanto no ar, como no solo e na água (Bento et al., 2005; Robbins & Levy, 2005; Yemashova et al., 2007; Passman, 2013).

2.3.1 Suscetibilidade do diesel e biodiesel à degradação abiótica

Entre muitas propriedades, a estabilidade dos combustíveis é relativamente importante e é utilizada como critério de qualidade (Yaakob et al., 2014). Processos como hidrólise na presença de água de lastro ou pela água dissolvida no combustível (Strömberg et al., 2013); a oxidação, na presença de oxigênio (aerobiose)(Yaakob et al., 2014), decomposição térmica por excesso de calor (Singer & Rühle, 2014), oxidação na presença de luz (foto-oxidação)(Khoury et al., 2011) e a contaminação do por impurezas aumentam a

instabilidade e podem provocar mudanças consideráveis nas propriedades do combustível. Assim, durante o armazenamento do diesel, do biodiesel e das misturas ocorre a formação de depósitos químicos, goma, o escurecimento do combustível resultado da formação de contaminantes como álcoois, ácidos, aldeídos e peróxidos por processos de degradação abiótica (Yaakob et al., 2014).

O biodiesel apresenta uma grande afinidade com água, esta propriedade higroscópica do produto eleva consideravelmente seu teor de água simplesmente ao entrar em contato com a umidade do ar (Jakeria et al., 2014). Burton (2008) verificou que o biodiesel pode absorver 150 ppm de umidade, enquanto que o diesel puro pode absorver 50 ppm de umidade. A presença de água dissolvida no combustível não pode ultrapassar 0,05%, de acordo com as normas estabelecidas pela ASTM D6751. Sua presença, bem como a água livre no fundo do tanque pode levar a degradação dos ésteres de ácido graxos por hidrólise, levando a mudanças na composição e nas propriedades do combustível (Jakeria et al., 2014).

Estudos e revisões da literatura vêm mostrando que processos de degradação abiótica se acentuam na presença do biodiesel, cuja estabilidade é menor quando comparado ao diesel de petróleo. A presença de cadeiras insaturadas no biodiesel e a presença de grupos carbonila são os principais fatores que tornam o biodiesel mais suscetível a degradação abiótica e a oxidação, quando comparado ao diesel (Jain & Sharma, 2010; Karavalakis et al., 2010; Thompson et al., 2013; Yaakob et al., 2014; Yassine et al., 2013 Pullen & Saeed, 2014). Os processos de degradação descritos podem ser

ativados por fotólise (foto-oxidação), e fatores como calor, umidade, ar atmosférico e presença de metais também podem desencadear a dinâmica oxidativa.

A hidrólise está diretamente relacionada à presença de água e a quebra das ligações éster, enquanto a degradação por oxidação está relacionada a uma complexa cadeia de reações que envolvem a quebra das ligações duplas dos ésteres de ácidos graxos.

A oxidação do biodiesel está relacionada às insaturações das cadeias dos ácidos graxos, pois a presença de ligações duplas na molécula proporciona elevado grau de reatividade com O_2 , especialmente, quando em contato com o ar ou água. Os produtos da oxidação primária das duplas ligações são hidroperóxidos instáveis; estes, devido a sua instabilidade podem dar continuidade ao processo oxidativo, gerando uma variedade de produtos de uma oxidação secundária. Estas etapas incluem o rearranjo do produto de pesos moleculares semelhantes originando aldeídos de cadeia curta, compostos ácidos e outros materiais de alto peso molecular (Jain & Sharma, 2010). As taxas de oxidação podem ocorrer na seguinte ordem: linolenato (C18:2)>linoleato (C18:1)>oleato(C18:0) (Singh et al., 2012; Yaakob et al., 2014). Uma das consequências da oxidação é o aumento da viscosidade do biodiesel, resultado de reações de condensação envolvendo as duplas ligações, e que leva a formação de gomas e sedimentos, acarretando o entupimento de filtros e sistemas de injeção (Knothe, 2010; Yaakob et al., 2014).

Algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a resistência à degradação oxidativa como a aplicação de antioxidantes (Pullen & Saeed, 2014; Yaakob et al., 2014; Sorate & Bhale, 2015). O uso, por exemplo, de antioxidantes efetivos pode aumentar a estabilidade do biodiesel de soja, assim, antioxidantes sintéticos como o *tert* – butyl hydroxyquinone (BHT) butylated hydroxytoluene (TBHQ), butylated hydroxyanisole (BHA), e propylgallate (PG) foram testados como forma de evitar a oxidação em biodiesel proveniente de diferentes oleaginosas e de gordura animal apresentando potencial estabilizador (Jain & Sharma, 2013; Pullen & Saeed, 2014; Fattah et al., 2014; Serqueira et al., 2014).

Atualmente a produção de combustíveis modernos, com alto padrão é alcançada pela adição de produtos como os aditivos. Os aditivos são compostos por uma grande variedade de compostos puramente orgânicos, com a exceção de agentes antiespumantes. Os aditivos têm como características: melhorar o fluxo, evitar a sedimentação de cristais a baixas temperaturas; melhorar a ignição, bem como o desempenho de combustão; previnem o desgaste prematuro dos bicos injetores e bombas; possuem agentes anti-espuma, possuem compostos detergentes que mantêm bicos injetores e do combustível limpos; possuem compostos anti-corrosão que protegem os sistemas de combustível; antioxidantes e desativadores de metais pesados, que melhoram a estabilidade durante o armazenamento de combustíveis (Hagenow et al., 2010).

O uso de aditivos, no combustível diesel, com características emulsificantes, pode promover a dispersão do material biológico (biofilmes)

aderido nas paredes dos tanques. Esta remoção pode levar a um aumento na frequência de troca de filtros devido a maior saturação provocada pela quantidade de particulados em suspensão no óleo (Batts & Fathoni, 1991). A dispersão do material aderido leva a uma maior exposição dos equipamentos metálicos, tornando-os mais suscetíveis ao processo de corrosão e também disponibilizando mais material orgânico aos microrganismos de um sistema contaminado. Por outro lado, a remoção do biofilme protege o material metálico dos agentes e do processo corrosivo que é causado pela instalação desta película biológica.

2.3.2 Suscetibilidade do diesel e do biodiesel a biodegradação

Devido a importância do diesel e do biodiesel no cenário mundial, como apresentado anteriormente, estudos vêm sendo desenvolvidos de modo a avaliar a suscetibilidade destes combustíveis a biodegradação. Uma vantagem do biodiesel (do ponto de vista ambiental), em relação ao diesel de petróleo, é a sua maior biodegradabilidade, que estaria relacionada à ausência de moléculas aromáticas, disponibilidade de pontes éster de alta energia, e às propriedades higroscópicas (Passman & Dobranic, 2005; Passman, 2013). No entanto esta biodegradabilidade também o torna mais suscetível à contaminação microbiana, quando comparado aos combustíveis fósseis, durante o período de armazenamento.

A capacidade dos fungos *Hormoconis resiniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida silvicola* em se desenvolver em diesel metropolitano e meio mineral Bushnell-Haas foi avaliada por Bento et al. (2005). Os

autores constataram que *Aspergillus fumigatus* degradou as cadeias C₁₁-C₁₃ de hidrocarbontos alifáticos, bem como observaram a produção de metabólitos associados à corrosão de tanques.

O primeiro estudo sobre biodegradabilidade de biodiesel, comparando-o ao diesel puro, foi realizado por Zhang et al. (1998), em ambiente aquático, os autores observaram o cometabolismo na biodegradação de misturas de diesel e biodiesel, na presença de ésteres de ácidos graxos, a taxa de degradação do diesel aumentou três vezes, quando comparada a tratamentos, em que o diesel era a única fonte de carbono. DeMello et al. (2007) compararam a velocidade de degradação entre 100% de diesel fóssil e 25% de biodiesel misturado ao diesel (B25), em um ambiente marinho, e verificaram que a degradação dos ésteres de ácidos graxos e dos alcanos ocorre simultaneamente, e mais rapidamente do que outros componentes do diesel.

Outros autores, como Pasqualino et al. (2006), relataram um aumento na biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel, a medida que mais biodiesel era adicionado. Além disso, sugeriram um efeito positivo na biodegradação das misturas, ou seja, o biodiesel, ao ser adicionado no diesel, aumentou a biodegradabilidade do diesel. Owsianiak et al. (2009) verificaram aumento de 26% na eficiência de biodegradação quando a fonte de carbono foi alterada, de diesel puro para biodiesel puro. Schleicher et al. (2009) verificaram um maior crescimento de microrganismos em misturas com 20% de biodiesel de soja, e 80% de diesel (B20), seguido pela mistura B5, e então por B100.

No Brasil, Bücken et al. (2011) avaliaram a suscetibilidade a biodegradação do diesel puro (B0), das misturas B5, B10 e B20, e de biodiesel puro (B100) por *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp, *Rhodotorula* sp. e *Candida silvicola* durante o armazenamento simulado, em microcosmos com meio mínimo mineral, durante 60 dias. Os autores verificaram que a biomassa formada pelos fungos aumentou com o aumento da adição de biodiesel ao diesel, quando comparadas ao diesel puro (B0).

Restrepo-Flórez et al. (2013) simularam uma condição de armazenamento para avaliar o efeito do biodiesel, nas concentrações de 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, sobre a população microbiana, utilizando um meio mineral e água de lastro como fase aquosa nos tratamentos. Os autores avaliaram o crescimento microbiano pelo aumento da absorbância na fase aquosa durante 200 dias. Os resultados indicaram que não houve diferenças estatisticamente significativas no crescimento durante os primeiros 100 dias de experimento. Aos 200 dias, um crescimento microbiano significativo foi verificado nas amostras contendo apenas biodiesel como fonte de carbono.

Os estudos citados acima mostram e ratificam a hipótese de que o biodiesel, e suas misturas com diesel são mais suscetíveis à contaminação microbiana do que o diesel de petróleo. Conseqüentemente, com o crescente consumo deste combustível a nível mundial, tendem a se acentuar os problemas relacionados a biodeterioração (Passman, 2013).

2.3.3 Biodegradação do diesel e do biodiesel

Os mecanismos de biodegradação de produtos derivados do petróleo, bem como do óleo cru, podem ocorrer em condições aeróbias e anaeróbias. Nas condições aeróbias se observa uma degradação mais rápida e completa da maioria dos compostos orgânicos. O ataque intracelular inicial de compostos orgânicos em um processo oxidativo, envolve a ativação e a incorporação do oxigênio, é a reação enzimática chave catalisada por oxigenases e peroxidases (Das & Chandran, 2011).

Estudos sobre a biodegradação de produtos derivados do petróleo indicam que os hidrocarbonetos do petróleo são degradados sequencialmente, na ordem: n-alcanos, alcanos monocíclicos, alquilbenzenos, alcanos isopropenóides, alquilnaftalenos, alcanos bicíclicos, esteranos e hopanos (Van Hamme et al., 2003)

A degradação dos hidrocarbonetos é mediada por enzimas específicas (FIGURA 3 a, b), dependendo dos microrganismos presentes (TABELA 3). A biodegradação dos n-alcanos inicia pela porção terminal do grupo metil, resultando em um álcool primário, seguido de um aldeído e um ácido carboxílico. O ácido carboxílico é degradado via β -oxidação com a formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e a formação de acetil-coenzima A, com liberação eventual de CO_2 . Vias de degradação periféricas convertem os compostos orgânicos, passo a passo, em intermediários do metabolismo central (por exemplo, o ciclo ácido tricarboxílico). A síntese da biomassa celular ocorre a partir de precursores metabólicos provenientes do metabolismo central, como o acetil- CoA, succinato, piruvato; e os açúcares

requeridos para a biossíntese e crescimento são sintetizados via gliconeogênese (Madigan, 2012).

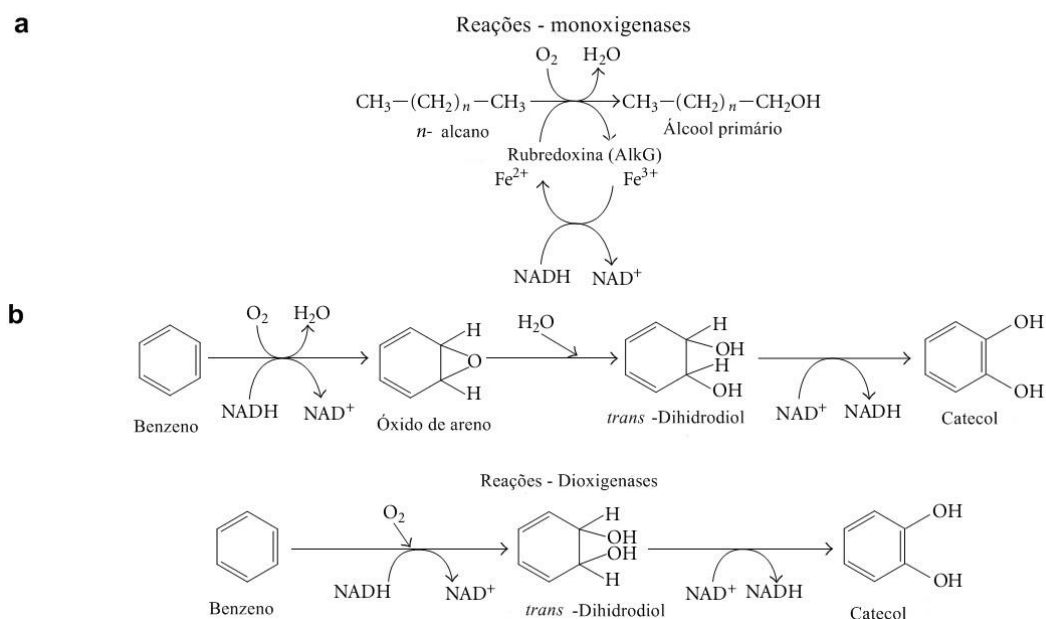


FIGURA 3: Reações enzimáticas envolvidas no processo de degradação de hidrocarbonetos. a) Degradação da fração alifática, exemplo *n*-alcanos. b) Etapas metabólicas básicas da degradação de hidrocarbonetos aromáticos, exemplo benzeno. (Fonte: Das & Chandran, 2011).

TABELA 3: Enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos (C_9 a C_{20}) componentes do óleo diesel (Adaptado de: Das & Chandran, 2011).

Enzima	Substrato	Microrganismos
Alk B Alcano Hidroxilase	C_5 - C_{16} alcanos, ácidos graxos, alquil benzenos, cicloalcanos	<i>Pseudomonas</i> sp <i>Burkholderia</i> sp <i>Rhodococcus</i> sp <i>Mycobacterium</i> sp
P450 de eucariotos	C_{10} - C_{16} alcanos, ácidos graxos	<i>Candida maltosa</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
Sistema de oxigenases P450 em bactérias	C_5 - C_{16} alcanos, cicloalcanos	<i>Acinetobacter</i> sp <i>Caulobacter</i> sp <i>Mycobacterium</i> sp
Dioxigenases	C_{10} - C_{30} alcanos	<i>Acinetobacter</i> sp

Os componentes do óleo diesel como o benzeno, n- alcanos, alcanos ramificados podem ser metabolizados em condições anaeróbias. Em condições anaeróbias, a degradação anaeróbia de alguns hidrocarbonetos já foi verificada sob condições nitrato redutoras, Fe (III) redutoras, sulfato redutoras e metanogênicas (Van Hamme et al., 2003).

Em geral, dois mecanismos de ativação tanto para os alcanos quanto para aromáticos têm sido propostos: o primeiro envolve a ativação do carbono subterminal do hidrocarboneto e adição de fumarato; e, no segundo mecanismo, o hidrocarboneto é carboxilado na posição C3 (FIGURA 4). Quando a biodegradação ocorre através do primeiro mecanismo de ativação, o hidrocarboneto é adicionado à dupla ligação do fumarato via átomo de carbono subterminal gerando ácidos graxos lineares e ramificados e succinatos. No segundo mecanismo ocorre formação apenas de ácidos graxos lineares (Van Hamme et al., 2003). A biodegradação de combustíveis como o biodiesel (constituído por ésteres de ácidos graxos) depende da ação de enzimas como as esterases (carboxylic-ester hydrolases; EC 3.1.1.1) e lipases (triacylglycerol acylhydrolases; EC 3.1.1.3). As esterases (EC 3.1.1.1) apresentam capacidade de hidrolisar ésteres solúveis em água, incluindo triglicerídeos de cadeia curta; acarretando na formação de ácidos carboxílicos e álcoois correspondentes.

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar triglicerídeos não solúveis, compostos por ácidos graxos de cadeia longa, presentes em ésteres insolúveis em água (TAG). Como resultado da atividade das lipases há a liberação de ácidos graxos livres e glicerol. Os ácidos graxos liberados podem ser utilizados pela via β -oxidativa. Na FIGURA 5 estão

indicados três locais possíveis em que lipases ou esterases podem atuar em moléculas de ácidos graxos (Godoy et al., 2012).

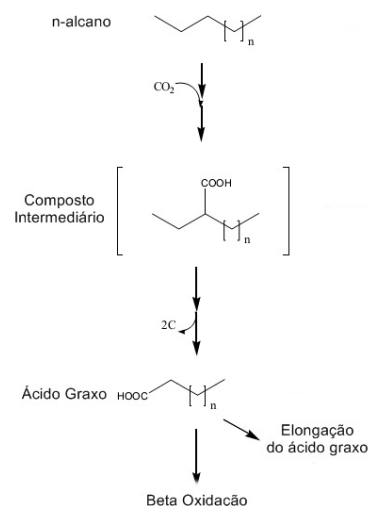


FIGURA 4: Provável rota metabólica associada à biodegradação anaeróbia de n-alcenos via adição de um carbono (carboxilação subterminal ao C3)(Fonte: (So et al., 2003).

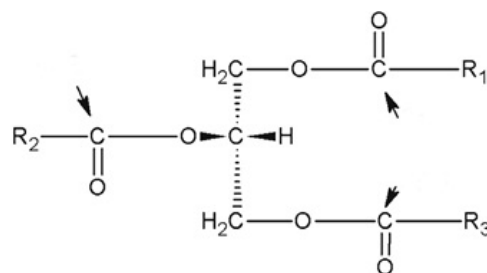


FIGURA 5: As setas indicam a ligações ésteres do biodiesel possivelmente hidrolisadas por lipases ou esterases (Godoy et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos no processo de biodegradação do biodiesel durante o armazenamento, e as vias pelas quais os compostos são utilizados, e quais ácidos graxos são degradados preferencialmente, constituem questões que permanecem pouco elucidadas. Uma provável rota

para a biodegradação do biodiesel consiste primeiramente da hidrólise do metil ou etil éster por uma esterase (ou lipase) produzindo um ácido graxo e um álcool (FIGURA 6)(Nelson, 2001; Hausmann & Jaeger, 2010). Na segunda etapa, os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação e degradados a ácido acético e a um ácido graxo com dois carbonos a menos. Nesta reação, ocorre a conversão do ácido graxo a éster coenzima A (CoA). A seguir, o éster-CoA é oxidado na posição beta, e dois átomos de carbono do final da molécula são clivados para produzir a acetil-CoA.

Este processo de encurtamento da molécula continua até o ácido inicial ser degradado completamente a acetil-CoA. Assim, por exemplo, o ácido linoléico, um ácido graxo de 18 carbonos, sofrerá oito reações oxidativas, perdendo em cada uma delas dois átomos de carbono na forma de acetil-Coa.. Quando os ácidos graxos apresentam duplas ligações (C18:2, ou C18:1, por exemplo), a β -oxidação é interrompida, pois duas reações adicionais são requeridas, a fim de converter a dupla ligação em uma ligação simples, e então é dada continuidade a β -oxidação.

Quando a cadeia de ácidos graxos for ímpar, o produto final da β -oxidação será o propionil-CoA, e este, ao incorporar de CO_2 e consumir ATP, se transforma em succinil-CoA, que é um composto do Ciclo de Krebs. Os compostos do Ciclo de Krebs podem ser utilizados no metabolismo para a síntese de biomassa celular, por exemplo (Zhang et al., 1998; Nelson, 2001; Hausmann & Jaeger, 2010; Houry et al., 2011; Madigan, 2012).

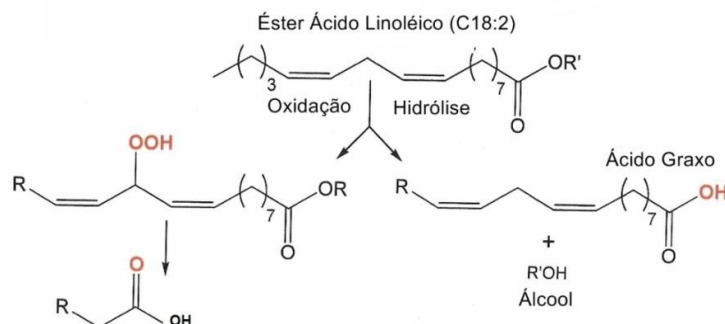


FIGURA 6: Processo de hidrólise de um éster de ácido graxo, produzindo um álcool e um ácido graxo. (Fonte: Cooper, 2000).

2.4 Comunidades microbianas associadas ao armazenamento de diesel e biodiesel

Estudos sobre a contaminação microbiana, em tanques de armazenamento de combustíveis são tradicionalmente conduzidos utilizando-se técnicas baseadas no isolamento e cultivo de microrganismos. As várias etapas para a detecção da contaminação microbiana em um sistema de combustível podem ser encontradas em Manuais como o publicado pela ASTM “Standard Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems” (ASTM 6469 2011 a). A abordagem clássica com tradicionais técnicas de bioprospecção pode resultar em uma subestimativa da diversidade microbiana contaminante do combustível ou não identificar grande parte das espécies constituintes da população nestes locais. Neste sentido, o uso de ferramentas moleculares que tenham por objetivo acessar a comunidade microbiana, independente do cultivo de microrganismos, têm se mostrado uma alternativa às tradicionais técnicas, uma vez que permite a caracterização de

comunidades microbianas complexas, de ambientes diversificados, e de microrganismos que ainda foram sendo isolados e identificados.

2.4.1 Caracterização da comunidade microbiana por métodos dependentes de cultivo

De acordo com o Manual “Standard Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems” (ASTM 6469 2011 a), a detecção da contaminação microbiana durante o armazenamento, deveria ser realizada a partir da diluição seriada da amostra (água de lastro ou do combustível), inoculação em meios de cultura seletivos para bactéria e fungos (Plate Count Agar e Ágar malte, por exemplo), e a contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs). A partir do crescimento bacteriano, poderiam ser isoladas colônias para posterior cultivo e identificação.

Outra metodologia sugerida por Robbins & Levy, (2005) e por Hill & Hill (2009) é o uso de laminocultivos. Os laminocultivos representam uma técnica rápida que pode ser utilizada para avaliar o grau da contaminação microbiana a partir da análise direta do combustível no tanque de armazenamento. Os laminocultivos são fabricados em companhias de todo o mundo e utilizados para análise da água livre formada no fundo do tanque de armazenagem e são também adequadas para testar e examinar a eficiência de biocidas e supressores de corrosão e biodeterioração de óleos e combustíveis. De uma forma geral, os laminocultivos são fabricados com meios de cultura específicos para o grupo microbiano de interesse, alguns laminocultivos contém o meio “Plate Count Agar” (PCA) com o indicador redox cloreto de

trifenil-tetrazólio (TTC), em ambas as faces, propiciando o desenvolvimento de diferentes bactérias e de fungos e leveduras. A incorporação do TTC visa permitir a visualização das colônias nas faces do laminocultivo, pois o indicador redox ao ser reduzido (oxidação microbiana devido ao crescimento) muda de cor de incolor para vermelho. Uma das desvantagens desta metodologia é o limite de sensibilidade para a contagem dos microrganismos, muitas vezes sendo necessária a diluição da amostra (água de lastro ou combustível).

A partir da técnica de isolamento e cultivo em placas com meio de cultura apropriados muitas espécies foram identificadas e determinadas como deteriorogênicas do combustível. Várias espécies de microrganismos aeróbios (bactérias, leveduras e fungos) já foram isoladas de sistema de estocagem de combustíveis. Entre as bactérias aeróbias temos os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Brachy bacterium*, *Sphingomonas*, *Gulosibacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Shewanella*, *Mangroveibacter*, *Halomonas*, *Aerococcus*, *Citrobacter*, *Delftia*, *Comamonas* (Bento & Gaylarde, 1996; Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003; Vieira et al., 2006; Chao et al., 2010; White et al., 2011). Leveduras e fungos filamentosos dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Hormoconis*, *Penicillium*, *Alternaria*, entre outros, já foram isolados de tanques de armazenamento (Gaylarde et al., 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003; Miranda et al., 2007). Bactérias anaeróbias são comumente relatadas como contaminantes, isolaram-se representantes dos gêneros *Desulfovibrio*,

Desulfotomaculum, *Desulfobulbus*, os quais pertencem ao grupo denominado Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)(Robbins & Levy, 2005).

2.4.2 Caracterização da comunidade microbiana por métodos independentes decultivo

Estudos sobre a diversidade microbiana utilizando métodos moleculares com alto poder discriminatório e com maior reprodutibilidade estão sendo utilizados no sequenciamento de microrganismos, a partir da extração do DNA total de amostras ambientais de interesse. A aplicação destes métodos vem causando grande impacto nos estudos sobre ecologia microbiana, e apresentam potencial para serem utilizados nos estudos sobre a microbiologia da contaminação de combustíveis. As abordagens moleculares independentes de cultivo estão sendo utilizadas em estudos da contaminação microbiana durante a estocagem de combustíveis. Entre eles pode-se citar a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (Lee et al., 2010; Sørensen et al., 2011; White et al., 2011); e técnicas de sequenciamento da última geração (White et al., 2011).

A técnica de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) tem como princípio os diferentes padrões de migração do gene amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseados na variação da composição de bases dentro do gene amplificado (Muyzer & Smalla, 1998). O produto amplificado tem a mesma massa, ou seja, mesmo número de pares de bases (pb). Os oligonucleotídeos iniciadores, delineados para DGGE, amplificam regiões de 200 pb a 500 pb. Os procedimentos para a realização do

DGGE envolvem a extração do DNA genômico, amplificação, por PCR, do gene de interesse, e eletroforese do produto amplificado em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear (uréia e formamida) que promove a desnaturação do DNA. Na extremidade 5' do oligonucleotídeo iniciador, na orientação sense, é acoplado um grampo de cerca de 30 a 50 bases G-C. A migração do produto amplificado, por eletroforese, do gradiente de menor grau de desnaturação para o gradiente de maior grau de desnaturação, causa a desnaturação do DNA em fitas simples. Assim, a completa desnaturação da dupla fita cessaria a migração. Mas, a presença do grampo G-C, incorporado a uma das extremidades, impede a completa desnaturação do produto amplificado. A mobilidade eletroforética do produto amplificado depende da relativa proporção de G-C e A-T. Cada banda presente no gel corresponde a uma única espécie de microrganismo. A técnica de DGGE tem sensibilidade para identificar diferenças nas sequências de apenas um nucleotídeo. As bandas podem ser excisadas do gel e sequenciadas para determinar sua associação filogenética a outros microrganismos (Muyser, 1993).

Técnicas de sequenciamento de última geração como a Solexa da Illumina e o sequenciamento por semicondutores da Ion Torrent tem um alto rendimento de sequências esuperam as limitações do método de sequenciamento Sanger (Sanger & Coulson, 1975; Shendure & Ji, 2008; Zhou et al., 2010).

O sequenciamento na plataforma Solexa (Illumina) adota uma estratégia similar ao sequenciamento de Sanger, em que há síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes

fluoróforos. A inovação dessa plataforma consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida e foi descrita por Fedurco et al. (2006) e Turcatti et al. (2008). O DNA a ser analisado é sujeito a um corte por hidrodinâmica, gerando fragmentos em torno de 800 pb. As extremidades destes fragmentos são ligadas a adaptadores.

Após a desnaturação, os fragmentos são imobilizados em uma superfície de clonagem (*flow cells*), por uma das extremidades. Os próprios adaptadores atuam como iniciadores da amplificação pela PCR dos fragmentos imobilizados no suporte. No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados por fluorescência são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma a estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorrem, formando a fita complementar também em “ponte”. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada.

Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo (Shendure & Ji, 2008; Zhou et al., 2010). Desde 2008, vem surgindo inovações a ajustes nesta técnica, entre elas Illumina HiSeq 2000 que apresenta um sistema de células com fluxo duplo, o que por sua vez aumenta a eficiência na geração dos dados.

Conforme Merriman et al. (2012) a tecnologia de *chips* semicondutores associado a plataformas de sequenciamento (Ion Torrent) tem

como conceito básico a realização do sequenciamento através da detecção eletroquímica de diferenças no pH para a síntese. A diferença básica nessa técnica seria a detenção da síntese por um sensor baseado em transistor, sem a utilização de nucleotídeos marcados. Os subprodutos químicos liberados na incorporação de nucleotídeos pela polimerase são, fundamentalmente, pirofosfato clivado (liberado após a incorporação de nucleotídeos) e a liberação de um íon de hidrogênio (H^+) após a incorporação do nucleotídeo na extremidade 3' OH da fita em síntese. Assim, um sensor capaz de detectar, tanto o pirofosfato ou quanto o H^+ liberados, seria um método de detecção dos nucleotídeos incorporados.

A técnica de DGGE vem sendo utilizada em estudos de diversidade microbiana e dinâmica de populações em combustíveis (como o diesel o biodiesel) contaminados, ou no monitoramento da contaminação de tanques de armazenamento dos mesmos. Lee et al. (2010) conduziram experimentos para avaliar a natureza e o grau da contaminação microbiana e seu potencial de corrosão, utilizando biodiesel (B100), diesel com teor ultra baixo de enxofre (ULSD), a mistura de ambos (B5 e B100), e diesel com alto teor de enxofre. As análises foram conduzidas com e sem a adição um inóculo, este constituído de lodo biológico proveniente de tanque de diesel. Os autores utilizaram a fase aquosa para extração de DNA, e posterior análise por PCR-DGGE. Após seis meses de análise, não detectaram os microrganismos do inóculo na comunidade, exceto uma levedura; além disso, constataram que os microrganismos da microbiota original do combustível eram as espécies dominantes ao final de seis meses.

Sorensen et al. (2011), conduziram experimentos com adição da água proveniente de um tanque de armazenamento como inóculo, a amostras de diesel puro (B0), e a misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B20, B50) e B100. A análise das mudanças na estrutura da comunidade microbiana presente na fase aquosa foram avaliadas pela técnica de DGGE, ao final de 41 dias de avaliação. A técnica de DGGE mostrou um perfil populacional similar entre B0 e B5, os quais foram distintos dos perfis em B10, B20, B50 e B100, indicando que a população presente em baixas concentrações de biodiesel é diferente da população em altas concentrações. Os autores verificaram que a comunidade microbiana, ao final do experimento, era distinta da comunidade inicial, indicando uma organização da população em função da mistura com maior ou menor teor de biodiesel. Os gêneros identificados, após excisar e re-amplificar e sequenciar as bandas do gel após migração em gel (técnica de DGGE) foram *Aerosphaera*, *Clostridium*, *Novosphingobium*, *Sphingobium* e *Brevundimonas*.

A abordagem molecular da diversidade microbiana utilizando pirosequenciamento 454, em tanques de combustível foi utilizada por White et al. (2011). Os autores utilizaram amostras de diesel e biodiesel automotivo contaminadas para realizar a extração de DNA genômico. O pirosequenciamento da região V6 do gene 16s rRNA mostrou a predominância de *Betaproteobacteria* (95.6%), sendo o gênero *Burkholderia* o mais abundante (80.7%); o segundo gênero mais abundante foi *Staphylococcus* (2.4%)

Técnicas complementares ao estudo da composição e estrutura da comunidade microbiana, que tenham como objetivo correlacionar à população

com a sua funcionalidade no ambiente, podem fornecer resultados a partir da análises de genes codificantes de enzimas chaves da fisiologia, ou do processo metabólico da biodegradação, de hidrocarbonetos e ésteres de ácidos graxos. Uma das técnicas que pode ser utilizadas é a PCR quantitativa (qPCR), baseada em uma aproximação matemática para a quantificar o número de cópias de um gene, na tentativa de determinar a abundância e relação funcional com os grupos microbianos presentes nas amostras do estudo (Liu et al., 2009; Schulz et al., 2010; Botes et al., 2013; Matsui et al., 2014). Em relação a tradicional técnica de PCR, uma das vantagens da técnica de qPCR está relacionada a inicial concentração de DNA. Neste caso, mesmo que o DNA esteja em baixíssimas concentrações, a técnica de qPCR pode determinar com acurácia e alta sensibilidade sua quantidade na amostra. Os resultados obtidos podem ser tanto qualitativos (mostrando a presença ou a ausência da sequência de DNA de interesse), quanto quantitativos. No entanto, para análises semiquantitativas, a técnica da PCR tradicional continua sendo a mais indicada (Navarro et al., 2015).

O desenho dos oligonucleotídeos indicadores é uma etapa muito importante na aplicabilidade da técnica de qPCR (Bustin et al., 2011; Lim et al., 2011). Entre os principais requisitos para um bom delineamento está a especificidade, tamanho (números de bases), conteúdo de bases GC, estabilidade da extremidade 3', complexidade de sequência e temperatura de anelamento. Além disso, deve-se levar em consideração a localização dos primers na sequência alvo, que influencia o tamanho do amplicon, a temperatura de anelamento e, conseqüentemente a eficiência da amplificação.

São elementos que devem ser levados em consideração para garantir que os objetivos ao utilizar a técnica venham a ser alcançados. Para auxiliar na construção dos oligonucleotídeos, ferramentas foram desenvolvidas para auxiliar no delineamento dos ensaios de qPCR e na análise de qualquer resultado para quantificação qPCR (Bustin et al., 2011; Lim et al., 2011).

Atualmente, a quantificação dos amplicons, nos sistemas de detecção pela técnica de qPCR, é frequentemente realizada utilizando o corante SYBR Green que se liga a a dupla fita do DNA, ou sondas mais específicas como a TaqMan (Zhang & Fang, 2006; Reitschuler et al., 2014). O uso do SYBR Green diminui o custo da técnica, quando comparado ao uso da sonda TaqMan. Além disso, os sistemas SYBR Green podem ser aplicados a qualquer par de oligonucleotídeos delineados, enquanto as sondas, como o sistema TaqMan, precisam que oligonucleotídeos específicos sejam adicionados a sequência (Reitschuler et al., 2014; Navarro et al., 2015).

O gene *alk B* pode ser utilizado como um marcador molecular para avaliar a abundância e a diversidade de grupos microbianos que biodegradam alcanos pela técnica de qPCR. A enzima transmembrana alcano monooxigenase (AlkB), faz parte de um sistema complexo de enzimas, denominado sistema Alk (Wang & Shao, 2013). Esta enzima transmembrana é codificada pelo gene *alk B* e está envolvida na ativação inicial do metabolismo de degradação aeróbia de hidrocarbonetos alifáticos, juntamente com dois cofatores denominados rubredoxina (*alkF*) e rubredoxina redutase (*alkG*) (Jurelevicius et al., 2013; Li et al., 2013; Wang & Shao, 2013). Estes cofatores são responsáveis pela transferência dos elétrons envolvido na hidroxilação desencadeada pela

enzima Alk B (Ward et al., 2009; Rojo, 2010; Das & Chandran, 2011; Jurelevicius et al., 2013; Matsui et al., 2014). Além de investigar genes específicos e relacionados ao metabolismo de molécula de interesse, é possível verificar a evolução e crescimento da comunidade em função do número de cópias do gene 16S rRNA para bactérias ou 18S rRNA para fungos e vem sendo utilizada para estimar o tamanho da população em combustíveis contaminados (Sufliya et al., 2012).

2.5 Consequências da contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis

Na maioria dos casos, os problemas relativos à contaminação microbiana especialmente no combustível diesel, somente são investigados quando começam a ocorrer danos nos equipamentos ou problemas com a corrosão dos tanques. Neste sentido, as principais consequências da contaminação microbiana têm sido classificadas em cinco categorias: (I) problemas físicos, causados pela presença da biomassa microbiana; (II) problemas decorrentes do metabolismo microbiano; (III) problemas causados por metabólitos microbianos; (IV) problemas causados pela formação de lodo biológico e químico; e, (V) a corrosão induzida por microrganismos (Robbins & Levy, 2005).

As consequências mais relevantes decorrentes da biomassa microbiana formada na interface óleo-água, ou em biofilme aderidos à parede do tanque, são a obstrução de filtros, tubulações e mangueiras (Robbins & Levy, 2005; Rajasekar et al., 2012). A biomassa pode bloquear pontos de

drenagem da água de lastro do tanque, contribuindo para o acúmulo do conteúdo de água no fundo (Passman, 2013).

Uma população microbiana com capacidade enzimática para utilizar o diesel e/ou biodiesel como fonte de carbono e energia, presente em um tanque de armazenamento, poderá acarretar em um produto com menor estabilidade química, degradado e indesejado pelo consumidor final (Bento & Gaylarde, 2001).

Metabólitos microbianos gerados pela atividade bacteriana como produtos poliméricos extracelulares, que se incorporam à biomassa na interface óleo-água; biossurfactantes, que causam a emulsão do hidrocarboneto na água e a migração da biomassa microbiana para a fase oleosa, podem aumentar a velocidade de biodegradação do combustível e podem interferir nas propriedades de combustão e de ignição (Bento & Gaylarde, 1996; Robbins & Levy, 2005). Muitas vezes, dependendo do grau de contaminação do tanque, pode-se observar o escurecimento da água presente no fundo dos tanques armazenadores, devido a precipitação do sulfeto de ferro, e com cheiro característico de ácido sulfídrico, devido à atividade de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato (Passman, 2003; Robbins & Levy, 2005).

A atividade microbiana no combustível contribui para o aumento da instabilidade química dos hidrocarbonetos, acelerando reações que produzem mais sedimentos de origem química (gomas), além do lodo biológico. Compostos presentes no lodo podem oxidar o combustível e degradá-lo (Robbins & Levy, 2005).

Os custos geralmente são altos para a desativação e recuperação de tanques armazenadores danificados pela corrosão, que pode ser induzida pela liberação de metabólitos microbianos como H_2S , SO_2 e CO_2 (Bento, 2001; Aktas et al., 2010; Stevenson et al., 2011; Sufliita et al., 2012; Lee et al., 2012).

As consequências de um combustível contaminado repercutem no funcionamento dos veículos, comprometendo o rendimento dos motores (saturação de filtros, desgaste de bicos injetores) (Bento, 2001; Passman, 2003). O combustível no tanque é aspirado pela bomba alimentadora, e levado aos filtros onde se processa uma filtração mais fina. Em seguida, chega à bomba injetora que faz a distribuição aos bicos injetores. (Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2005; Robbins & Levy, 2005; Sufliita et al., 2012; Passman, 2013; Jakeria et al., 2014; Bücken et al., 2014).

Além de ser combustível, o óleo diesel também exerce a função de lubrificar e resfriar partes da bomba injetora, retornando ao tanque com uma temperatura aproximada de 60 °C. Neste momento, o tanque exerce a função de dissipador de calor deste combustível. Se o combustível estiver contaminado com sólidos suspensos, ocorrerá o desgaste principalmente de bicos injetores, e com o desgaste ocorrerá um desequilíbrio no processo de alimentação do motor, ocasionando uma combustão incompleta do combustível. Como consequência forma-se fuligem, que por ser abrasiva, acelera o desgaste das peças do motor, abreviando sua vida útil. Além disso, aumenta o consumo de combustível e promove poluição (fumaça negra) (Bento & Gaylarde, 2001; Bento et al., 2005; Robbins & Levy, 2005; Sufliita et al., 2012; Passman, 2013; Jakeria et al., 2014; Bücken et al., 2014).

2.6 Métodos analíticos para análise do combustível

Métodos analíticos sensíveis e precisos como a cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas e espectroscopia da região do infravermelho são utilizadas para avaliar a composição do combustível. O uso destas metodologias de avaliação permite conhecer quais são os compostos (hidrocarbonetos e ou ésteres) presentes nos combustíveis e quais foram preferencialmente degradadas pelos microrganismos durante estudos com misturas do diesel com o biodiesel.

Entre as técnicas cromatográficas, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GCxMS) com monitoramento seletivo de íons permite a identificação dos ésteres na mistura biodiesel/diesel, porém sua quantificação fica prejudicada na mistura devido a presença dos hidrocarbonetos do diesel coeluídos na amostra (Chopra et al., 2011). Já a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) é uma técnica que permite a separação dos picos de acordo com dois critérios diferentes, quais sejam a massa molecular ou ponto de ebulição e a polaridade, permitindo a total separação de hidrocarbonetos e ésteres. É indicada para a análise de misturas complexas na qual duas separações independentes são aplicadas para cada amostra (Moraes et al., 2011).

Bento et al. (2005) avaliaram o crescimento dos fungos *Aspergillus fumigatus*, *Hormoconis resiniae* e *Candida silvicola* em meio mineral modificado Bushnell–Haas e óleo diesel. A degradação da fração oleosa por *Aspergillus fumigatus* foi avaliada por GC-MS. Foi comprovada a degradação

preferencial de frações na faixa de C_{11} a C_{13} do óleo diesel, reduzindo 47.7, 37.5 e 51% as cadeias C_{11} , C_{12} e C_{13} , respectivamente, ao final de 60 dias.

A biorremediação em microcosmos contendo solo da Floresta Atlântica e contaminados com misturas de diesel e biodiesel (B0, B5, B20, B50 e B100) foi avaliada por análises GC. Silva et al. (2012) verificaram que nos microcosmos contaminados com diesel (B0) e com B5 a biodegradação foi menor do que aquela observada nos solos contaminados com B20, B50 e B100 (80%, 62% e 84% de biodegradação, respectivamente).

Moraes et al. (2011) avaliaram o potencial da metodologia de GC×GC para a caracterização de amostras de biodiesel de sebo e a composição das misturas de diesel e biodiesel. Os autores utilizaram misturas B2 a B50. Os resultados obtidos permitiram a identificação e a quantificação dos ésteres do biodiesel, e a técnica foi sensível para a detecção da porcentagem das misturas estudadas. A pesquisa desenvolvida por Seeley et al. (2012) utilizando misturas com biodiesel de soja e de côco, utilizou a metodologia GC×GC, que permitiu caracterizar a concentração de cada éster de ácidos graxos em níveis mínimos (2 ppm) quando em mistura com diesel de petróleo.

Entre os métodos de espectroscopia, a espectroscopia do infravermelho (IV) permite uma determinação rápida e direta de várias propriedades sem um pré-tratamento da mesma, além disso, por ser uma técnica mais barata, o IV tem sido amplamente aplicado em quase todos os aspectos de controle de qualidade de biodiesel (Zhang, 2012). A técnica permite determinar o teor de biodiesel misturado ao diesel (Pimentel et al.,

2006), monitorar a reação de transesterificação na produção do biodiesel (Knothe, 2010) e analisar propriedades do biodiesel como o teor de ésteres na amostra. Além disso, esta técnica, pode ser utilizada para acompanhar o processo de biodegradação do combustível.

O uso de tecnologia da espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para determinar o conteúdo de ésteres no biodiesel bem como o conteúdo de metil ésteres de ácidos linolênicos (C18:3) em amostras de indústria e de escala laboratorial foi realizado Baptista et al. (2008). Os autores verificaram que esta técnica pode ser utilizada eficientemente para determinar a composição dos ésteres do biodiesel, pois além do C18:3, os pesquisadores elaboraram modelos de calibração multivariada para os seguintes ésteres de ácidos graxos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2).

O biodiesel é comumente utilizado em misturas com o diesel convencional derivado do petróleo. O teor da mistura varia de acordo com os países, sendo a adição de 5% de biodiesel ao diesel a atual composição no Brasil; nos Estados Unidos e Canadá, por exemplo, esta mistura é 20%. A determinação do nível da mistura pode ser realizada por métodos de espectrofotometria do infravermelho como padronizado por Knothe (2001) em amostras com componentes apropriados, em que exibem picos únicos na mistura, que os separam dos outros compostos.

Análises por espectroscopia do infravermelho para determinação de cadeias curtas de ácidos graxos e mudanças em sua estrutura foram realizadas em estudo investigativo sobre a influência da frequência do

reabastecimento nas taxas de degradação do biodiesel (B7 e B100) por Strömberg et al. (2013). Os autores verificaram que não houve mudanças na estrutura, pois não houve efeito autocatalítico do combustível no período avaliado.

2.7 Controle da contaminação microbiana durante o armazenamento

A contaminação microbiana durante o armazenamento pode comprometer a qualidade final do produto. Para a garantia de um produto dentro das especificações exigidas, dentro da cadeia de produção, distribuição e armazenamento, medidas preventivas e de remediação devem ser adotadas. Como medidas preventivas, recomenda-se a adoção de boas práticas, que constituem na drenagem periódica da água que se forma nos lastros dos tanques (Norma ABNT 15512) e na limpeza, se possível, das paredes dos tanques (remoção de biofilmes). A aplicação de produtos antimicrobianos pode ter ação preventiva na medida em que inibem o crescimento microbiano, dependendo da concentração utilizada. As medidas de remediação são recomendadas quando o sistema de armazenamento, encontra-se em grau alarmante (acima de 10^9 UFC.mL⁻¹) de contaminação microbiana, passando pela desativação do tanque (Bento & Gaylarde, 2001; Robbins & Levy, 2005; Passman, 2013).

A remoção da água dos tanques de armazenamento é a medida física mais recomendada para minimizar a biodeterioração do combustível. De acordo com a Norma da ABNT 15512, o processo de drenagem consiste em

retirar o excesso de água acumulada e deveria ser realizado em vários momentos: antes do recebimento de um novo combustível, algumas horas depois do recebimento, imediatamente antes do início do bombeamento do combustível e durante o armazenamento. Dependendo do volume armazenado deveria ser realizada diariamente (até 100.000 L), ou de duas a três vezes por semana (mais de 100.000 L). Além disso, algumas características de engenharia como o formato do tanque, podem dificultar uma drenagem completa, impedindo que toda água do lastro seja removida (Passman, 2013). Também é necessário dificultar que a infecção microbiana se difunda de um tanque contaminado para um tanque sem contaminação, que pode ocorrer pela transferência do combustível contaminado por mangueiras, ou filtros (Gaylarde et al., 1999; Rajasekar et al., 2012; Passman, 2013).

Uma estratégia empregada na prevenção a contaminação microbiana é o tratamento do combustível com biocidas, utilizando-se uma dosagem de manutenção, a ser aplicada periodicamente (Passman, 2003). Este procedimento é regulamentado em países da Europa, Estado Unidos e Canadá, por exemplo (Passman, 2013). No entanto no Brasil, até o presente momento, não há uma regulamentação junto a ANVISA e ANP que autorize o uso destes biocidas em combustíveis como o diesel e o biodiesel. Com relação ao procedimento de aplicação pode-se citar o tratamento contínuo (mais frequente, com concentrações baixas) e o tratamento de choque (com concentrações altas) pouco frequente, aplicados a intervalos pré-determinados (Bento & Gaylarde, 2001; Rajasekar et al., 2012; Passman, 2013; Zimmer et al., 2013).

Para garantir eficácia do biocida, é necessário conhecer a população alvo a ser eliminada depende e as condições de operação do sistema a tratar. Recomenda-se um ensaio prévio, preferencialmente nas condições reais de operação, ou em laboratório, com a determinação de concentração ótima, assim como da natureza do componente ativo mais apropriado (Rajasekar et al., 2012; Passman, 2013).

Os primeiros biocidas para uso em combustível foram utilizados na aviação, sendo o primeiro deles uma mistura de dioxiborinanas (2,2-oxybis-(4,4,6-trimethyl-1,3,2-dioxaborinane) + 2,2-(1-methyl-trimethylenedioxy)-bis-(4-methyl-1,3,2-dioxaborinane) (95% de ingrediente ativo total), cuja nomenclatura é DBO (Robbins & Levy, 2005). Além do DBO, uma mistura de isotiazolonas [5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (1.15%) + 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (0.35%)] (CMIT) vem sendo amplamente utilizada para óleo diesel. Um terceiro grupo, aprovado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, mas proibido na Europa, é a uma mistura de uma morfolina com uma dinitromorfolina [4-(2-nitrobutyl)morpholine (~70%) + 4,4'-(2-ethyl-2-nitrotrimethylene) dimorpholine (~20%)], a NMEND, apresenta-se como opção na prevenção a contaminação microbiana (Robbins & Levy, 2005; Rajasekar et al., 2012; Passman, 2013). Embora ainda não tenha recebido autorização para uso, um quarto grupo de biocida, o 3,3' -methylene bis(5-methyloxazolidine) (MBO; 95 e 100% de ingrediente ativo) tem sido sugerido como uma nova opção (Siegert et al., 2009; Zimmer et al., 2013). O modo de ação do biocida pode ser classificado em três tipos: quando envolvem interação com as estruturas celulares externas, como a parede celular; interação com

componentes da membrana plasmática, ou interação com as estruturas citoplasmáticas (Yemashova et al., 2007). O biocida MBO (FIGURA 7), constituído por oxazolidinas, fazem parte de uma importante classe de compostos heterocíclicos, que apresentam propriedades antimicrobianas, sendo muito utilizados na indústria farmacêutica (Zhang et al., 2005). A ação de biocidas com o princípio ativo baseado em oxazolidinas está relacionada a inibição da síntese de proteínas. Wilson & Nierhaus (2007) identificaram a ação de antimicrobianos a base de oxazolidina no centro peptidiltransferase de ribossomos mitocondriais e bacterianos indicando o mecanismo de ação desta droga.

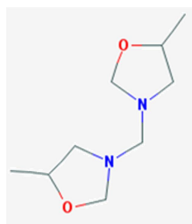


FIGURA 7: Estrutura química do MBO. Fonte:www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

Estudos com MBO foram realizados por Siegert (2009), e sua efetividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Y. albicans*, *Rhodotorula sp.*, *Aspergillus niger*, e *Fusarium sp.* foi avaliada em microcosmos com óleo diesel e 0,1% de fase aquosa. Aplicaram 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de MBO observaram uma redução de 6^{10} UFC. mL^{-1} para *Candida albicans*, *Rhodotorulasp.*, e *Fusariumsp.* após uma hora; para *P. aeruginosa* após duas horas e o mesmo efeito contra *P. putida*, *Y. albicans* e *A. niger*. Em dosagens inferiores, o autor observou uma redução da população em um tempo maior de contato com o MBO, em aplicando de 50 a 100 $\mu\text{L.L}^{-1}$, o tempo de ação foi

entre 6 e 24 horas. Zimmer et al. (2013) em estudo utilizando um aditivo com o biocida MBO a 50% a verificaram que este produto na concentração de 400 $\mu\text{L.L}^{-1}$ foi efetivo apenas sobre uma população microbiana em baixa concentração e não caracterizada, constituída pela população do combustível como recebido da distribuidora.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS, D. F. et al. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 2924–2928, 20 maio 2010.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.

ANDRÉ CREMONEZ, P. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. 0, p. 415–428, fev. 2015.

ANDRYKOVITCH, G.; NEIHOF, R. Fuel-soluble biocides for control of *Cladosporium resinae* in hydrocarbon fuels. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 35–40, 1987.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. 2014.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, 1999. p. 1496

ASTM Standard E 1259, 2010e. **Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390C**. West Conshohocken, 2010. <http://dx.doi.org/10.1520/E1259-10>. Disponível em: www.astm.org.

ASTM Standard D 6469, 2011a. **Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems**. ASTM International, West Conshohocken. <http://dx.doi.org/10.1520/D6469-11>. Disponível em: www.astm.org

ASTM Standard D 6751, **Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels** ASTM International, West Conshohocken. <http://dx.doi.org/10.1520/D6751-11>. Disponível em: www.astm.org

ATABANI, A. E. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, maio 2012.

ATADASHI, I. M. et al. Refining technologies for the purification of crude biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 12, p. 4239–4251, dez. 2011.

BAPTISTA, P. et al. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting the methyl esters content in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 2, p. 153–159, 2008.

BENTO, F. et al. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 135–142 LA – English, 2005a.

BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, jun. 2005b.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 38, n. 1, p. 31–33, 1996.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107–112, mar. 2001.

BIDDLE, A. et al. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by lachnospiraceae and ruminococcaceae in diverse gut communities. **Diversity**, v. 5, n. 3, p. 627–640, 2013.

BOKULICH, N. A. et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 57–59, 2013.

BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Optimization of BH medium for efficient biodegradation of diesel, crude oil and used engine oil by a newly isolated *Bacillus cereus* strain DRDU1 from an automobile engine. **Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 181–185, 2014.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R. J. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4356–4360, 28 out. 2000.

BOTES, M.; DE KWAADSTENIET, M.; CLOETE, T. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 1, p. 91–108, 2013.

BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A Simple Method for Enumerating Gasoline- and Diesel-Degrading Microorganisms. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 2, p. 81–84, 1 abr. 1999.

BÜCKER, F. et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 172–178, jan. 2011.

BÜCKER, F. et al. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 95, Part B, n. 1, p.346-355, nov. 2014.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. **J. Bacteriol.**, v. 41, n. 5, p. 653–673, 1 maio 1941.

BUSTIN, S.; BERGKVIST, A.; NOLAN, T. In Silico Tools for qPCR Assay Design and Data Analysis. In: YU, B.; HINCHCLIFFE, M. (Eds.). . **In Silico Tools for Gene Discovery SE - 18**. Methods in Molecular Biology. [s.l.] Humana Press, 2011. v. 760p. 283–306.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , 3 jun. 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CASAS-GODOY, L. et al. Lipases: An Overview. In: SANDOVAL, G. (Ed.). . **Lipases and Phospholipases SE - 1**. Methods in Molecular Biology. [s.l.] Humana Press, 2012. v. 861p. 3–30.

CAZAROLLI, J. C. et al. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, dez. 2013.

CAZAROLLI, J. C. et al. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, Part B, n. 0, p. 364–372, nov. 2014.

CESAR, J.; ALVES, L.; POPPI, R. J. Talanta Biodiesel content determination in diesel fuel blends using near infrared (NIR) spectroscopy and support vector machines (SVM). **Talanta**, v. 104, p. 155–161, 2013.

CHAO, Y. et al. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 11, p. 3358–3364, nov. 2010.

CHAO, Y. et al. Hydrophobicity of diverse bacterial populations in activated sludge and biofilm revealed by microbial adhesion to hydrocarbons assay and high-throughput sequencing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, n. 0, p. 379–385, 1 fev. 2014.

CHOPRA, A. et al. Determination of Polyunsaturated Fatty Esters (PUFA) in Biodiesel by GC/GC–MS and 1H-NMR Techniques. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 9, p. 1285–1296, 26 mar. 2011.

CLAESSON, M. J. et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 22, p. e200–e200, 29 dez. 2010.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D141–5, jan. 2009.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. B. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**, 3 ed, San Diego Academic Press, 1990. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080917405500028

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, fev. 1987.

CREMONEZ, P. A. et al. Current scenario and prospects of use of liquid biofuels in South America. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, n. 0, p. 352–362, mar. 2015.

CUNHA JR., A. et al. Synthesis and characterization of ethylic biodiesel from animal fat wastes. **Fuel**, v. 105, n. 0, p. 228–234, mar. 2013.

CYPLIK, P. et al. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4347–4352, 2011a.

CYPLIK, P. et al. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4347–4352, mar. 2011b.

D'AGOSTO, M. DE A. et al. Evaluating the potential of the use of biodiesel for power generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, n. 0, p. 807–817, mar. 2015.

DA CUNHA, M. E. et al. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 4, p. 570–575, abr. 2009.

DA CUNHA, M. E. et al. Analysis of fractions and bio-oil of sugar cane straw by one-dimensional and two-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometry (GC×GC/qMS). **Microchemical Journal**, v. 110, n. 0, p. 113–119, set. 2013.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology research international**, v. 2011, p. 941810, jan. 2011.

DAVID LEE NELSON, A. L. L. Lehninger. Principios de Bioquímica. **Barcelona, Omega**, v. 3a edición, p. 120, 625, 632, 823, 2001.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 1977–1990, 2010.

DEMELLO, J. A. et al. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 7, p. 894–904, jul. 2007.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 1, p. 14–34, jan. 2009.

DIAS, R. et al. MPI-blastn and NCBI-TaxCollector: Improving metagenomic analysis with high performance classification and wide taxonomic attachment. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 12, n. 03, p. 1450013, 26 mar. 2014.

ELSHAHED, M. S. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 2, p. 103–111, abr. 2010.

FAGEN, J. R. et al. Characterization of the Relative Abundance of the Citrus Pathogen *Ca. Liberibacter Asiaticus* in the Microbiome of Its Insect Vector, *Diaphorina citri*, using High Throughput 16S rRNA Sequencing. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 29–33, jan. 2012.

FEDURCO, M. et al. BTA , A novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 3, e22, jan. 2006.

FOLARIN, Y. et al. Contribution of make-up water to the microbial community in an oilfield from which oil is produced by produced water re-injection. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, n. 0, p. 44–50, jul. 2013.

FUENTES, S. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781–4794, 2014.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 01–10, 1999.

GIONGO, A. et al. PANGEA : pipeline for analysis of next generation amplicons. **ISME J**, v. 4, n. 7, p. 852–861, 2010a.

GIONGO, A. et al. TaxCollector: Modifying Current 16S rRNA Databases for the Rapid Classification at Six Taxonomic Levels. **Diversity**, v. 2, n. 7, p. 1015–1025, 21 jul. 2010b.

GODOY, L. C. et al. Chapter 1 Lipases : An Overview. v. 861.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. 0, p. 712–725, fev. 2015.

GUTHEIL, N. G. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Uries em Querosene de aviação no Brasil. Porto Alegre, Instituto Tecnológico do RS. 4p. (Boletim n.9), 1966.

HAGENOW, G. et al. Fuels. In: MOLLENHAUER, K.; TSCHÖKE, H. **Handbook of Diesel Engines**, Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 77–125.

HAUSMANN, S.; JAEGER, K.-E. Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: TIMMIS, K. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1099–1126.

HETTIGE, G. E. G.; SHERIDAN, J. E. Interactions of fungi contaminating diesel fuel. **International Biodeterioration**, v. 25, n. 4, p. 299–309, 1989a.

HETTIGE, G. E. G.; SHERIDAN, J. E. Effects of biocides on microbiological growth in middle distillate fuel. **International Biodeterioration**, v. 25, n. 1–3, p. 175–189, 1989b.

HILL, E. C. Use of thixotropic biopolymers as an alternative to agar for the cultivation of microorganisms on solid media. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 121–128, 3 jan. 1998.

HILL, E.C. ; HILL, G. C. Strategies for Resolving Problems Caused by Microbial Growth in Terminals and Retail Sites Handling Biodiesels11 th, PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY AND HANDLING OF LIQUID FUELS. **Anais...**2009

HOEKMAN, S. K. et al. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 143–169, jan. 2012.

HOREL, A.; SCHIEWER, S. Influence of inocula with prior hydrocarbon exposure on biodegradation rates of diesel, synthetic diesel, and fish-biodiesel in soil. **Chemosphere**, v. 109, n. 0, p. 150–156, ago. 2014.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Stability of biodiesel and its blends: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 667–678, fev. 2010.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Effect of metal contaminants and antioxidants on the storage stability of *Jatropha curcas* biodiesel. **Fuel**, v. 109, n. 0, p. 379–383, jul. 2013.

JAKERIA, M. R.; FAZAL, M. A.; HASEEB, A. S. M. A. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, n. 0, p. 154–163, fev. 2014.

JURELEVICIUS, D. et al. The Use of a Combination of alkB Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

KÄMPFER, P. Actinobacteria. In: TIMMIS, K. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology** , Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1819–1838.

KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S.; KARONIS, D. Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 9, p. 2483–2489, set. 2010.

KHAN, T. M. Y. et al. Recent scenario and technologies to utilize non-edible oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, n. 0, p. 840–851, set. 2014.

KHOURY, R. R. et al. Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. **Fuel**, v. 90, n. 8, p. 2677–2683, ago. 2011.

KNOTHE, G. Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 10, p. 1025–1028, 2001.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, n. 3, p. 364–373, jun. 2010.

KUMARI, M.; ABRAHAM, J. Efficiency of *Proteus* sp. in degrading diesel oil isolated from petroleum contaminated soil. **Pollution Research**, v. 32, n. 2, p. 443–446, 2013.

LEE, J. S. et al. Sulphide production and corrosion in seawaters during exposure to FAME diesel. **Biofouling**, v. 28, n. 5, p. 465–478, 2012.

LEE, J. S.; RAY, R. I.; LITTLE, B. J. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. **Biofouling**, v. 26, n. 6, p. 623–635, 12 jul. 2010.

LI, H. et al. Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 76, n. 0, p. 49–57, jan. 2013.

LIM, J. et al. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, v. 5, n. 1, p. 28–39, 2011.

LISIECKI, P. et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. **Fuel**, v. 116, n. 0, p. 321–327, 15 jan. 2014.

LIU, Y. J.; ZHANG, C. M.; WANG, X. C. Simultaneous detection of enteric bacteria from surface waters by QPCR in comparison with conventional bacterial indicators. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, n. 1–4, p. 535–544, 2009.

LOPES, M. et al. Emissions characterization from EURO 5 diesel/biodiesel passenger car operating under the new European driving cycle. **Atmospheric Environment**, v. 84, n. 0, p. 339–348, fev. 2014.

LOPES, P. T. C.; GAYLARDE, C. Use of immunofluorescence to detect the fungus *Hormoconis resinae* in aviation kerosine. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 37, n. 1–2, p. 37–40, 1996.

BENTO, F.; C. GAYLARDE, C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107–112, mar. 2001.

MA, Y.-F. et al. The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6812–9, nov. 2009.

MADIGAN, M. **Brock Biology of Microorganisms**, 13th, International Microbiology, 2012. p. 334

MAILA, M. P. et al. Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 303–310, fev. 2006.

MARIANO, A. P. et al. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1323–1328, 2008.

MATSUI, T. et al. Degradation of oil tank sludge using long-chain alkane-degrading bacteria. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 391–395, 2014.

MATTEI, L. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): Trajetória, Situação Atual e Desafios. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 41, n. 4, p. 731–740, 2010.

MEYER, D. D. et al. Capability of a selected bacterial consortium for degrading diesel/biodiesel blends (B20): Enzyme and biosurfactant production. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 47, n. 12, p. 1776–1784, 4 jul. 2012.

MORAES, M. S. A.; ZINI, C. A. Artigo. **Quimica Nova**, v. 34, n. 7, p. 1188–1192, 2011.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, mar. 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 127–141 LA – English, 1998.

NADKARNI, M. A. et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 1, p. 257–266, jan. 2002.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, n. 0, p. 231–250, 15 jan. 2015.

NELSON, M. C. et al. Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16s rRNA gene amplicon surveys. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

NI, B. et al. Assimilation of aromatic compounds by Comamonas testosteroni: Characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 6031–6041, 2013.

OROS-SICHLER, M. et al. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of microbiological methods**, v. 65, n. 1, p. 63–75, abr. 2006.

OWSIANIAK, M. et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1497–1500, fev. 2009.

PAIXÃO, S. M. et al. Performance evaluation of mixed and pure microbial inocula as surrogate culture in a BOD5 test. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 539–544, 2003.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 10, p. 874–879, out. 2006.

PASSMAN, F. J. **Fuel and Fuel System Microbiology Fundam.** Mayfield, ASTM International, West Conshohocken, ,2003.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, n. 0, p. 88–104, jul. 2013.

PASSMAN, F. J.; DOBRANIC, J. K. **Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional sulfur diesel fuels** 9th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels. **Anais...**2005

PEARSON, W. R. et al. Comparison of DNA Sequences with Protein Sequences. **Genomics**, v. 46, n. 1, p. 24–36, 15 nov. 1997.

PENG, C.-Y.; LAN, C.-H.; YANG, C.-Y. Effects of biodiesel blend fuel on volatile organic compound (VOC) emissions from diesel engine exhaust. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 96–106, 2012.

PIMENTEL, M. et al. Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 2, p. 201–206, 2006.

POWELL, S. M. et al. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. **Microbial ecology**, v. 52, n. 3, p. 523–32, out. 2006.

PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1446–1451, abr. 2008.

PULLEN, J.; SAEED, K. Experimental study of the factors affecting the oxidation stability of biodiesel FAME fuels. **Fuel Processing Technology**, v. 125, n. 0, p. 223–235, set. 2014.

RAIKOS, V. et al. Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**, v. 90, n. 2, p. 695–700, fev. 2011.

RAIKOS, V. et al. Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, v. 93, n. 0, p. 559–566, mar. 2012.

RAJASEKAR, A. et al. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 589–598, 2007.

RAJASEKAR, A. et al. Bacterial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. In: SINGH, S. N. (Ed.). **Microbial Degradation of Xenobiotics**. Environmental Science and Engineering. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 339–369.

REITSCHULER, C.; LINS, P.; ILLMER, P. Primer evaluation and adaption for cost-efficient SYBR Green-based qPCR and its applicability for specific quantification of methanogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 293–304, 2014.

RESTREPO-FLÓREZ, J.-M. et al. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 456–463, 2013.

RESTREPO-FLÓREZ, J.-M. et al. Investigation of biofilm formation on polyethylene in a diesel/biodiesel fuel storage environment. **Fuel**, v. 128, n. 0, p. 240–247, 15 jul. 2014.

RIZWANUL FATTAH, I. M. et al. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, n. 0, p. 356–370, fev. 2014.

ROBBINS, J. A.; LEVY, R. A review of the microbiological degradation of fuel. In: PAULUS, W. (Ed.). **Directory of Microbicides for the Protection of Materials**, Springer Netherlands, 2005. p. 177–201.

ROJO, F. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes. In: TIMMIS, K. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 781–797.

RUANE, J.; SONNINO, A.; AGOSTINI, A. Bioenergy and the potential contribution of agricultural biotechnologies in developing countries. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 10, p. 1427–1439, out. 2010.

SALVI, B. L.; PANWAR, N. L. Biodiesel resources and production technologies – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 3680–3689, ago. 2012.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441–448, 1975.

SARAIVA, M. et al. Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1–13, 2015.

SCHLEICHER, T. et al. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 724–730, 2009.

SCHULZ, S. et al. A comparative study of most probable number (MPN)-PCR vs. real-time-PCR for the measurement of abundance and assessment of diversity of *alkB* homologous genes in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 3, p. 295–298, mar. 2010.

SEELEY, J. V et al. Stationary phase selection and comprehensive two-dimensional gas chromatographic analysis of trace biodiesel in petroleum-based fuel. **Journal of chromatography. A**, v. 1226, p. 103–9, 24 fev. 2012.

SERQUEIRA, D. S. et al. Influence of blending soybean, sunflower, colza, corn, cottonseed, and residual cooking oil methyl biodiesels on the oxidation stability. **Fuel**, v. 118, n. 0, p. 16–20, 15 fev. 2014.

SCHWARTZ, R.D.; LEATHEN, W.W. Petroleum Microbiology. Industrial Microbiology, New York, Graw-Hill. p. 384-411, 1976

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008.

SIEGERT, W.; GMBH, M.; STRASS, R. K. Microbial Contamination in Diesel Fuel – Are new Problems Arising from Biodiesel Blends ?, 2009.

SILVA, G. S. et al. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. **Applied Soil Ecology**, v. 55, n. 0, p. 27–35, abr. 2012a.

SILVA, T. R. et al. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. **International Biodeterioration & Biodegradation**, jun. 2012b.

SILVA, T. R. et al. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, n. 0, p. 57–70, jul. 2013.

SINGER, P.; RÜHE, J. On the mechanism of deposit formation during thermal oxidation of mineral diesel and diesel/biodiesel blends under accelerated conditions. **Fuel**, v. 133, n. 0, p. 245–252, 1 out. 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Petroleum microbiology. Part 2 - Recovery, biorefining and biodegradation processes. **Chimica Oggi**, v. 24, n. 2, p. 65–67, 2006.

SINGH, B.; KORSTAD, J.; SHARMA, Y. C. A critical review on corrosion of compression ignition (CI) engine parts by biodiesel and biodiesel blends and its inhibition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3401–3408, jun. 2012.

SO, C. M.; PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Anaerobic Transformation of Alkanes to Fatty Acids by a Sulfate-Reducing Bacterium, Strain Hxd3. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3892–3900, 1 jul. 2003.

SORATE, K. A.; BHALE, P. V. Biodiesel properties and automotive system compatibility issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 0, p. 777–798, jan. 2015.

SØRENSEN, G. et al. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5259–5264, 2011a.

SORIANO, A. U. et al. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, n. 0, p. 102–114, abr. 2015.

STEVENSON, B. S. et al. Microbial communities in bulk fluids and biofilms of an oil facility have similar composition but different structure. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 1078–1090, 2011.

STRÖMBERG, N.; SARAMAT, A.; ERIKSSON, H. Biodiesel degradation rate after refueling. **Fuel**, v. 105, p. 301–305, 2013.

SUFLITA, J. M. et al. Molecular tools to track bacteria responsible for fuel deterioration and microbiologically influenced corrosion. **Biofouling**, v. 28, n. 9, p. 1003–1010, 2012.

THOMPSON, M. R. et al. Long term storage of biodiesel/petrol diesel blends in polyethylene fuel tanks. **Fuel**, v. 108, n. 0, p. 771–779, jun. 2013.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. v. 104, n. August, p. 927–936, 2000.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 0, p. 463–471, 1963.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VIDELA, H. Corrosão microbiológica. Edgard Blücher. Biotecnologia Editora São Paulo, v.4, 65p., 1981.

WANG, W.; SHAO, Z. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 116, 28 maio 2013.

WARD, O. P. et al. **Petroleum Microbiology**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 443–456.

WHITE, J. et al. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4527–38, jul. 2011.

WHYTE, L. G. et al. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, n. 2, p. 141–150, ago. 2002.

WONGSA, P. et al. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. **Current Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 415–422, 2004.

YAAKOB, Z. et al. A review on the oxidation stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, n. 0, p. 136–153, jul. 2014.

YASSINE, M. H. et al. Aerobic biodegradation kinetics and mineralization of six petrodiesel/soybean-biodiesel blends. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 4619–4627, 2013.

YEMASHOVA, N. et al. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 4, p. 315–337, 2007.

ZHANG, T.; FANG, H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 281–289, 2006.

ZHANG, W.-B. Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 6048–6058, out. 2012.

ZHANG, X. et al. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 41, n. 5, p. 1423–1430, 1998.

ZHOU, X. et al. The next-generation sequencing technology and application. **Protein & Cell**, v. 1, n. 6, p. 520–536 LA – English, 2010.

ZIMMER, A. et al. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). **Fuel**, v. 112, n. 0, p. 153–162, out. 2013.

3. CAPÍTULO 1
COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA E AVALIAÇÃO DA
DEGRADAÇÃO NA ESTOCAGEM SIMULADA DE DIESEL (B0),
BIODIESEL (B100) E MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL (B5, B10,
B50)

Este Capítulo foi organizado em forma de artigo e formatado segundo as normas da Revista Fuel, ISSN: 0016-2361, a qual será submetido.

Composição da comunidade microbiana e avaliação da degradação na estocagem simulada de diesel (B0), biodiesel (B100) e misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, 50)

Francielle Bucker^{a*}, Leticia I. Bucker^d, Patricia D. Quadros^a, Michele E. da Cunha^b,
Bernardo B. Vacaro^c, Elina B. Caramão^b, Marco F. Ferrão^c, Kateryna V. Zhalnin^d,
Raquel Dias^d, Eric Triplet, Fátima M. Bento^a

^a Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Universidade Federal do Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil

^b Instituto de Química, Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica, Universidade Federal do Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^c Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^d University of Florida, Department of Microbiology and Cell Science University of Florida, Gainesville, Florida, Estados Unidos

*autor correspondente

Tel: +55 51 3308 3665

E-mail: franbucker@gmail.com

Resumo

O crescente uso de biodiesel na matriz energética mundial, como uma alternativa ao uso dos combustíveis fósseis, ou em misturas com óleo diesel demanda estudos sobre o efeito da adição do biocombustível sobre a contaminação microbiana durante o armazenamento, e suas consequências. Neste trabalho avaliou-se o efeito do biodiesel (5%, 10%, 50% e 100%) sobre a população bacteriana e fúngica durante o crescimento de biofilme na interface óleo-água por sequenciamento de alto rendimento e a biodegradação de ésteres de ácidos graxos por GC/qMS. Ao final de 40 dias, observou-se que B100 e B50 apresentaram os maiores valores de biomassa na interface óleo-água. A análise do 16S rRNA mostrou que a população bacteriana apresentou abundâncias relativas diferentes nas misturas avaliadas para os Filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. A diversidade de microrganismos, em nível de Família, foi maior em B50 e B100. *Cladosporium* sp. foi o fungo predominante em B100 e B50. As maiores porcentagens de biodegradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel das frações C14:0, C16:0, C18:1 e C18:2 ocorreram em B5. Os resultados mostraram que dependendo do teor de biodiesel pode-se observar variações na estrutura das comunidades microbianas bem como no percentual de biodegradação do combustível durante o armazenamento simulado.

Palavras chaves: Biodiesel, Diesel; Sequenciamento de Alto Rendimento, GC/qMS, IV

Destaques

A biodegradação dos ésteres de ácidos graxos nas misturas foi influenciada pelo teor de biodiesel.

B5 apresentou os maiores valores de biodegradação dos ésteres

B100 e B50 apresentaram o maior o crescimento microbiano.

Actinobacteria, *Clostridia* e *Bacilli* foram as Classes predominantes nas misturas B5, B10 e B50.

Cladosporium sp. foi o fungo predominante no biofilme em B50 e B100.

A adição e biodiesel influenciou a abundância relativa final dos grupos microbianos.

3.1.Introdução

No Brasil, o aumento do volume de biodiesel na mistura com diesel de 5% para 7%, em novembro de 2014, influenciará o consumo de oleaginosas. Assim, a previsão é de que a partir de 2015, as usinas a passem a utilizar cerca de 15,7 milhões de toneladas de oleaginosas [1]. O biodiesel, no Brasil, pode ser produzido a partir de diferentes matérias primas, entre elas plantas oleaginosas como a soja, o algodão e também pode ser utilizado a gordura animal, como o sebo bovino. Esta diversificação está relacionada a características econômicas, sociais e de capacidade de produção de cada região brasileira. No Rio Grande do Sul, o biodiesel pode ser oriundo de uma mistura de matérias primas, como a soja e o sebo bovino. A adição de biodiesel ao diesel tem movimentando vários setores econômicos no Brasil, e no mundo, envolvendo investimentos desde a produção até a distribuição do combustível ao consumidor, visando um biodiesel com qualidade. No Brasil, de acordo com dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP)[1] houve um aumento de 4,63% na distribuição diesel/biodiesel no ano de 2013, em relação a 2012, para a frota nacional de ônibus, caminhões, entre outros veículos que utilizam este combustível. Atualmente, a mistura B7 prevalece na União Européia, onde há um crescimento exponencial na indústria do biodiesel, de modo que as Diretrizes de Energias Renováveis Europeias (European Renewable Energy Directive 2009/28/EC) têm como objetivo o uso de 10% de energia renovável em todo o setor automobilístico de transporte, até 2020 [2]. Nos Estados Unidos, B20 é a mistura utilizada atualmente, e para atender a demanda, a produção de biodiesel de soja foi de 5068 milhões de litros em 2013[3,4]. O biodiesel apresenta-se como uma alternativa aos tradicionais combustíveis derivados do petróleo, como o diesel, por ser proveniente de fontes renováveis de energia; além de ser um combustível que não libera os gases associados ao aquecimento global [5,6].

Durante o transporte e o armazenamento de combustíveis pode-se verificar a contaminação por microrganismos, que pode levar ao desenvolvimento de uma biomassa visível na interface óleo-água devido à presença de água livre ou dissolvida nos tanques. A biomassa pode promover a saturação prematura dos filtros (prensa e motor), provocar desgastes no sistema de injeção e afetar a qualidade final do produto [7–12]. As misturas de diesel e biodiesel vêm sendo foco em estudos que avaliam o

efeito da adição do biodiesel com microrganismos específicos, bem como na comunidade microbiana presente no combustível. Embora os pesquisadores tenham avaliado o efeito da concentração de biodiesel no diesel sobre a biodegradação do combustível, os mecanismos envolvidos no processo de biodegradação do biodiesel durante o armazenamento e quais ácidos graxos são preferencialmente degradados, constituem questões que permanecem pouco elucidadas [13–17].

Para o estudo sobre a diversidade microbiana e dinâmica de populações em combustíveis (como o diesel o biodiesel) contaminados, ou no monitoramento da contaminação de tanques de armazenamento, técnicas independentes de cultivo, como a técnica e PCR- GGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), e técnicas de sequenciamento de alto rendimento como o Pirosequenciamento e a Plataforma ILLUMINA vêm sendo utilizadas. White et al.[18] analisaram a diversidade microbiana em amostras contaminados de diesel e biodiesel por Pirosequenciamento 454, e verificaram a predominância dos Filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, e dos gêneros *Marinobacter*, *Acrhomobacter*, *Burkholderia*, *Halomonase* *Clostridium*.

A condução de testes de correlação estatística entre dados genômicos e químicos, como a porcentagem de determinado microrganismo em relação a porcentagem de biodegradação da mistura em função do tempo, pode nos levar a um melhor entendimento das alterações do perfil microbiano (ocorrência e abundância relativa) quando submetidos a diferentes concentrações de biodiesel adicionados ao diesel. Estes resultados auxiliariam ao entendimento da suscetibilidade á contaminação microbiana (biodegradação e biodeterioração) e a relação com comprometimento da qualidade final dos combustíveis, especialmente durante o armazenamento. Os objetivos do estudo foram caracterizar as populações de Bacteria, Archaea e Fungos em biofilmes formados pela microbiota nativa do combustível em microcosmos com biodiesel puro (B100) e diferentes misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B50) por Illumina MiSeq; e, determinar as frações do biodiesel que são preferencialmente biodegradadas pela população microbiana do combustível, por GC/qMS e infravermelho.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Combustível

Foram utilizados os seguintes combustíveis: óleo diesel (Diesel A), com baixo teor de enxofre (10ppm), e Biodiesel de verão no Rio Grande do Sul, Brasil, (65% soja e 35% sebo), fornecidos pela Ipiranga Produtos de Petróleo S/A (Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil). As misturas de diesel e biodiesel foram preparadas no laboratório utilizando-se proveta graduada previamente desinfetada. Foram conduzidos tratamentos com diesel puro (B0), e biodiesel puro (B100), e com as misturas B5 (95% diesel e 5% biodiesel), B10 (90% diesel e 10% biodiesel), B50 (50% diesel e 50% biodiesel). O combustível foi utilizado como recebido da distribuidora, sem ser esterilizado. Os tratamentos controles (sem a presença de microrganismos) foram conduzidos a partir do combustível recebido da distribuidora esterilizado com membrana 0,22 µm (Milipore).

3.2.2. Condições de estocagem simulada

Em frascos de vidro (200mL) adicionou-se 20mL de Meio Mineral Bushnell-Hass (Bushnell and Haas, 1941). Adicionou-se 10 mL do combustível (B0, B5, B10, B50 ou B100) aos frascos esterilizados. O experimento foi conduzido em triplicata, em estufa a 28°C.

3.2.3. Contaminação microbiana

O experimento foi conduzido a partir do combustível como recebido da distribuidora. Os níveis de contaminação inicial do diesel puro, e do biodiesel puro, recebidos da distribuidora, foram determinados a partir da diluição seriada do combustível em solução aquosa contendo 0.1% Tween 80, conforme a Norma Francesa AFNOR-M 07-070/92[19], e posteriormente semeado em meio de contagem (PCA) para bactérias e meio ágar batata (BDA) para fungos. A estimativa da contaminação inicial foi de $>2 \log \text{ UFC. ml}^{-1}$ para fungos e bactérias, no diesel puro e no biodiesel puro.

3.2.4. Estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis

A estimativa de microrganismos foi realizada a partir da *fase aquosa* pelo método do Número Mais Provável (NMP) [20,21] em placas de poliestireno estéril de 96 poços.

Para a determinação de microrganismos heterotróficos cultiváveis, foi utilizado 250 μL de caldo Triptona de Soja (TSB), adicionado de 10 μL de cada diluição da fase aquosa, de cada tratamento. As placas foram incubadas a 28°C e o crescimento microbiano foi visualizado por turbidimetria (após 10 dias de incubação). A população microbiana foi então determinada usando-se tabelas de NMP, conforme APHA[22]. A estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis foi realizada aos 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias.

3.2.5. Crescimento microbiano

A biomassa formada na interface óleo-água foi recuperada por filtração em discos de papel filtro, previamente pesados. Para remover o excesso de óleo aderido a biomassa, os discos de papel filtro foram lavados com 4 mL de hexano. Estes foram colocados em estufa a 60°C, por 48 h, e após foi transferido para uma câmara de dessecação, por 24 h, de onde foram removidos diretamente para pesagem. O peso seco da biomassa foi calculado como a diferença entre o peso final e o peso inicial do disco de papel (mg) aos 0, 10, 20, 30 e 40 dias.

3.2.6. Degradação dos ésteres de ácidos graxos do por GC/qMS

A avaliação qualitativa da composição do biodiesel (ésteres de ácidos graxos) foi realizada para as amostras de B5, B10, B50 e B100 para determinar a composição dos ésteres de ácidos graxos majoritários. Esta avaliação foi realizada por cromatografia gasosa monodimensional acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar GC/qMS (QP2010 Ultra, Shimadzu, Toquio, Japão) equipado com auto injetor split/splitless AOC20i. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB-5, metil silicone com 5% de grupos fenil e 95% metilpolisiloxano (60 m \times 0,25 mm d.i. \times 0,25 μm – Ohio Valley Specialty Company, Marietta, Ohio, EUA). O aquecimento do forno obedeceu a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C mantida durante 4 min, aumentando 5 °C min^{-1} até 190 °C, mantida por 4 min, aumentando 2 °C min^{-1} até 240 °C, mantida por 5 min, elevando a temperatura novamente na razão de 10 °C min^{-1} até a temperatura final de 280 °C, mantida por 15 min. A temperatura do injetor, detector e fonte de íons foi de 280 °C e a injeção foi

realizada no modo Split na razão 1:10. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de fluxo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. As condições do espectrômetro de massas foram as seguintes: energia de 0,83 kV e faixa de varredura de espectros de 35 a 400 Daltons, correspondendo a 52,6 Hz de frequência. A tentativa de identificação dos compostos foi feita utilizando-se a biblioteca de base de dados NIST-05 (NIST, 2014) com similaridade espectral mínima acima de 800 e confirmada através de comparação com os índices de retenção de Van den Dool e Kratz [23].

Para a quantificação dos ésteres de ácidos graxos majoritários presentes nas amostras de B5, B10, B50 e B100 foi utilizado um GC/qMS (QP2010 *Ultra*, Shimadzu, *Toquio, Japão*) equipado com auto injetor split/splitless AOC20i. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB-5, metil silicone com 5% de grupos fenil e 95% metilpolisiloxano ($60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.} \times 0,25 \mu\text{m}$ – Ohio Valley Specialty Company, arietta, Ohio, EUA). O aquecimento do forno obedeceu a seguinte programação: temperatura inicial de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ mantida durante 4 min, aumentando $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $190 \text{ }^\circ\text{C}$, mantida durante 4 min, aumentando $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $240 \text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo por 5 min, elevando a temperatura novamente na razão de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até a temperatura final de $280 \text{ }^\circ\text{C}$, mantida por 3 min. A temperatura do injetor e detector e fonte de íons foi de $280 \text{ }^\circ\text{C}$ e a injeção foi realizada em modo Split de 1:10, e fluxo de gás de arraste. Hélio (ultrapuro, Linde Gases) foi usado como gás de arraste com razão de fluxo de $0,90 \text{ mL min}^{-1}$. O espectrômetro de massas com analisador quadrupolar operou em modo de monitoramento de íons selecionados (do inglês “Select Ion Monitoring”). Foram injetadas soluções da mistura dos 6 padrões de ácidos graxos (metil miristato, metil palmitato, metil linolenato, metil oleato, metil elanoato e metil estearato) (Tabela 1) na faixa de 0,5 a 1500 mg L^{-1} . As injeções foram realizadas em triplicatas e ordem crescente de concentração das misturas, com as quais se delineou uma curva analítica. As curvas analíticas foram baseadas no método do padrão interno para compensar as possíveis flutuações nas respostas geradas pelo espectrômetro de massas quadrupolar. As curvas analíticas foram utilizadas para a quantificação dos ésteres de ácidos graxos nas amostras de B5, B10, B50 e B100. O delineamento e análise das curvas analíticas e a quantificação dos ésteres de ácidos graxos selecionados para a análise foram realizados de acordo com estudo prévio [24]. Para a análise, 10 mg de amostra foram

diluídas em 10 ml de diclorometano (DCM). Em cada vaio adicionou-se 900 μl de DCM, 300 μl da amostra previamente diluída, e 300 μl do padrão interno. O padrão interno utilizado foi etil miristato na concentração de 200 mg L^{-1} . Os compostos analisados, o padrão interno aplicado e seus íons selecionados podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1.

Compostos monitorados e seus íons selecionados empregados para análise quantitativa dos mesmos em B5, B10, B50 e B100.

Composto	Íons (m/z)				Tempo de retenção
Metil Miristato	74	87			38.686
Metil Palmitato	74	87			45.949
Metil Linoleato	67	81			52.725
Metil Oleato	55	69			52.957
Metil Elanoato	55	69			53.201
Metil Estearato	74	87			53.955
Etil Miristato *	88	101	43	41	41.044

* Padrão interno

3.2.7. Análise por Infravermelho

As fases oleosas de cada amostra foram armazenadas em microtubos de 2 mL, em gelo, até encaminhamento ao Centro de Combustíveis e Biocombustíveis (CECOM), no Instituto de Química/UFRGS, para análise por infravermelho. Os espectros de refletância total atenuada horizontal no infravermelho médio (HATR/FTIR) foram obtidos na faixa de 1418 a 687 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando um acessório de refletância total atenuada com cristal de seleneto de zinco (ZnSe), acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho FT-IR Shimadzu modelo IR Prestige 21. Antes de realizar a leitura da primeira amostra, foi realizado o *background*, a fim de garantir que não houvesse nenhum sinal além da absorção dos constituintes da amostra. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a amostra foi espalhada no cristal, em quantidade de aproximadamente 1 mL. A leitura de um espectro dá-se pela relação entre número de onda (cm^{-1}) versus $\log(1/R)$, o que indica a intensidade do sinal de determinado grupo químico presente na amostra. Para a construção do dendrograma

foram utilizados os softwares Matlab 7.11 (MathWorks Inc., USA) e PLS-TOOLBOX 6.2.1 (Eigenvector Research Inc., USA).

3.2.8. Extração de DNA

A biomassa formada na interface óleo-água de três replicatas (amostras destrutivas) foi removida dos frascos aos 40 dias, e retida em discos de papel filtro, que foram utilizados para a extração de DNA da biomassa, utilizando-se PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories, USA), de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações, conforme protocolo descrito por Silva et al. (2013)[25]. O DNA extraído de cada replicata foi reunido em um único tubo (Bücker et al, 2014). A qualidade do DNA foi verificado por espectrofotometria no aparelho Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) (260/280 nm ratio), e quantificado no aparelho Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, NY, EUA), utilizando-se o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X.

3.2.9. Sequenciamento de alto rendimento

A região V4 do gene 16S rRNA de Bacteria e Archea foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais 515F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') [26]. Os oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificação do gene 18S rRNA para Fungi utilizados foram 0817-5' (TTAGCATGGAATAATRAATAGGA) e 1196-3' (TCTGGACCTGGTGAGTTTCC) [27]. Para o preparo das reações de PCR, cada amostra recebeu uma exclusiva sequência adaptadora (*barcodes*) requerida pelo sistema Illumina, a qual, durante a reação foi ligada aos oligonucleotídeos iniciadores. As reações de PCR para o gene 16S rRNA foram realizadas utilizando o sistema GoTaq PCR (Promega, Madison, WI, USA). As reações continham 5 µl de tampão de PCR 10X PCR buffer, 200 mM dNTPs, 100 mM de cada oligonucleotídeo, 2.5 U de DNATaq polimerase e aproximadamente 100 ng de DNA molde em uma reação com volume final de 50 µl. As reações de PCR do gene 16S rRNA foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C

por 3 min, seguida por 20 ciclos a 94°C por 45 s, 53°C por 30 s, e 65°C por 90 s. Uma etapa final de anelamento a 65°C foi realizada por 10 minutos. As reações de PCR para o gene 18S rRNA (Fungi) foram realizadas utilizando o sistema GoTaq PCR (Promega, Madison, WI, USA). As reações continham 5 µl de tampão de PCR 10X PCR buffer, 200 mM dNTPs, 100 mM de cada oligonucleotídeo, 2.5 U de DNATaq polimerase e aproximadamente 100 ng de DNA molde em uma reação com volume final de 50 µl. As reações de PCR do gene 18S rRNA foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 3 min, seguida por 30 ciclos a 94°C por 45 s, 56°C por 30 s, e 72°C por 90 s. Uma etapa final de anelamento a 72°C foi realizada por 5 minutos. O sequenciamento foi conduzido em sequenciador Illumina GAIIx (Illumina, Inc., CA, USA), com dois ciclos de leitura pareada com 101 bases cada um. Para as análises de bioinformática, primeiramente todas as sequências foram divididas de acordo com seu código *barcode*, separando cada amostra com sua respectiva sequência. Após a separação, os *barcodes* foram removidos usando o programa FASTX - Toolkit [28]. As sequências pareadas foram mescladas utilizando-se um *script* personalizado (disponível em https://github.com/Bioinfo-Tools/merge_fastq_files.pl). As sequências de leituras foram filtradas pela qualidade, utilizando-se 70% como percentual mínimo de bases com uma boa qualidade, considerando 20 como a pontuação mínima de qualidade. A classificação das sequências de leitura filtradas foram realizadas utilizando-se Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2175337/>) [29] em comparação com o banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2175337/>). Para executar este passo, as leituras foram convertidas de arquivos com o formato FASTQ para o formato FASTA usando FASTX - Toolkit e MPI- blastn, em uma versão paralela do BLAST, que foi utilizada para minimizar o tempo de execução [MPI- blastn e NCBI- TaxCollector][30]. As descrições taxonômicas completas baseadas no banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de>) foram geradas usando SILVA-taxcollector (<http://www.arb-silva.de>). Esta ferramenta é constituída por uma versão adaptada do algoritmo introduzido no NCBI-taxcollector [MPI-blastn e NCBI-TaxCollector] e inclui um passo adicional antes da atribuição taxonômica. Neste passo, todos os números de acesso das sequências do banco de dados SILVA foram mapeados para registro dos números de identificação taxonômicos (TAXID) a partir do banco de dados de

taxonomia do NCBI. As combinações foram filtradas na proporção de 80% de comprimento e classificadas a partir 80% de similaridade em nível de Filo; 90% de similaridade foi utilizada como ponto de corte para a classe, ordem e família; 95% de similaridade foi utilizado como ponto de corte para gênero; e, 99% de similaridade foi utilizado como ponto de corte para as espécies. O número total de combinações com as sequências de 16S rRNA ou 18S rRNA no banco de dados em cada nível de classificação foi utilizado para criar uma matriz de abundância de unidades taxonômicas operacionais (UTO) para cada nível taxonômico. As matrizes de abundância analisadas e de abundância foram geradas usando os *scripts* Megaclust e Megaclustable modificados (código-fonte disponível em <https://github.com/Bioinfo-Tools/PANGEA-plus>) [31].

3.2.10. Análise estatística

O experimento foi realizado em quintuplicata, sendo utilizadas triplicatas para a extração de DNA. As demais análises (crescimento microbiano, GC/qMS, Infravermelho) foram conduzidas em triplicata e analisadas utilizando-se o programa para análises estatísticas *Statistic 7.1*. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada por Teste de Tukey ($p=0,05$). Os dados sobre a biodegradação dos ésteres de ácidos graxos, a composição da comunidade bacteriana e a concentração de biodiesel na mistura foram analisados pela Análise dos Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*) utilizando-se o software para análise estatística XLStat-Pro 2014.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Crescimento microbiano

A avaliação da estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis a partir da fase aquosa, pelo método MNP, é apresentado na Fig. 1.

No tempo 0, verificou-se que o biodiesel puro B100 e a mistura B50 apresentavam uma estimativa de $\leq 10^2$ log NMP. mL⁻¹; as misturas B10 e B5 não apresentaram crescimento. Aos 10 dias de armazenamento simulado, a estimativa de microrganismos da fase aquosa para o B100 foi de 10^6 log NMP. mL⁻¹. As misturas de biodiesel ao

diesel nas concentrações de 5, 10 e 50% - B5, B10 e B50 (Fig.1 b, c, d), apresentou estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis em torno de $\leq 10^2$ log NMP. mL⁻¹, na fase aquosa. Aos 15 dias, B100, e as misturas B50 e B10 apresentaram 10^9 log NMP. mL⁻¹, e B5 apresentou 10^8 log NMP. mL⁻¹, verificando-se um crescimento significativo da população dos microrganismos heterotróficos cultiváveis, na fase aquosa, neste tempo.

Aos 20 dias, a mistura B50 manteve a estimativa dos microrganismos heterotróficos cultiváveis, na fase aquosa, em torno de 10^9 log NMP. mL⁻¹, no entanto B100, B10 e B5 apresentaram redução na estimativa da população. Uma redução para 10^2 log NMP. mL⁻¹ foi observada em B50 aos 25 dias; e, nas demais misturas (B5 e B10) a estimativa microrganismos heterotróficos cultiváveis, na fase aquosa, manteve-se similar entre os dias 20 e 35.

Ao final do experimento (40 dias), em B100 a estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis, na fase aquosa foi de 10^8 log NMP. mL⁻¹. Em B50, após a redução microrganismos heterotróficos cultiváveis, na fase aquosa, aos 25 dias, observou-se um aumento gradativo na população até os 40 dias. Ao final do experimento (40 dias), a estimativa de microrganismos heterotróficos cultiváveis, na fase aquosa, do tratamento com B50 apresentou 10^6 log NMP. mL⁻¹, B10 apresentou 10^3 log NMP. mL⁻¹, e B5 apresentou 10^7 log NMP. mL⁻¹.

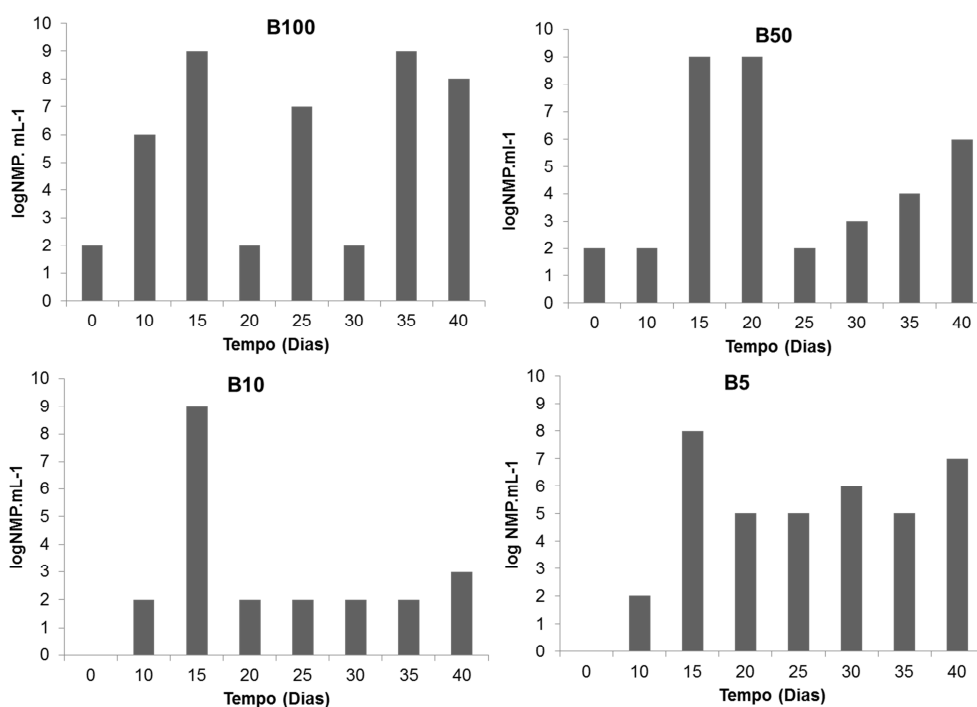


Fig.1. Estimativa do número de microrganismos heterotróficos cultiváveis da fase aquosa ($\log \text{NMP.mL}^{-1}$) nos microcosmos contendo B5, B10, B50 e B100 durante 40 dias de experimento.

Não foi observado crescimento microbiano na fase aquosa no tratamento com B0, utilizando a metodologia de estimativa do número de microrganismos heterotróficos cultiváveis.

Na Tabela 2 são apresentados os valores do peso seco da biomassa formada na interface óleo-água aos 10, 20, 30 e 40 dias de experimento, nos diferentes tratamentos.

Para B100 a biomassa formada aos 10 primeiros dias de experimento foi 81% maior em relação a biomassa formada em B0 (Tabela 2). Aos 40 dias, o valor da biomassa, em B100 foi 98,3% maior ao observado em B0. Aos 10 e 40 dias a diferença entre a biomassa observada em B100 e em B0 foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Verificou-se que aos 10 dias do experimento a biomassa formada na presença de biodiesel na mistura com diesel favoreceu o crescimento microbiano, na interface óleo-água. Na mistura B50, a biomassa foi 66,6% maior que a biomassa formada em B0.

Nas misturas B10 e B5 a biomassa formada foi 48,6 % e 51,3% , superior a biomassa formada em B0, respectivamente. Aos 40 dias, o valor da biomassa, em B50 foi 98,3%, em B10 92,6%; e, em B5 94,3% maior ao valor mensurado em B0.

Aos 40 dias, a diferença do crescimento no tratamento com B50 e no tratamento com B100 não foi estatisticamente diferente ($p>0,05$), tempo em que ambos os tratamentos apresentaram 57,5 mg de biomassa na interface óleo água. No último dia de avaliação, a biomassa formada em B100 foi 76,5% maior que a biomassa formada em B10, e 65,5% maior que a biomassa formada em B5. Sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Tabela 2.

Valores de peso seco da biomassa formada na interface óleo-água nos tratamentos contendo B0, B5, B10, B50 e B100; aos 10, 20, 30 e 40 dias, na condição de combustível como recebido da distribuidora.

Tempo (Dias)	Tratamento									
	B0		B5		B10		B50		B100	
	Biomassa (mg)									
	Média	Dp* (\pm)	Média	Dp (\pm)	Média	Dp (\pm)	Média	Dp (\pm)	Média	Dp (\pm)
10	9,5	0,5	19,5	3,7	18,5	3,7	28,5	6,3	50,0	8,4
20	12,0	3,8	26,0	2,2	27,5	1,7	25,0	6,4	28,0	0,0
30	15,0	2,4	36,0	8,4	31,0	2,2	40,5	7,0	35,0	3,3
40	1,0	0,0	17,7	3,6	13,5	3,7	57,5	15,3	57,5	2,3

* Desvio padrão da média

Para que o processo de biodegradação se estabeleça é necessária a presença de microrganismos com a capacidade de utilizar o diesel e/ou biodiesel como fonte de carbono. A população microbiana com competência para degradá-los pode entrar no tanque através do sistema de ventilação ou de bombeamento, pois são microrganismos presentes tanto no ar, como no solo e na água [8,10,32,33]. Os resultados de biomassa ao final dos 40 dias, indicaram que a população presente originalmente no biodiesel puro foi capaz de produzir maior volume de biomassa, provavelmente devido ao potencial enzimático em utilizar os ésteres como fonte de carbono. Por outro lado, na condição de óleo diesel puro, com uma baixa densidade microbiana de nativos, não foi observado, ao final dos 40 dias de estocagem simulada, o desenvolvimento significativo

de biomassa. Como os dois combustíveis são diferentes e possuem microrganismos nativos distintos, supõem-se a população presente em B100 apresentar um aparato enzimático necessário, como enzimas lipases, para utilizar os ésteres de ácidos graxos como fonte de carbono e energia. Em B0, no entanto, a população nativa presente neste combustível, foi capaz de se desenvolver na interface óleo-água, mas em densidade inferior ao B100.

A metodologia utilizada na estimativa da população microbiana por Braddock & Catterall [27] é proposta como um método simples e de baixo custo para enumerar microrganismos de amostras ambientais (solo ou água), sendo utilizada para estimar a população microbiana a partir da fase aquosa do experimento. Passman & Dobranic [37] apresentam o risco de biodeterioração do combustível, através de avaliações realizadas a partir da água de lastro do tanque de armazenamento. Os escores de risco determinados por Passman [34] para os parâmetros microbiológicos analisados na água de lastro apontam valores de 1 a 5, e incluem avaliações como demanda de oxigênio, ATP, contagem de fungos e bactérias (log UFC). A metodologia utilizada estima o crescimento de microrganismos heterotrófico cultiváveis, incluindo fungos e bactérias, assim, no presente estudo, poder-se-ia utilizar esta escala para inferir sobre o risco de biodeterioração das amostras de B0, B5, B10, B50 e B100. A fase aquosa, no início das avaliações, apresentou valores $<2 \text{ NMP.ml}^{-1}$ em B0, B5 e B10, indicando um risco escore 1 na escala de Passman, para condição inicial, ou seja, assim como recebido da distribuidora. Já a fase aquosa de B50 e B100 apresentaram valores em torno de 2 NMP.ml^{-1} , indicando um risco escore 2. Como consequência, verificou-se que B50 e B100 (risco 2) aos 10 dias já apresentaram valores de biomassa superiores aos de B0, B5 e B10, que inicialmente apresentaram risco 1 de biodeterioração do combustível.

Restrepo-Flórez et al. [38] simularam uma condição de armazenamento para avaliar o efeito do biodiesel, nas concentrações de 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, sobre a população microbiana, utilizando um meio mineral e água de lastro como fase aquosa nos tratamentos. Os autores avaliaram o crescimento microbiano pelo aumento da absorbância na fase aquosa durante 200 dias. Os resultados indicaram que não houve diferenças estatisticamente significativas no crescimento durante os primeiros 100 dias

de experimento. Aos 200 dias, um crescimento microbiano significativo foi verificado nas amostras contendo apenas biodiesel como fonte de carbono. Restrepo-Flórez et al. [38] avaliaram o crescimento de bactérias heterotróficas mesófilas pela contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônia) em placas de cultivo. Os autores verificaram um aumento no número de UFC.ml⁻¹ aos 25 dias (em relação ao início do experimento) em todos os tratamentos, mas não observaram diferenças na estimativa por UFC entre os tratamentos com as diferentes concentrações de biodiesel, atribuindo este resultado a uma maior quantidade de nutriente, provenientes do meio mineral, neste período. Após 50 dias, verificaram uma diminuição significativa da estimativa de UFC no tratamento com puro biodiesel, em relação aos demais tratamentos. No presente estudo, o aumento no NMP.ml⁻¹, foi verificado aos 15 dias, para todos os tratamentos contendo biodiesel. Este resultado pode estar associado à adaptação fisiológica dos microrganismos às condições de cultivo (fase lag) durante os primeiros 10 dias, em que se observam menores valores NMP.ml⁻¹, sendo o tempo compreendido entre 10 e 15 dias provavelmente a etapa de crescimento exponencial da população (fase log).

Em estudo conduzido por Sørensen et al. [15] com crescimento microbiano a partir de um inóculo adicionado (proveniente de um tanque de armazenamento) a microcosmos com B0, e com misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B20, B50) e B100, os autores realizaram a quantificação da população por fluorescência por DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol). Foram observados resultados similares aos dos pesquisadores acima citados, que realizaram contagens microbianas aos 41 dias de experimento. Verificou-se neste estudo que a estimativa de microrganismos (aos 40 dias), na fase aquosa, em B100, foi de 10⁸ NMP.mL⁻¹; em B5 foi de 10⁷ NMP .mL⁻¹, em B50 10⁶ NMP. mL⁻¹; e em B10, foi de 10³ NMP. mL⁻¹. Sørensen et al. [15] verificaram que, aos 41 dias de experimento, uma maior quantidade de células por mL em B100, seguida por B5, B50 e B10, assim como no presente estudo, ao final do experimento.

Owsianiak et al. [21] conduziram estudo com crescentes concentrações de biodiesel ao diesel e não encontraram uma relação linear entre a formação de biomassa e o teor de biodiesel na mistura, assim como verificado no presente estudo. Schelicher et al.[37] avaliaram a biodegradação de óleo de canola puro e em misturas com óleo diesel

durante 12 semanas, e verificaram um maior crescimento de microrganismos em misturas com 20% de biodiesel de soja, e 80% de diesel (B20), seguido pela mistura B5, e então por B100. Estes autores constataram que a maior contagem de bactérias estava relacionada a maior quantidade de óleo diesel; enquanto que a contagem de fungos foi maior em maiores proporções de óleo de canola no combustível. No presente estudo, verificou-se que aos 40 dias houve uma redução dos valores de biomassa na interface óleo água em B5 e B10; enquanto em B50 e B100 os valores aumentaram. Estes valores podem estar relacionados a mudanças na comunidade microbiana, ou seja, em B5 e B10 pode-se ter a predominância de bactérias (que resulta em um peso seco inferior, quando comparada a biomassa fúngica), e um maior predomínio de fungos em B50 e B100; assim como verificado por Schelicher et al.[37].

Bücker et al. [17] avaliaram a suscetibilidade à biodegradação do diesel puro (B0), das misturas B5, B10 e B20, e de biodiesel puro (B100) por *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp durante o armazenamento simulado, em microcosmos com meio mínimo mineral, durante 60 dias. Os autores verificaram que a biomassa formada pelos fungos aumentou com o aumento da adição de biodiesel ao diesel, quando comparadas ao diesel puro (B0). Embora Bücker et al. [17] tenham utilizado um microrganismo isoladamente em cada microcosmo, em que não havia competição entre diferentes populações pela mesma fonte de carbono, os autores verificaram que a adição de biodiesel influenciou positivamente o crescimento microbiano, assim como observado no presente estudo, conduzido a partir de uma população mista, nativa do combustível, comprovando de fato a suscetibilidade deste biocombustível a deterioração microbiana.

3.3.3. Análise da biodegradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel(GC×qMS)

A análise inicial do biodiesel puro (qualitativa e semi-quantitativa) é apresentada na Tabela 3. A partir destes resultados foram selecionados os ésteres de ácidos graxos majoritários do biodiesel, e utilizados para a análise quantitativa da biodegradação do biodiesel nos tratamentos B5, B10, B50 e B100, pelos microrganismos nativos do combustível, após 40 dias.

Tabela 3.

Análise qualitativa e semi-quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel puro (65% soja e 35% sebo) utilizado no estudo.

Nome comum	Nome Formal	Abreviação	%
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	0,25
Ácido Palmítico	Ácido hexadecanóico	16:0	12,1
Ácido Palmitoleico	Ácidocis-9- hexadecanoico	16:1	0,25
Ácido Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	8,67
Ácido Oléico	Ácidocis-9-Octadecedoico	18:1 cis	33,77
Ácido Elaídico	Ácido trans -10-Octadecedoico	18:1 trans	2,05
Ácido Linoléico	Ácido cis-9,12- Octadecadienoico	18:2	41,27
Ácido Araquidônico	Ácido Eicosanóico	20:0	0,1
Total			98,46

Inicialmente foram calculadas as concentrações próximas para os ésteres de ácidos graxos metílicos quantificados nas amostras para B5, B10, B50 e B100, ao final de 40 dias para as condições com crescimento microbiano e controle, a partir das curvas analíticas (Material Suplementar 1). As equações obtidas para as curvas analíticas demonstraram que o método utilizado alcançou boa linearidade, sendo todos os coeficientes de determinação (R^2) para as faixas de concentração delimitadas apresentados no (Material Suplementar 1)

3.3.3.1.B100

A análise da biodegradabilidade dos ésteres ácidos graxos majoritários presentes no biodiesel utilizado no estudo (35% sebo e 65% soja) pode ser verificada na Tabela 4. No tratamento contendo o biodiesel puro (B100) a biodegradação dos ésteres de ácidos graxos com C_{18} apresentou a seguinte ordem $C18:2 > C18:1cis-9 > C18:0$. Este resultado concorda com o observado por KHOURY et al. [38] que verificaram a seguinte ordem na taxa de degradação de B100: $C18:3 > C18:2 > C18:1cis-9 > C18:0$, em 79 dias de avaliação, e puderam concluir que a taxa de degradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel (B100) depende da estrutura do éster de ácido graxo, do seu nível de insaturação, da configuração de duplas ligações, da presença (ou ausência) de conjugação, bem como da posição da dupla ligação.

O número, a posição e a geometria das duplas ligações na molécula do ácido graxo, afetam a taxa de oxidação, por exemplo, os isômeros cis são mais susceptíveis à oxidação do que os isômeros trans e os não-conjugados são mais reativos do que os conjugados [39]. No entanto, para isômeros com o mesmo número de carbonos e a mesma posição de duplas ligações, nosso estudo mostrou que o elanoato (C18:1 trans-9) apresentou 100% de degradação, e éster de ácido graxo oléico (C18:1 cis-9) apresentou em torno de 40% de degradação. Verificou-se que a degradação do C18:1 trans-9 está associada a fatores abióticos (como a oxidação), pois não foram observados os picos referentes a este carbono no tratamento controle (sem microrganismos), bem como não foram observados no tratamento com microrganismos.

Embora as cadeias de ácidos graxos C16:0 e C18:0 apresentem características similares, em relação a estabilidade oxidativa, verificou-se que C16:0 apresentou maior percentual de biodegradação do que C18:0. O mesmo foi verificado por Bucker et al. [16], que avaliaram a suscetibilidade a biodegradação do diesel puro (B0), das misturas B5, B10 e B20, e de biodiesel puro (B100) por *A. fumigatus*, *Paecilomyces* sp, *Rhodotorula* sp. e *Candida silvicola* durante o armazenamento simulado, em microcosmos com meio mínimo mineral, durante 60 dias. A análise do tratamento contendo apenas biodiesel puro (B100) mostrou que C₁₆ foi preferencialmente consumido por todos os fungos, em relação aos demais ácidos graxos C18, C18:1, C:18:2 e C18:3 avaliados. E o percentual de degradação dos ésteres de ácidos graxos de C18 variou entre os fungos avaliados.

3.3.3.2. Misturas B5, B10, B50

Na Tabela 4 pode-se observar que a extensão da degradação dos ésteres de ácidos graxos nas misturas B5, B10 e B50 diminuiu a medida que aumentou-se a concentração de biodiesel na mistura; exceto C18:0 que apresenta 12% de degradação, em B50, sendo este percentual de biodegradação 47,5% maior do que em B10, e 87% maior do que o observado em B5.

Tabela 4.

Porcentagem da degradação dos ésteres de ácidos graxos avaliados presentes nas misturas B5, B10, B50 e em B100 após 40 dias de incubação.

Ésteres de ácidos graxos	Biodegradação (%)*			
	B100	B50	B10	B5
Metil Miristato (C14:0)	41,1	12,4	43,9	71,4
Metil Palmitato (C16:0)	49,7	16,3	31,0	50,7
Metil Esteárico (C18:0)	38,1	12,0	6,3	2,1
Metil Oléico (C18:1CIS)	40,9	29,4	38,3	54,7
Metil Linoléico (C18:2)	41,4	23,3	32,4	68,6

* *O percentual de biodegradação foi calculado da seguinte maneira: % biodegradação = [(concentração ésteres de ácidos graxos no controle - concentração dos ésteres de ácidos graxos na amostra) / concentração do ésteres de ácidos graxos na amostra controle] × 100.*

Silva et al. [42] em estudo sobre a biodegradação de diesel e misturas com biodiesel, em um microcosmo com solo da Floresta Atlântica (Brasil), verificaram que, após 60 dias, a degradação dos ésteres de ácidos graxos totais diminuiu com o aumento da concentração de biodiesel na mistura, e consequentemente observaram um aumento na degradação do diesel. Os autores verificaram que nos microcosmos contaminados com diesel (B0) e com B5 a biodegradação total do combustível foi 35 e 51 %, respectivamente; e, estes valores foram menores do que os valores de biodegradação total do combustível observada nos solos contaminados com maiores teores de biodiesel, B20, B50 e B100 (80%, 62% e 84% de biodegradação, respectivamente).

O efeito da adição do biodiesel sobre a degradação do combustível parece estar associado aos estágios iniciais do processo de deterioração, como observado por Lisiecki et al.[41]. Os autores avaliaram a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos em misturas diesel e biodiesel (B0, B10, B20, B30, B40, B50, B60, B70, B80, B90 e B100) em microcosmos contendo areia, onde adicionaram um consórcio de bactérias degradadoras de petróleo (bioaugmentação), após 578 dias. Os resultados sugerem que a extensão de biodegradação, tanto dos hidrocarbonetos alifáticos, quanto dos aromáticos foram influenciados pela adição de biodiesel, independentemente da concentração de biodiesel na mistura.

O aumento no percentual de biodegradação do C18:0 em B50 (em relação a B5 e B10), pode estar relacionada a maior quantidade de biodiesel na mistura, o que por sua vez influencia na interação do combustível com a fase aquosa do microcosmo. Cazarolli et al. [42] em estudo sobre a suscetibilidade a biodegradação por *Pseudallescheria boydii* de biodieseis puros, proveniente de diferentes oleaginosas (soja, oliva e linhaça), verificaram que os ésteres de ácidos graxos de cadeia longo, presentes nos três biodieseis, migraram parcialmente para a fase aquosa do microcosmo, o que por sua vez pode influenciar na utilização destes ésteres pelos microrganismos.

Verificou-se que na mistura B5 todos os ésteres de ácidos graxos apresentaram um percentual de biodegradação acima de 50%, exceto o éster contendo o ácido graxo estearato (C18:0) apresentando 2,1% de degradação (Tabela 4). Assim, como em B100, observou-se a mesma ordem no percentual de biodegradação dos ésteres com C₁₈ (C18:2 >C18:1cis-9 >C18:0). A mistura B10 apresentou menores percentuais de biodegradação dos ésteres de ácidos graxos (Tabela 4), quando comparada a B5; sendo o C18:0 o único que apresentou maior degradação, 65,5% a mais do que em B5. A ordem de biodegradação do C₁₈ foi C18:1cis-9 >C18:2 >C18:0. A mistura 50% de biodiesel e 50% diesel (B50), apresentou menores percentuais de degradação dos ésteres de ácidos graxos em relação às misturas B10 e B5, exceto para C18:0 com 12% de degradação. A ordem de biodegradação do C₁₈ foi C18:1cis-9 >C18:2 >C18:0. DeMello et al. [43] verificaram que a taxa de degradação entre os diferentes ésteres de ácidos graxos do C₁₈ não tinha relação com o grau de insaturação, assim como observado nas misturas (B5, B10 e B50) no presente estudo.

De acordo com a literatura [11], o biodiesel está sujeito a sofrer degradação por processos de transformação abióticos, tais como a hidrólise, oxidação, e a polimerização (na presença de determinados catalisadores). Yassine et al.[17] em estudo sobre a cinética de biodegradação aeróbia e a mineralização de seis misturas de diesel e biodiesel de soja (B0, B20, B40, B60, B80 e B100) por culturas microbianas aclimatadas, verificaram que a degradação dos ésteres de ácidos graxos avaliados nas misturas ocorreu por processos de degradação abiótica.

3.3.4. Análise por Infravermelho (IV)

A análise multivariada dos espectros de infravermelho das amostras de B100, após 40 dias, evidenciou que houve separação entre os tratamentos e seus respectivos controles, em que a triplicata com maior transformação mostrou que pode ter ocorrido o consumo de grupos metila terminais, dos ésteres do biodiesel. O mesmo pode ser observado para as amostras B50 e B10. Em relação ao tratamento B5, foi possível observar que no controle (sem microorganismos) houve uma menor degradação da fração biodiesel em relação ao tratamento com crescimento microbiano (Fig. 2). Neste caso, nas amostras com crescimento microbiano verificou-se a diminuição do sinal referente ao estiramento do grupo C(=O)-OR, na região 1210-1160 cm^{-1} , o que, por sua vez, permite inferir que houve o consumo da porção oxigenada da cadeia dos ácidos graxos que compunham os ésteres, diferente do observado em B100, B50 e B10, em que se observou o consumo dos grupos metila dos ésteres de ácidos graxos, quando comparados os tratamentos com crescimento microbiano e os seus respectivos controles.

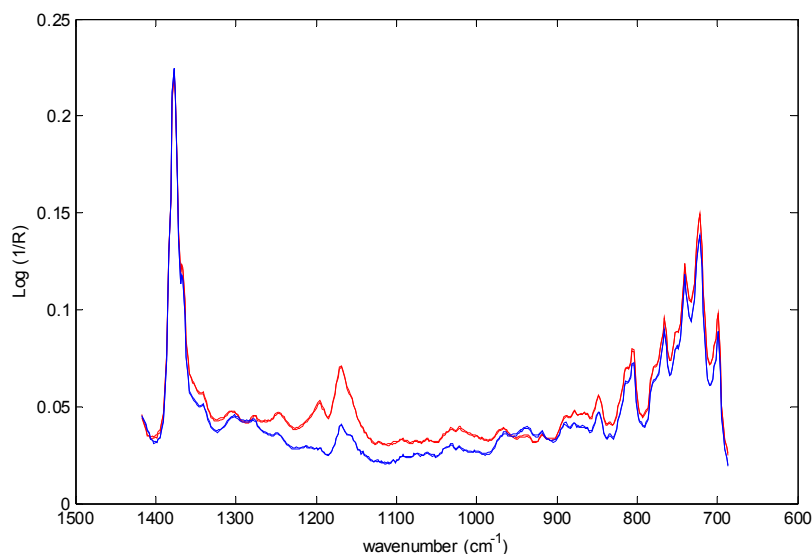


Fig. 2. Espectros de HATR-FTIR da fase óleo para o controle (vermelho) e para o tratamento (azul) após 40 dias.

A técnica HATR/FTIR permite a avaliação dos ésteres metílicos ou etílicos do biodiesel por estes apresentarem bandas no infravermelho distintas daquelas bandas características do óleo diesel. Sinais na região 1300 a 800 cm^{-1} indicam a sobreposição de bandas entre os óleos e seus respectivos ésteres. Sinais na faixa de 1275-1185 cm^{-1}

podem ser atribuídos à deformação axial das ligações C(=O)-OR dos ésteres, enquanto que os sinais na faixa de 1160-1050 cm^{-1} podem ser atribuídos à deformação axial assimétrica de ligações O-C-C[44].

O óleo diesel é composto por cerca de 80-85% de hidrocarbonetos saturados (principalmente alcanos simples, ramificados e cicloalcanos), e de 15 a 25% de hidrocarbonetos aromáticos (como os alquilbenzenos). De um modo geral, o óleo diesel apresenta cadeias $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$, mas pode variar entre $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ a $\text{C}_{15}\text{H}_{32}$ [17,45,46]. O biodiesel é definido comumente como uma mistura de ésteres de ácidos graxos que devem compor 97% do combustível, sendo os 3% restantes representados por mono, di ou triglicerídeos remanescentes do processo de transesterificação do óleo vegetal [5,6,47]. A matéria prima do biodiesel utilizado o torna mais rico em termos de compostos, pois biodiesel de soja e o biodiesel de sebo apresentam diferenças no tamanho das cadeias de ésteres de ácidos graxos e no grau de insaturações. Estas diferenças podem influenciar as propriedades do biodiesel, bem como as propriedades do combustível nas misturas com diesel de petróleo [48], e isto pode influenciar diretamente o processo de biodegradação do combustível.

Uma provável rota para a biodegradação do biodiesel consiste primeiramente da hidrólise do metil ou etil éster por uma esterase (ou lipase), produzindo um ácido graxo e um álcool [39]. Na segunda etapa, os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação e degradados a ácido acético e a um ácido graxo com dois carbonos a menos. Nesta reação, primeiro, ocorre a conversão do ácido graxo a éster coenzima A (CoA). A seguir, o éster-CoA é oxidado na posição beta, e dois átomos de carbono do final da molécula são clivados para produzir a acetil-CoA. Este processo de encurtamento da molécula continua até o ácido inicial ser degradado completamente a acetil-CoA. Assim, por exemplo, o ácido linolêico, um ácido graxo de 18 carbonos, sofrerá oito reações oxidativas, perdendo em cada uma delas dois átomos de carbono na forma de acetil-Coa. Ao final desse processo os dois carbonos restantes estarão na forma de acetil-Coa. Quando os ácidos graxos apresentam duplas ligações ($\text{C}_{18:2}$, ou $\text{C}_{18:1}$, por exemplo), a β -oxidação é interrompida, pois duas reações adicionais são requeridas, a fim de converter a dupla ligação em uma ligação simples, prosseguindo a β -oxidação.

Os ácidos graxos podem ser utilizados no metabolismo microbiano, para a síntese de biomassa celular, por exemplo [38,39,49,50].

3.3.5. Estrutura da comunidade microbiana por sequenciamento de alto rendimento

2.3.5.1 Fungos

Na Fig.3 são apresentados os resultados do sequenciamento pela Plataforma ILLUMINA MiSeq para a comunidade fúngica dos tratamentos B50 e B100, após 40 dias de incubação. Verificou-se que houve 100% de predominância do Filo Ascomicota em ambas condições (mistura B50 e biodiesel puro, B100). O gênero prevalente nas amostras B50 e B100 foi *Cladosporium* sp., com abundância relativa de 82% e 60%, respectivamente.

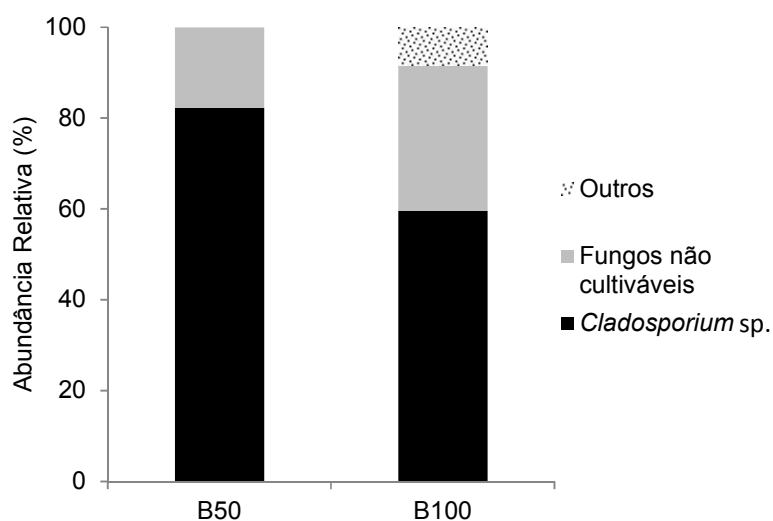


Fig.3. População microbiana analisada pela comparação das sequências de leitura geradas pela análise metagenômica com os dados do banco de classificação RDP. São apresentados os dados de abundância relativa dos microrganismos aos 40 dias.*Outros refere-se a outros microrganismos eucarióticos não cultiváveis e não classificados.

A suscetibilidade a contaminação microbiana do combustível, e sua consequente biodegradação por fungos tem sido relatada na literatura. Esta contaminação está relacionada a diferentes gêneros e espécies, sendo que o fungo conhecido pela denominação de sua fase anamórfica *Hormoconis resinae* (Lindau) Arx & G.A. de Vries. foi um dos primeiros grupos microbianos a ser isolado de tanques de

armazenamento contaminado. Um sinônimo também tem sido utilizado para este fungo, *Cladosporium resinae* (Lindau) G.A, e este é um dos gêneros fúngicos mais frequentemente encontrados em combustíveis como óleo diesel, gasolina e querosene de aviação [51–55]. A espécie *Hormoconis resinae* é um dos fungos mais deteriorogênicos do diesel e de querosene de aviação descritos na literatura [8,9,32,56–58]. O combustível utilizado neste experimento apresentava-se com baixos níveis de contaminação ($<2 \text{ UFC.ml}^{-1}$), pois foi utilizado como recebido da distribuidora, o crescimento deste fungo e sua predominância em B50 e B100, pode estar associada a sua capacidade de esporular no combustível e se manter em condições viáveis durante um grande período de tempo em condições adversas. Assim, em condições adequadas, como a presença de uma fase aquosa, seu metabolismo pode ser ativado, permitindo seu desenvolvimento.

A capacidade de crescimento do fungo *H. resinae* em diesel metropolitano foi avaliada por Bento et al.[8]. Os autores verificaram que *H. resinae* degradou preferencialmente os n-alcenos C11 (degradou cerca de 22%) após 60 dias de incubação, além disso, seu crescimento na interface óleo-água mostrou o potencial deteriorogênico desta cepa. Embora este gênero tenha muitos relatos o associando a biodeterioração do diesel, para biodiesel estudo realizado por Soriano et al. [59] é um dos primeiros relatos de identificação do fungo do gênero *Cladosporium* sp. como contaminante de misturas de diesel e biodiesel

3.3.5.2. Bactérias

Na Fig.4 pode-se observar a composição da comunidade bacteriana do biofilme formado na interface óleo/água em B5, B10, B50 e B100, aos 40 dias. Pode-se verificar que os perfis taxonômicos são relativamente similares em nível de Filo/Classe nas quatro diferentes misturas de diesel e biodiesel; e, verifica-se a predominância de *Actinobacteria*, *Firmicutes*, e *Proteobacteria*, em nível de Filo; e, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Bacilli*, em nível de Classe. Embora os perfis taxonômicos sejam similares, os tratamentos B5, B10, B50 e B100 apresentam diferenças em relação à abundância relativa dos grupos taxonômicos que compõem a comunidade.

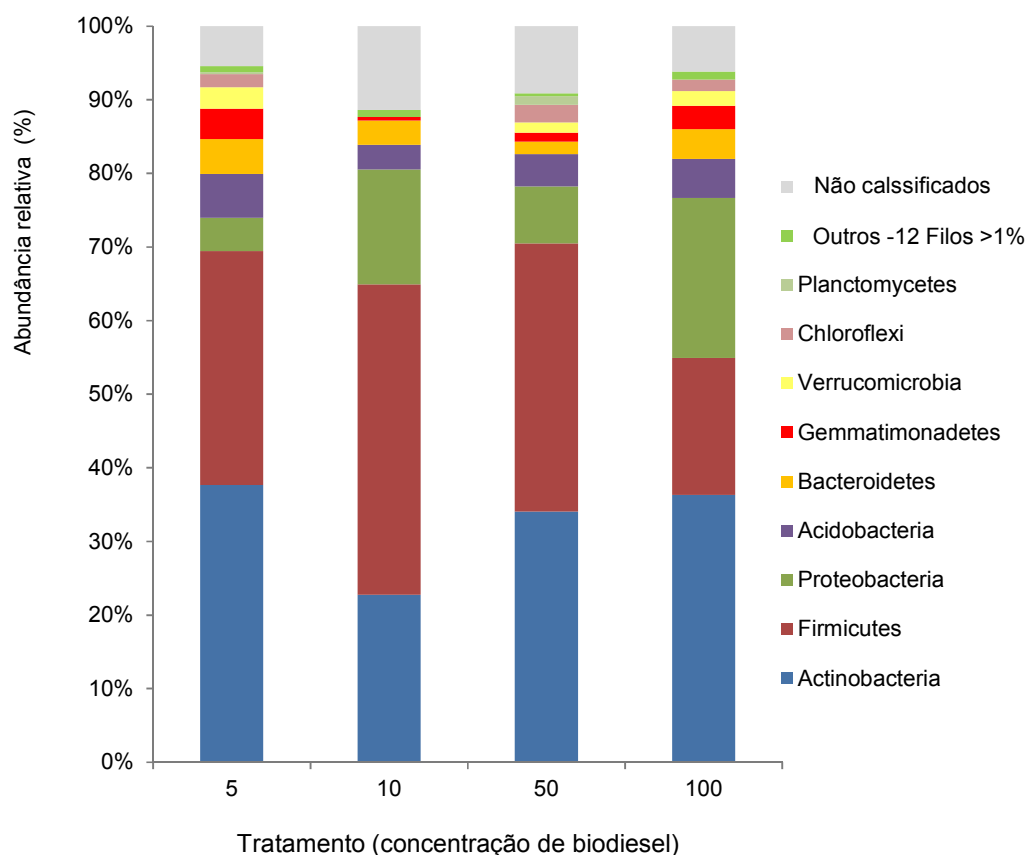


Fig.4. População microbiana analisada pela comparação das sequências de leitura geradas pela análise metagenômica com os dados do banco de classificação RDP. São apresentados os dados de abundância relativa dos microrganismos aos 40 dias. *Outros refere-se a outros microrganismos eucarióticos não cultiváveis e não classificados.

Entre os filios detectados, *Actinobacteria* e *Firmicutes* foram os mais abundantes. Doze filios com abundância menor que 1% foram agrupados (em aproximadamente 5% do total de leituras). Os filios não classificados pelo RDP variaram de 5 a 10% do total de leituras. Nas concentrações B10, B50 e B100 houve uma maior a abundância das *Proteobacteria*, e dentre elas, as dominantes foram das classes *Gama* e *Betaproteobacteira*.

A abordagem molecular da diversidade microbiana em sistemas óleo-água foi avaliada por White et al. [18], utilizando DGGE e Pirosequenciamento 454. Os autores utilizaram o sobrenadante resultante da centrifugação de amostras combinadas da fase

óleo, da interface óleo-água, e da fase aquosa de amostras da mistura de diesel e biodiesel e os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* apresentaram a maior frequência relativa. Em estudo conduzido por Suflita et al. [60], após coleta de amostras de diesel naval, biocombustível de algas e de biodiesel de canola diesel com teor ultra baixo de enxofre (ULSD), e biodiesel de soja, os autores, utilizando clonagem e sequenciamento Sanger, constataram que os Filos mais abundantes eram *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Além disso, verificaram a presença, em menores proporções, assim como neste estudo, dos Filos *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* e *Gemmatimonadetes*. O presente trabalho constatou resultados semelhantes utilizando sequenciamento de alto rendimento, com a Plataforma Illumina Mi-Seq.

Na Tabela 5, está a relação das Famílias (Bacteria) identificadas nos tratamentos com B5, B10, B50 e B100, ao final de 40 dias, e respectiva classificação em relação a Ordem, Classe e Filo a que estas famílias pertencem.

Tabela 5.

Abundância relativa (%) das Famílias de Bacteria nas amostras B5, B10, B50 e B100, ao final de 40 dias, e respectiva classificação em relação a Ordem, Classe e Filo a que estas famílias pertencem.

Filo	Classe	Ordem	Família	Abundância Relativa (%)			
				B5	B10	B50	B100
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	8	9	1	2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	11	1	0	4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	4	1	2	4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	2	1	2	3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Conexibacteraceae</i>	3	0	1	2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	1	0	0	3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	2	0	1	1
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>	0	0	3	1
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	11	3	4	10
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	2	3	26	11
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	1	3	1	1
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	6	9	29	8
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	2	1	1	2
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	1	0	2	3
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	2	3	9	1
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	2	3	2	2
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	13	39	2	1
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	10	6	1	1
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	2	1	0	0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	10	6	27
<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	1	1	2	2
Outros				14	9	6	10

A fim de correlacionar os grupos microbianos com a biodegradação do biodiesel, foram realizadas análises dos componentes principais entre a abundância relativa de cada família nos tratamentos B5, B10, B50 e B100, em relação ao teor de biodiesel em cada amostra (Fig.5).

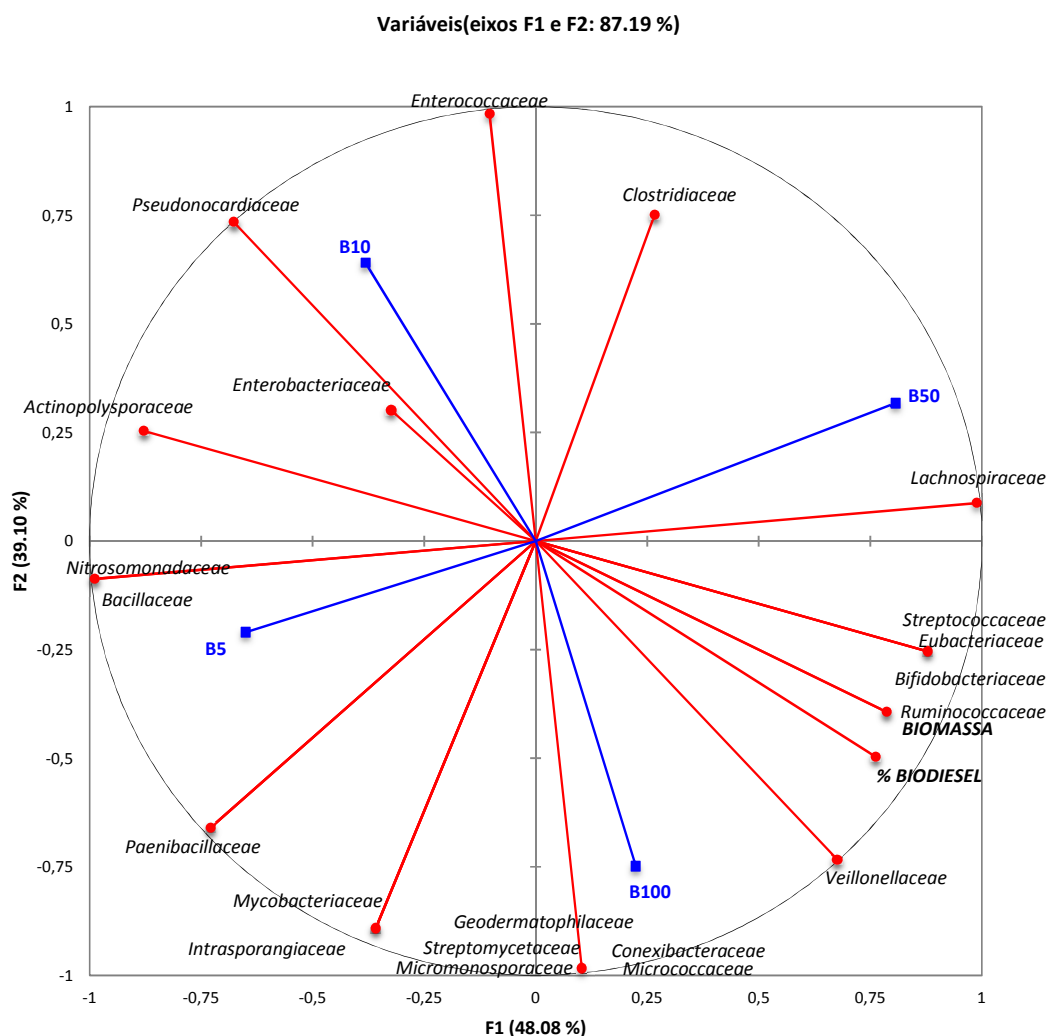


Fig. 5. Análise dos componentes principais dos resultados relacionados a biodegradação do biodiesel, aos diferentes percentuais de biodiesel adicionados ao diesel e composição da comunidade bacteriana com sequenciamento de alto rendimento). Azul: variáveis suplementares; vermelho: variáveis ativas.

Na Fig. 5, observa-se que as diferentes concentrações de biodiesel no diesel (B5, B10, e B50) propiciaram o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas, o que foi

possível de se detectar pela análise de componentes principais. A análise agrupou a ocorrência das famílias (%) em 2 tipos de misturas utilizadas as de B5 e B10 e de B50 e B100, evidenciando que existe um gradiente químico/nutricional no qual as comunidades microbianas se diversificam, ou há a dominância de determinados microrganismos. A análise por PCA (Fig.5) deixa evidente que a diversidade de microrganismos é maior em amostras de B50 e B100 (14 Famílias), ao passo que B5 e B10 se agruparam com 5 Famílias diferentes de microrganismos

Nitrosomonadaceae e *Bacillaceae* (Firmicutes, Bacilli) formaram um cluster com o tratamento B5 (Fig.5). *Pseudonocardaceae*, *Actinopolysporaceae* (*Actinobacteria*), *Enterococcaceae* (Firmicutes, Bacilli), *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*) ocorreram mais nas misturas B10 (Fig.5). A mistura de diesel e biodiesel B50 apresenta-se em um cluster com *Lachnospiraceae* (Firmicutes, Clostridia) (Fig.5).

As famílias *Streptomycetaceae*, *Micrococcaceae*, *Conexibacteraceae*, *Geodermatophilaceae* (*Actinobacteria*), *Veillonellaceae* (Firmicutes, Negativigutes) formaram um cluster com B100 (biodiesel puro) (Fig. 5).

Realizou-se um PCA que agrupou as famílias mais abundantes detectadas, com a maior porcentagem de degradação do ésteres de ácidos graxos do biodiesel em cada amostra (Fig.6). A maior degradação do éster C18:2 ocorreu nas amostras onde as famílias *Streptococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Bifidobacteriaceae* e *Ruminococcaceae* estavam em maior abundância, associando a degradação deste éster (C18:2) a estas famílias. A maior biodegradação dos ésteres C18:0, C18:1CIS e C16:0 ocorreu nas amostras em que as famílias *Peniballiliaceae*, *Intrasporangiaceae* e *Mycobacteriaceae* foram mais abundantes. E da mesma forma, a maior biodegradação do metil éster C14:0 ocorreu nas amostras onde as famílias *Nitrossomonadaceae* e *Bacillaceae* foram detectadas em maior abundância.

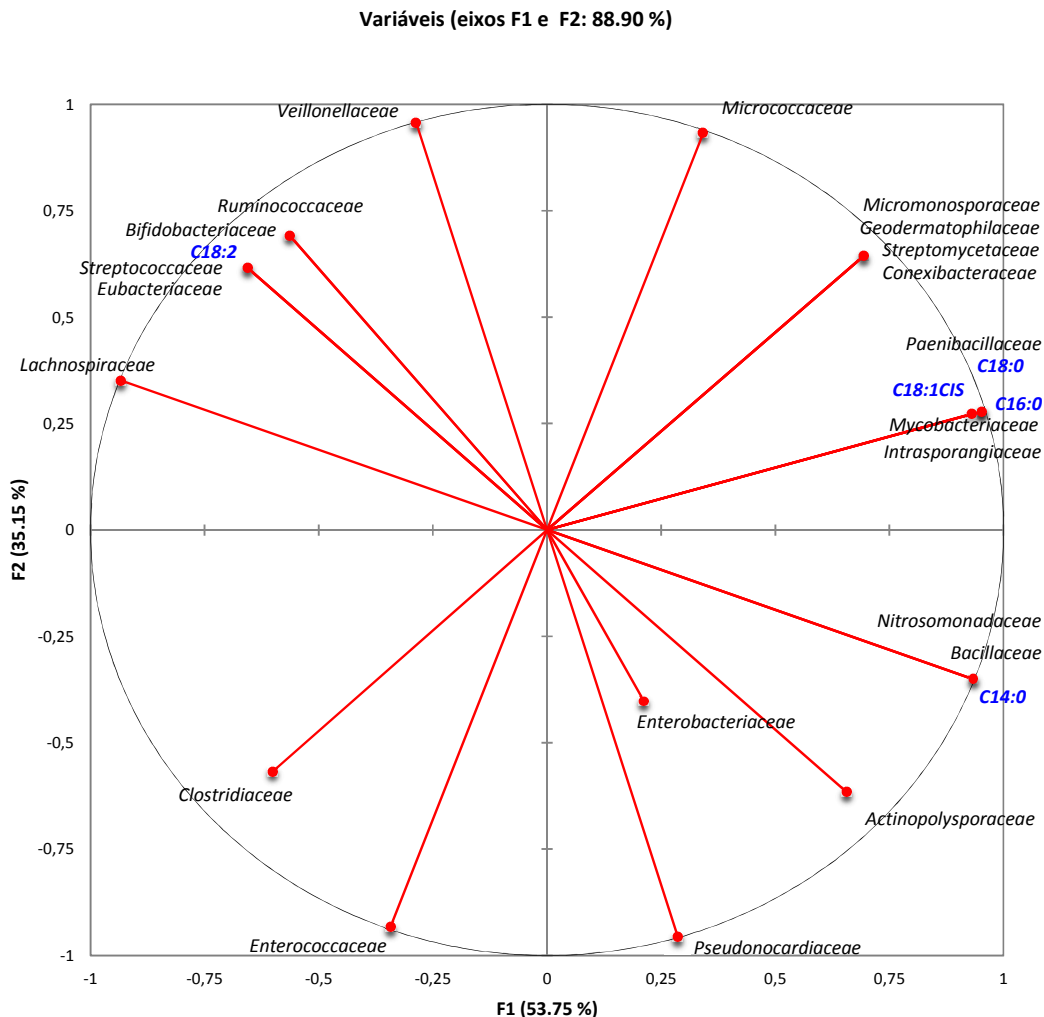


Fig. 6. Análise dos componentes principais dos resultados relacionados a biodegradação dos ésteres, e a comunidade bacteriana mais abundante (Plataforma Illumina). Azul: variáveis suplementares. Vermelho: variáveis ativas.

Os padrões formados no PCA mostram que o teor, ou seja, a concentração de biodiesel na mistura com diesel influencia a composição da comunidade microbiana durante o armazenamento. Além disso, as análises indicam que alguns grupos microbianos podem estar associados a biodegradação de ésteres de ácidos graxos específicos. Restrepo-Flórez et al. [61] realizaram em estudo utilizando a metodologia *community level physiological profiling* (CLPP) e sequenciamento do gene 16S rRNA a partir de biblioteca de clones de biofilmes formados em placas de polietileno e diferentes misturas de diesel e biodiesel. Os autores verificaram que a concentração de biodiesel

teve influência sobre a comunidade microbiana após análises dos resultados utilizando a ferramenta de análise estatística de componentes principais.

Actinobacteria compreende uma diversificada classe morfológica e fisiológica de microrganismos; e, cerca de 220 gêneros já foram relatados com capacidade de degradar hidrocarbonetos [57]. Em relação a biodegradação de biodiesel, o Filo *Actinobacteria* foi encontrado em biofilme formados na interface óleo água em microcosmo com B10 [12]. A ordem *Actinomycetales*, da qual pertencem as famílias *Pseudonocardiaceae*, *Streptomycetaceae* e *Micrococcaceae*; *Actinopolysporaceae*; *Micromonosporaceae* (da sub-ordem *Micromonosporineae*) e *Bifidobacteriaceae* encontradas no presente trabalho ainda não possuem registro para degradação de combustíveis, seu crescimento pode estar associada ao ésteres de ácidos graxos, do biodiesel. Outras famílias como *Mycobacteriaceae*, *Conexibacteraceae*, *Intrasporangiaceae*, *Geodermatophilaceae* possuem espécimes associados à biodegradação de hidrocarbonetos [62]. As actinobactérias vêm sendo encontradas e isoladas a partir de diferentes nichos, como solo, sedimentos, em matéria orgânica em decomposição, lodo ativado, solos e água contaminados com hidrocarbonetos [62–64]. Nestes ambientes podem ser encontradas actinobactérias que possuem genes relacionados a expressão de enzimas envolvidas na biodegradação de alcanos, relacionados ao sistema alcano mono-oxigenase *alkB* [62–64].

Firmicutes tem sido um filo de microrganismos frequentemente encontrado em análises de diversidade da comunidade bacteriana em combustíveis. São microrganismos Gram positivos, formadores de endósporos, e por isso são mais tolerantes a condições ambientais adversas [50]. White et al. [18] realizaram estudo sobre a composição de comunidade microbianas de amostras de diesel, por Pirosequenciamento 454, do gene 16S rRNA, e verificaram que um dos filios mais abundante nas amostras era o grupo Firmicutes, com a predominância das Classes *Clostridia* e *Bacilli*. Suflita et al. [52], utilizando a mesma técnica, verificaram que Firmicutes era um dos filios mais abundantes nas diferentes amostras de diesel analisadas, no entanto nenhum dos DNAs recuperados foi relacionado ao grupo aneróbio *Clostridia*, apenas ao grupo aeróbio facultativo *Bacilli*. Bucker et al. [12] em análise de amostras de DNA obtido a partir de

crescimento microbiano em microcomos com meio BH e B10, e sequenciado pela Plataforma Illumina Hiseq, verificaram a presença *Clostridia* e *Bacilli*, após 60 dias de incubação, mas em baixa abundância relativa (<1,5%).

Meyer et al. [58] avaliaram e constataram a capacidade de *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* (isolados de solo *landfarming* e de resíduos de centrifuga de biodiesel) de biodegradar a mistura B20. Borah et al. [66] verificaram que o isolado *Bacillus cereus* DRDU1, proveniente de motor de automóvel, degradou 99% do diesel, em condições de crescimento com meio BH. Estes e outros estudos mostram que microrganismo da Classe *Bacilli* são capazes de utilizar o diesel e o biodiesel como fonte de carbono e energia .

Famílias encontradas no trabalho, como *Lachnospiracea* e *Ruminococcaceae* (*Clostridia*) não apresentam relatos de biodegradação de combustíveis como o diesel e biodiesel, e são microrganismos anaeróbios obrigatórios, encontrados no trato intestinal de mamíferos. A presença pode ser devido a natureza do biodiesel produzido, que apresenta 35% de sebo em sua composição. Neste caso, estes representantes podem ter sido carregados na forma de endósporo no biodiesel [67].

Proteobacteria tem sido relatada e associada a contaminação de combustíveis por estudos de sequenciamento de alto rendimento [12,18,60], bem como em estudos com microrganismos isolados e pertencentes a este filo. A Família de *Proteobacteria* com maiores abundâncias relativas nas amostras foi *Enterobacteriaceae* (Tabela 4). As enterobactérias são microrganismos Gram-negativos e são anaeróbios facultativos, alguns gêneros isolados como *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus* mostraram a capacidade de biodegradar diesel, biodiesel ou outros combustíveis [68–71]. Bucker et al [12], encontraram filios Archea, *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, em biofilmes formados durante o armazenamento simulado de B10, com uma população inicial nativa e também a ela adicionado um inóculo não caracterizado, no presente estudo, representantes de Archea não foram detectados.

A extração de DNA de amostras biológicas na presença de produtos como óleo diesel e biodiesel, é um procedimento que requer uma quantidade suficiente de biomassa para que seja conduzida. Durante o processo de extração, perdas de DNA ocorrem juntamente com os procedimentos que recuperam e limpam o DNA, e estas perdas podem ser maiores na presença do óleo, que demanda processos adequados para removê-lo da amostra processada. Assim, nestas amostras a dificuldade em extrair o DNA pode interferir em sua qualidade e quantidade finais [60,72,73]. Além disso, segundo Saraiva et al [74] estas *biases* nas etapas de extração de DNA, bem como na amplificação por PCR, na escolha do primer e no sequenciamento, pode apresentar algum grau de interferência nos resultados obtidos. Neste caso, o DNA recuperado em B5 e B10 foi utilizado apenas na análise para BACTERIA e ARCHEA, já que a quantidade recuperada não foi suficiente para a análise de FUNGI. No presente estudo, verificou-se a presença de sequências que foram relacionadas a microrganismos não cultiváveis ou que não puderam ser classificadas, o que pode representar novas populações relacionadas a degradação de hidrocarbonetos, ou de ésteres de ácidos graxos.

3.4. Conclusões

Durante o armazenamento simulado, o crescimento microbiano na fase aquosa não apresentou uma correlação com o teor de biodiesel na mistura, no entanto, na interface óleo-água o crescimento foi maior nas amostras com maior concentração de biodiesel (B50 e B100). Os resultados obtidos pela análise do sequenciamento de alto rendimento, com a Plataforma Illumina, mostram que estrutura e a composição das populações fúngicas e bacterianas nativas nos biofilmes formados na interface óleo-água durante o armazenamento foram influenciadas pela concentração de biodiesel na mistura. Os agrupamentos mostram que a diversidade de microrganismos foi maior em amostras de B50 e B100 (14 famílias), ao passo que B5 e B10 se agruparam com 5 famílias diferentes de microrganismos, ou seja houve uma relação entre os tratamentos com maior biomassa formada e a diversidade da comunidade. No entanto, esta mesma relação não se observou para a biodegradação dos ésteres, em que verificou-se que houve uma maior biodegradação na mistura B5, exceto C18:0, quando comparada a as demais misturas (B50 e B10).

O biodiesel é uma alternativa viável à utilização de combustíveis fósseis, porém mais estudos são necessários para avaliar quais os grupos de microrganismos são responsáveis pela biodeterioração do combustível quando armazenado, o que pode ser decisivo na tomada de decisão quanto a formulação e regulação da dosagem de agentes anti-microbianos no sentido de preservar sua qualidade e garantir um produto adequado ao consumidor final

Agradecimentos

As atividades deste projeto foram financiadas pelo CNPq e CAPES. Também agradecemos a Ipiranga Produtos de Petróleo por fornecer os combustíveis e pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas

- [1] ANP - Agência Nacional do Petróleo GNEB. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2014.
- [2] Lopes M, Serrano L, Ribeiro I, Cascão P, Pires N, Rafael S, et al. Emissions characterization from EURO 5 diesel/biodiesel passenger car operating under the new European driving cycle. *Atmos Environ* 2014;84:339–48. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.11.071>.
- [3] Atadashi IM, Aroua MK, Aziz ARA, Sulaiman NMN. Refining technologies for the purification of crude biodiesel. *Appl Energy* 2011;88:4239–51. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.05.029>.
- [4] Guo M, Song W, Buhain J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renew Sustain Energy Rev* 2015;42:712–25. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.013>.
- [5] Atabani a. EE, Silitonga a. SS, Badruddin IA, Mahlia TMIMI, Masjuki HHH, Mekhilef S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew Sustain Energy Rev* 2012;16:2070–93. doi:[10.1016/j.rser.2012.01.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.003).
- [6] Khan TMY, Atabani AE, Badruddin IA, Badarudin A, Khayoon MS, Triwahyono S. Recent scenario and technologies to utilize non-edible oils for biodiesel production. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;37:840–51. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.064>.

- [7] Bento FM, Gaylarde CC. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *Int Biodeterior & Biodegrad* 2001;47:107–12.
- [8] 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 Microbiol Biotechnol* 2005;21:135–42 LA – English. doi:10.1007/s11274-004-3042-2.
- [9] Passman FJ. *Fuel_and_Fuel_System_Microbiology_Fundam* 2003:47.
- [10] Passman FJ. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 2013;81:88–104. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002.
- [11] Jakeria MR, Fazal MA, Haseeb ASMA. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;30:154–63. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.09.024.
- [12] Bückner F, Barbosa CS, Quadros PD, Bueno MK, Fiori P, Huang C t., 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.
- [13] Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Ray RI, Davidova I a., Lyles CN, et al. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. *Energy & Fuels* 2010;24:2924–8. doi:10.1021/ef100084j.
- [14] Sørensen G, Pedersen D V, Nørgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresour Technol* 2011;102:5259–64.
- [15] Cyplik P, Schmidt M, Szulc A, Marecik R, Lisiecki P, Heipieper HJ, et al. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresour Technol* 2011;102:4347–52.
- [16] Bückner F, Santestevan NA, Roesch LF, Seminotti Jacques RJ, Peralba M do CR, Camargo FA de O, et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int Biodeterior Biodegradation* 2011;65:172–8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.008.
- [17] Yassine MH, Wu S, Suidan MT, Venosa AD. Aerobic biodegradation kinetics and mineralization of six petrodiesel/soybean-biodiesel blends. *Environ Sci Technol* 2013;47:4619–27.
- [18] White J, Gilbert J, Hill G, Hill E, Huse SM, Weightman AJ, 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;77:4527–38. doi:10.1128/AEM.02317-10.

- [19] Hill EC. Use of thixotropic biopolymers as an alternative to agar for the cultivation of microorganisms on solid media. *Polym Degrad Stab* 1998;59:121–8. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00150-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00150-X).
- [20] Braddock JF, Catterall PH. A Simple Method for Enumerating Gasoline- and Diesel-Degrading Microorganisms. *Bioremediat J* 1999;3:81–4. doi:10.1080/10889869991219226.
- [21] Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol* 2005;96:1049–55. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>.
- [22] APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association; 1999.
- [23] Van Den Dool H, Dec. Kratz P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 1963;11:463–71. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).
- [24] Da Cunha ME, Schneider JK, Brasil MC, Cardoso CA, Monteiro LR, Mendes FL, et al. Analysis of fractions and bio-oil of sugar cane straw by one-dimensional and two-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometry (GC × GC/qMS). *Microchem J* 2013;110:113–9. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.03.004>.
- [25] Silva TR, Verde LCL, Santos Neto E V, Oliveira VM. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *Int Biodeterior Biodegradation* 2013;81:57–70. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.005>.
- [26] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012;6:1621–4.
- [27] Borneman J, Hartin RJ. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4356–60.
- [28] Pearson WR, Wood T, Zhang Z, Miller W. Comparison of DNA Sequences with Protein Sequences. *Genomics* 1997;46:24–36. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/geno.1997.4995>.
- [29] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [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;12:1450013. doi:10.1142/S0219720014500139.
- [31] Giongo A, Crabb DB, Davis-richardson AG, Chauliac D, Mobberley M, Gano KA, et al. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons 2010;4:852–61. doi:10.1038/ismej.2010.16.PANGEA.
- [32] Gaylarde CC, Bento FM, Kelley J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev Microbiol* 1999;30:01–10. doi:10.1590/S0001-37141999000100001.
- [33] 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 Bio/Technology* 2007;6:315–37. doi:10.1007/s11157-006-9118-8.
- [34] Passman FJ, Dobranic JK. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional sulfur diesel fuels. 9 th Int. Conf. Stability, Handl. Use Liq. Fuels, 2005, p. 18–22.
- [35] Restrepo-Flórez J-M, Bassi A, Rehmann L, Thompson MR. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. *Bioresour Technol* 2013;147:456–63.
- [36] Owsianiak M, Chrzanowski Ł, Szulc A, Staniewski J, Olszanowski A, Olejnik-Schmidt AK, et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresour Technol* 2009;100:1497–500.
- [37] Schleicher T, Werkmeister R, Russ W, Meyer-Pittroff R. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. *Bioresour Technol* 2009;100:724–30.
- [38] Khoury RR, Ebrahimi D, Hejazi L, Bucknall MP, Pickford R, Brynn Hibbert D. Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. *Fuel* 2011;90:2677–83.
- [39] David Lee Nelson ALL. Lehninger. Principios de Bioquímica. Barcelona, Omega 2001;3a edición:120, 625, 632, 823.
- [40] Silva GS, Marques ELS, Dias JCT, Lobo IP, Gross E, Brendel M, et al. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Appl Soil Ecol* 2012;55:27–35.
- [41] Lisiecki P, Chrzanowski Ł, Szulc A, Ławniczak Ł, Białas W, Dziadas M, et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. *Fuel* 2014;116:321–7. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.009.
- [42] Cazarolli JC, Guzzatto R, Samios D, Peralba M do CR, Cavalcanti EH de S, Bento FM. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the

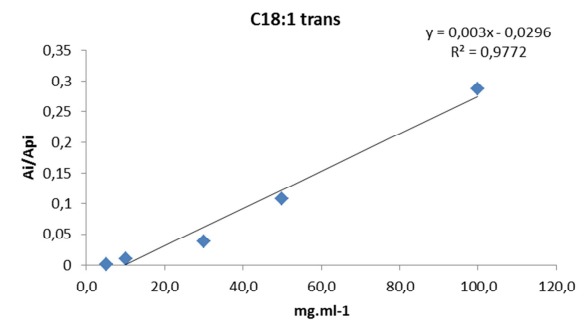
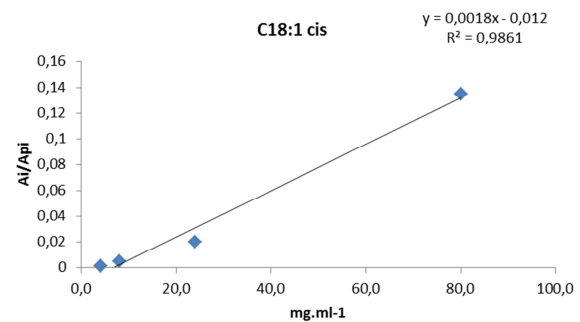
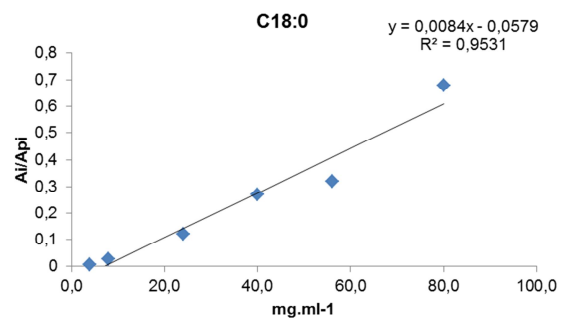
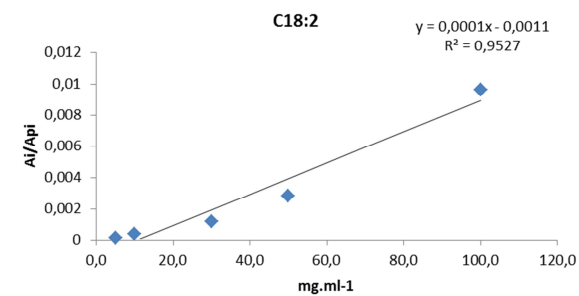
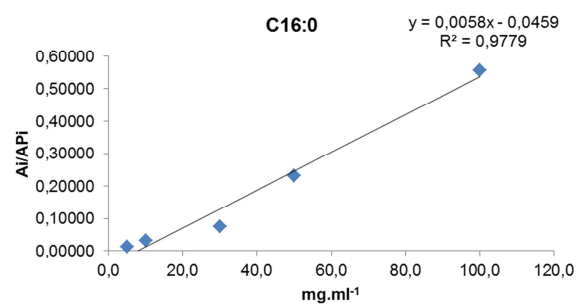
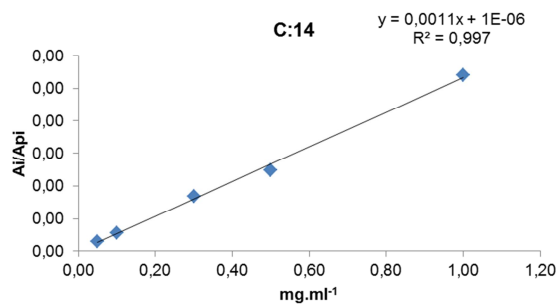
- deteriogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int Biodeterior Biodegradation* 2014;95, Part B:364–72. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.025>.
- [43] DeMello JA, Carmichael CA, Peacock EE, Nelson RK, Samuel Arey J, Reddy CM. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Mar Pollut Bull* 2007;54:894–904.
- [44] Colthup NB, Daly LH, Wiberley SEBT-I to I and RS (Third E, editors. Copyright 1990:iv. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-091740-5.50002-8>.
- [45] Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* 2011;2011:941810. doi:10.4061/2011/941810.
- [46] Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Petroleum microbiology. Part 2 - Recovery, biorefining and biodegradation processes. *Chim Oggi* 2006;24:65–7.
- [47] Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers Manag* 2009;50:14–34. doi:10.1016/j.enconman.2008.09.001.
- [48] Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Ceniceros E, Natarajan M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew Sustain Energy Rev* 2012;16:143–69.
- [49] Zhang X, Peterson C, Reece D, Haws R, Möller G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans Am Soc Agric Eng* 1998;41:1423–30.
- [50] Madigan M. Brock Biology of Microorganisms, 13th edn. *International Microbiology*; 2012. doi:10.1016/B978-1-4832-3136-5.50010-3.
- [51] M. Bento F, C. Gaylarde C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *Int Biodeterior Biodegradation* 2001;47:107–12. doi:10.1016/S0964-8305(00)00112-8.
- [52] Lopes PTC, Gaylarde C. Use of immunofluorescence to detect the fungus *Hormoconis resiniae* in aviation kerosine. *Int Biodeterior Biodegradation* 1996;37:37–40. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00110-7](http://dx.doi.org/10.1016/0964-8305(95)00110-7).
- [53] Hettige GEG, Sheridan JE. Interactions of fungi contaminating diesel fuel. *Int Biodeterior* 1989;25:299–309. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0265-3036\(89\)90004-3](http://dx.doi.org/10.1016/0265-3036(89)90004-3).
- [54] Hettige GEG, Sheridan JE. Effects of biocides on microbiological growth in middle distillate fuel. *Int Biodeterior* 1989;25:175–89. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0265-3036\(89\)90044-4](http://dx.doi.org/10.1016/0265-3036(89)90044-4).
- [55] Raikos V, Vamvakas SS, Kapolos J, Koliadima A, Karaiskakis G. Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels

- by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. *Fuel* 2011;90:695–700. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2010.09.030>.
- [56] Andrykovitch G, Neihof R. Fuel-soluble biocides for control of *Cladosporium resinae* in hydrocarbon fuels. *J Ind Microbiol* 1987;2:35–40. doi:10.1007/BF01569403.
- [57] Robbins JA, Levy R. A review of the microbiological degradation of fuel. In: Paulus W, editor. *Dir. Microbicidas Prot. Mater. SE - 11*, Springer Netherlands; 2005, p. 177–201. doi:10.1007/1-4020-2818-0_11.
- [58] Lee JS, Ray RI, Little BJ. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling* 2010;26:623–35. doi:10.1080/08927014.2010.504984.
- [59] Soriano AU, Martins LF, Santos de Assumpção Ventura E, Teixeira Gerken de Landa FH, de Araújo Valoni É, Dutra Faria FR, et al. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int Biodeterior Biodegradation* 2015;99:102–14. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.014>.
- [60] 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;28:1003–10.
- [61] Restrepo-Flórez J-M, Bassi A, Rehmann L, Thompson MR. Investigation of biofilm formation on polyethylene in a diesel/biodiesel fuel storage environment. *Fuel* 2014;128:240–7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.052>.
- [62] Kämpfer P. Actinobacteria. In: Timmis K, editor. *Handb. Hydrocarb. Lipid Microbiol. SE - 133*, Springer Berlin Heidelberg; 2010, p. 1819–38. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_133.
- [63] Rojo F. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes. In: Timmis K, editor. *Handb. Hydrocarb. Lipid Microbiol. SE - 59*, Springer Berlin Heidelberg; 2010, p. 781–97. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_59.
- [64] Fuentes S, Méndez V, Aguila P, Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:4781–94.
- [65] Meyer DD, Santestevan NA, Bucker F, Salamoni SP, Andreatza R, De Oliveira Camargo FA, et al. Capability of a selected bacterial consortium for degrading diesel/biodiesel blends (B20): Enzyme and biosurfactant production. *J Environ Sci Heal Part A* 2012;47:1776–84. doi:10.1080/10934529.2012.689227.

- [66] Borah D, Yadav RNS. Optimization of BH medium for efficient biodegradation of diesel, crude oil and used engine oil by a newly isolated *Bacillus cereus* strain DRDU1 from an automobile engine. *Biotechnology* 2014;13:181–5.
- [67] Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by lachnospiraceae and ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity* 2013;5:627–40.
- [68] Rajasekar A, Babu T, Pandian S, Maruthamuthu S, Palaniswamy N, Rajendran A. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34:589–98. doi:10.1007/s10295-007-0225-5.
- [69] Wongsap P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. *Curr Microbiol* 2004;49:415–22. doi:10.1007/s00284-004-4347-y.
- [70] Chao Y, Liu N, Zhang T, Chen S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. *Fuel* 2010;89:3358–64.
- [71] Kumari M, Abraham J. Efficiency of *Proteus* sp. in degrading diesel oil isolated from petroleum contaminated soil. *Pollut Res* 2013;32:443–6.
- [72] Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:1977–90. doi:10.1007/s00216-009-3150-9.
- [73] 2014_Evaluation and optimization of nucleic acid extraction - Atalho n.d.
- [74] Saraiva M, Zemolin A, Franco J, Boldo J, Stefenon V, Triplett E, et al. Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015:1–13. doi:10.1007/s10482-015-0384-8.

Material Suplementar 1

Curvas analíticas obtidas para a determinação quantitativa dos ésteres de ácidos graxos por GC/qMS



1

2

3

4

5

6

4. CAPÍTULO 2
AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DETERIOGÊNICA
POR MÉTODOS NÃO CULTIVÁVEIS DURANTE ARMAZENAMENTO
DE DIESEL, BODIESEL E MISTURAS (B5, B10, B50)

Este Capítulo foi organizado em forma de artigo e formatado segundo as normas da Revista Energy & Fuels, ISSN: 0887-0624, a qual será submetido.

Avaliação da comunidade microbiana
deteriorogênica por métodos não cultiváveis
durante armazenamento de diesel, biodiesel e
misturas (B5, B10, B50)

Francielle Bücke^{†}, Tiane M. Moura[†], Michele E. da Cunha[†], Patricia D. Quadros[†],
Sabrina Becker^a, Juciana Cazaroll[†], Elina B. Caramão[†], Ana Paula G. Frazzon[†],
Fátima M. Bento[†]*

[†] Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Universidade Federal do Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil

[†] Instituto de Química, Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica, Universidade Federal do Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

*autor correspondente

Tel: +55 51 3308 3665

E-mail: franbucker@gmail.com

Resumo

Durante o armazenamento de diesel e biodiesel, compreender as mudanças na estrutura da comunidade microbiana e seu impacto sobre o combustível é fundamental para prevenir danos ao sistema de armazenamento e garantir um produto de qualidade ao mercado consumidor. Neste estudo, simulou-se o armazenamento de diesel puro (B0), as misturas de diesel e biodiesel (B5, B10 e B50) e biodiesel puro (B100), a partir das quais se avaliaram as mudanças na estrutura da comunidade microbiana pelas técnicas de PCR-DGGE e qPCR, após contaminação com inóculo (conforme Norma ASTM E1259). Foi analisado o efeito da contaminação sobre a biodegradação de ésteres de ácidos graxos e de n-alcenos por GC/qMS. Os resultados mostraram que ao final de 60 dias, B100 e B50 apresentaram os maiores valores de biomassa na interface óleo-água. As estimativas de abundância de microrganismos por qPCR dos genes 16S rRNA e 18S rRNA mostrou que o biofilme formado na interface óleo-água é composto por cerca de 70% por fungos e 30% por bactérias. Verificou-se que em B0, B5 e B10 o percentual de bactérias com gene *alk B* foi em torno de 70 - 80 % do total de bactérias estimadas. As maiores porcentagens de biodegradação dos ésteres ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2 ocorreram na mistura B5. As maiores porcentagens de degradação dos n-alcenos foram nas misturas B50 e B10.

Palavras chave: Biodiesel, Comunidade Microbiana, Bactérias degradadoras de alcanos, qPCR, GC/qMs

4.1 Introdução

A biodegradação de combustíveis por microrganismos está associada ao comprometimento da qualidade do produto, do desempenho de equipamentos e peças, e ao entupimento de filtros (prensa e motor)^{1,2}. Durante o transporte e o armazenamento pode ocorrer o acúmulo de água na parte inferior dos caminhões e tanques, respectivamente. A infiltração da água pode ocorrer por problemas de vedação, ou mesmo pela condensação da umidade nas paredes dos caminhões e tanques. O contato direto entre esta água livre (que pode ainda encontrar-se dissolvida no combustível) favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de biofilmes na interface óleo-água, ou aderido às paredes do tanque¹⁻⁷. A preocupação com perdas econômicas no setor de energia é uma questão de interesse mundial, sendo que problemas associados à contaminação microbiana de diesel e biodiesel vêm sendo relatada na literatura^{4,8,9-13}.

O biodiesel puro utilizado no Brasil é composto por metil ésteres de ácidos graxos de cadeias longa, e é derivado da transesterificação de óleos vegetais (de soja, algodão, macaúba, entres outros) ou gorduras animais (gado, suína, de frango) para ser utilizado nos motores de ignição e compressão (diesel). Este biodiesel puro, também denominado B100, vem sendo adicionado ao diesel de petróleo na concentração de 7%, desde novembro de 2014, no Brasil¹⁴. O óleo diesel é composto por cerca de 80-85% de hidrocarbonetos saturados (principalmente alcanos simples, ramificados e cicloalcanos), e de 15 a 25% de hidrocarbonetos aromáticos (como os alquilbenzenos), além disso, de modo geral, o óleo diesel apresenta cadeias $C_{12}H_{26}$, mas pode variar entre $C_{10}H_{22}$ a $C_{15}H_{32}$ ¹⁵⁻¹⁷.

A demanda mundial por combustíveis oriundos de fontes alternativas de energia, como o biodiesel, vem aumentando anualmente. Além de sua origem ser matérias primas renováveis outras características associadas ao biodiesel o tornaram ambientalmente aceitável no mercado mundial de transportes^{2,18-22}. Entre tais características, a maior suscetibilidade do biodiesel a biodegradação por microrganismos, quando comparado ao óleo diesel, torna-se um aspecto importante a ser levado em consideração quanto a questão for o armazenamento^{15,23-31}. Recentes estudos mostram que o biodiesel é mais biodegradável que o óleo diesel, além disso pode causar um efeito sinérgico e aumentar a biodegradação dos componentes do óleo diesel^{15,23-31}. Os principais fatores que vêm sendo relacionados ao aumento da degradação do óleo diesel, bem como das misturas de diesel e biodiesel, quando comparado ao diesel de petróleo são o cometabolismo, em que o biodiesel atua como uma fonte de nutrientes e energia para os microrganismos que consumirão os hidrocarbonetos e irão biodegradar o óleo diesel; e, o outro fator, está relacionado às propriedades dos ésteres de ácidos graxos, que solubilizam os componentes do óleo diesel, aumentando a área de contato com óleo para os microrganismos^{32,33}.

A avaliação da adição do biodiesel ao diesel na estrutura e dinâmica de populações microbianas durante o armazenamento, utilizando técnicas independentes de cultivo, como PCR quantitativo (qPCR), a técnica de PCR-DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), e o sequenciamento de alto rendimento vêm sendo utilizadas. A detecção e quantificação de cópias de genes por PCR quantitativo (qPCR) é uma ferramenta molecular que pode mostrar a condição e alterações na comunidade microbiana através do uso de oligonucleotídeo iniciadores (*primers*) específicos. Assim,

pode-se verificar a abundância de fungos e bactérias, a partir de *primers* que amplificam regiões dos genes *18S rRNA* e *16S rRNA*, respectivamente. Outra possibilidade é quantificar e avaliar a presença de microrganismos com genes específicos relacionados ao metabolismo, como o gene alcano mono-oxigenase (*alk B*), relacionado à degradação de alcanos³⁴⁻³⁶. Sørensen et al. (2011)³⁸ analisaram as mudanças na estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE em amostras com diesel puro (B0), em misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B20, B50) e biodiesel (B100) verificando que o perfil da comunidade ao final do experimento era distinto do perfil da comunidade inicial, indicando uma organização da população bacteriana em função da mistura com maior ou menor teor de biodiesel. Lee et al.³⁹ conduziram experimentos para avaliar a natureza e o grau da contaminação microbiana em tratamentos com B100, diesel com teor ultra baixo de enxofre (ULSD) e em misturas B5 e B20, e diesel convencional por PCR-DGGE, verificaram que as populações bacteriana e fúngica eram similares entre B100, B20 e B5. White et al.⁴⁰, analisaram a diversidade bacteriana de amostras de combustível (diesel e biodiesel) de tanques de armazenamento com contaminação utilizando PCR-DGGE e identificaram os gêneros *Lactobacillus*, *Mangroveibacter*, *Clostridium*, *Shewanella*, *Serratia*, *Aerococcus* e *Burkholderia*, indicando uma predominância dos grupos *Proteobacteria* e *Firmicutes* nas amostras de diesel e biodiesel coletadas. A partir destes estudos, pode-se verificar que muitos fatores podem estar relacionados à composição final da comunidade microbiana durante o armazenamento, como a composição do combustível, o inóculo (ou seja, a origem da contaminação), ou o local e o tempo de incubação.

O uso de ferramentas moleculares, que dispensam o isolamento e cultivo de microrganismos, para avaliar a estrutura da comunidade microbiana, vem auxiliando na compreensão de como ocorre o estabelecimento destes biofilmes na interface óleo-água em relação a mudanças nas condições do meio, como o aumento da concentração de biodiesel na mistura com o diesel, bem como o tempo de armazenamento.

Este entendimento, associado ao uso de ferramentas que avaliam o impacto do crescimento microbiano sobre o combustível, como a degradação ésteres e hidrocarbonetos, e a produção de metabólitos pelos microrganismos, pode auxiliar na adoção de medidas para mitigar os problemas derivados da contaminação microbiana.

Os objetivos do estudo foram avaliar o crescimento microbiano na interface óleo-água. Caracterizar a estrutura da comunidade microbiana a partir da avaliação por qPCR para bactérias e fungos, dos biofilmes formados por microrganismos oriundos da adição de inóculo não caracterizado (Norma ASTM E1259) em microcosmos com biodiesel puro (B100), diesel puro (B0) e diferentes misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B50); e, determinar as frações do biodiesel e os alcanos do diesel que são preferencialmente biodegradados por GC/qMS.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Combustível

Foram utilizados os seguintes combustíveis: óleo diesel (Diesel A), com baixo teor de enxofre (10ppm), e Biodiesel (90% soja e 10% sebo) comercializado no inverno no Rio Grande do Sul, fornecidos pela Ipiranga Produtos de Petróleo S/A (Canoas, Rio Grande

do Sul, Brasil). As misturas de diesel e biodiesel foram preparadas no laboratório utilizando-se proveta graduada previamente desinfetada. Foram conduzidos tratamentos com diesel puro (B0), e biodiesel puro (B100), e com as misturas B5 (95% diesel e 5% biodiesel), B10 (90% diesel e 10% biodiesel), B50 (50% diesel e 50% biodiesel).

4.2.2 Condições de estocagem simulada

Em frascos de vidro (200mL) adicionou-se 20 mL de Meio Mineral Bushnell-Hass Adicionou-se 10 mL do combustível previamente esterilizado por filtração com membrana 0,22 μm (Milipore), (B0, B5, B10, B50 ou B100) aos frascos esterilizados. O experimento foi conduzido em triplicata, em estufa a 28°C.

4.2.3 Contaminação microbiana

O experimento foi conduzido a partir da contaminação do combustível com um inóculo microbiano não caracterizado. O inóculo microbiano foi confeccionado de acordo com Norma ASTM E1259-10 ⁴¹, da seguinte maneira: em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Bushnell-Haas ⁴² e com 2% de mistura B10 esterilizada inoculou-se 5 mL de borra biológica proveniente de diferentes combustíveis (biodiesel e mistura de diesel e biodiesel B5) e incubado a 28 °C, 200 rpm por 7 dias.

Os níveis de contaminação inicial foram determinados a partir da diluição seriada do *inóculo não caracterizado* em solução salina contendo 0.1% Tween 80 solução aquosa contendo 0.1% Tween 80, conforme a Norma Francesa AFNOR-M 07-070/92 ⁴³ e posteriormente semeado em meio de contagem (PCA) para bactérias e meio ágar batata (BDA) para fungos. A estimativa da contaminação inicial, em cada frasco experimental foi de 5 log UFC.mL⁻¹ de bactérias, 4 log UFC.mL⁻¹ para fungos.

4.2.4 Interface óleo- água

4.2.4.1 Crescimento microbiano

A biomassa formada na interface óleo-água foi recuperada por filtração em discos de papel filtro, previamente pesados. Para remover o excesso de óleo aderido a biomassa, os discos de papel filtro foram lavados com 4 mL de hexano. Estes foram colocados em estufa a 60°C, por 48 horas, e após foram transferidos para uma câmara de dessecação, por 24 h, de onde foram removidos diretamente para pesagem. O peso seco da biomassa foi calculado como a diferença entre o peso final e o peso inicial do disco de papel (mg) aos 0, 10, 20, 30 e 60 dias.

4.2.4.2 Extração de DNA

A biomassa formada na interface óleo-água de três replicatas (amostras destrutivas) foi removida dos frascos aos 10, 20, 30 e 60 dias, e retida em discos de papel filtro. Estes foram utilizados para a extração de DNA utilizando-se PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories, USA), de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações, conforme protocolo descrito por Silva et al. (2013)⁴⁴. O DNA extraído de cada replicata foi reunido em um único tubo, conforme Bucker et al. (2014)⁷. A qualidade do DNA foi verificada por espectrofotometria no aparelho Biospec (Shimadzu, São Paulo, Brasil) (razão 260/280) e quantificado no aparelho Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, São Paulo, Brasil), utilizando-se o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X.

4.2.4.3 Análise por PCR quantitativo (qPCR)

A técnica de PCR quantitativo (qPCR) foi utilizada para a quantificação absoluta do número de cópias de fungos, bactérias e bactérias com a presença do gene alcano mono-oxigenase (*alk B*) no biofilme formado na interface óleo-água aos 10, 20, 30 e 60 dias de incubação.

4.2.4.3.1 Desenho de oligonucleotídeos para qPCR

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificar o número de cópias de fungos foi baseado na amplificação parcial da região V4 e V5 do gene 18S rRNA⁴⁵ e do gene 16S rRNA para bactérias⁴⁶, ambos com modificações. Para quantificar o número de cópias do gene *alk B* (alcano mono-oxigenase) foram feitas análises *in silico* das sequências genômicas dos genes alvos disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e os oligonucleotídeos desenhados utilizando a ferramenta de bioinformática GenScript (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>). Os controles positivos para as respectivas reações foram sintetizados de acordo com a sequência alvo amplificada. Os oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e controles utilizados para a análise por qPCR.

Alvo	Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)
Alcano Mono-oxigenase	<i>alkB</i> <i>alkB</i> _F	GGAGCRTTMMKTCGTRGTTG	20
	<i>alkB</i> _R	CGWAKGCCATYTGAABYGGV	20
Fungos	<i>18S</i> 18S_F	GGGGGGAGTATGGTCGCAAG	20
	18S_R1196	TCTGGACCTGGTGAGTTTCC	20
Bactérias	<i>16S</i> 16S_F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	19
	16S_R	CGTATTACCGCGGCTGCTGGC AC	23
Controles	Sequência (5' – 3')		Tamanho (pb)
<i>alkB</i> gDNA	GGAGCATTATTCGTGCTTGGGGGCTTGAGGAACAACGCCTT TCGCGCCGTGGCCAAAGCGTTTGGAGTTTCGATAATGAAATC CTCCAACCAATGATCATCACAGTTATTCTTTACGCCGTTCTCC TTGCCTTGTTTGGACCTAAGATGCTGGTGTTCTGCGGATTCA AATGCTTTTCG		181
18S gDNA	GGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGA CGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGA CTCAACACGGGGAAACTACCAGGTCCAGA		113
16S gDNA	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC GGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGA GTAAGTCTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG		198

F: primer senso; R: primer antisenso; pb: pares de base; gDNA: DNA genômico.

4.2.4.3.2 Padronização das reações de quantificação absoluta

O número de cópias dos genes *alk B*, 16S rRNA e 18S rRNA em cada amostra foram quantificados por qPCR utilizando-se Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen, São Paulo Brasil) em placas ópticas de 96 poços MicroAmp Fast Optical (0.1 mL) (Applied Biosystems®, São Paulo, Brasil) no equipamento StepOne™

Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®, São Paulo, Brasil). A amplificação foi realizada em duplicata em reações de 20 µl, contendo 1 µl de DNA, 200 mM de cada *primer* (*forward e reverse*) 10 µl do SuperMix, 0,4 µl de ROX e água deionizada esterilizada (Mili Q, Milipore) para completar a reação. As condições de amplificação foram 2 min a 50°C, 2 min a 95°C seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s; 55°C por 30s e 60°C por 30s. O número de cópias do gene alvo foi calculado a partir da padronização de curvas (curva padrão) contendo concentrações conhecidas dos respectivos oligonucleotídeos controles (gDNA) em diluições seriadas de 1:10 em triplicata. A especificidade da amplificação por PCR foi determinada pelas curvas de *melting* e pela eletroforese em gel de agarose.

4.2.5 Fase aquosa

A produção de metabólitos pelo microrganismos foi investigada a partir das seguintes avaliações da fase aquosa: medidas de pH, tensão superficial e índice de emulsificação (IE₂₄)⁵⁰ aos 10, 20, 30 e 60 dias de incubação dos tratamentos com microrganismos e controle (sem microrganismos). As medidas de tensão superficial foram realizadas utilizando-se um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milan, Italy). Todas as medidas foram realizadas em triplicata com a fase aquosa livre de células e de micélio após centrifugação (10,000 rpm, 10 min.).

4.2.6 Fase oleosa - Degradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel e alcanos do diesel por cromatografia gasosa monodimensional acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar (GC/qMS)

Análise qualitativa e quantitativa

A avaliação qualitativa da composição do biodiesel (ésteres de ácidos graxos) e do diesel (alcanos) foi realizada para as amostras de B0, B5, B10, B50 e B100 para determinar a composição dos ésteres de ácidos graxos e dos alcanos majoritários. Esta avaliação foi realizada por GC/qMS (QP2010 *Ultra*, Shimadzu, *Toquio, Japão*) equipado com auto injetor split/splitless AOC20i. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB-5, metil silicone com 5% de grupos fenil e 95% metilpolisiloxano (60 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm – Ohio Valley Specialty Company, Marietta, Ohio, EUA). O aquecimento do forno obedeceu a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C mantida durante 4 min, aumentando 5 °C min⁻¹ até 190 °C, mantida por 4 min, aumentando 2 °C min⁻¹ até 240 °C, mantida por 5 min, elevando a temperatura novamente na razão de 10 °C min⁻¹ até a temperatura final de 280 °C, mantida por 15 min. A temperatura do injetor, detector e fonte de íons foi de 280 °C e a injeção foi realizada no modo Split na razão 1:10. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de fluxo de 0,9 mL min⁻¹. As condições do espectrômetro de massas foram as seguintes: energia de 0,83 kV e faixa de varredura de espectros de 35 a 400 Daltons, correspondendo a 52,6 Hz de frequência. A identificação tentativa dos compostos foi feita utilizando-se a biblioteca de base de dados NIST-05 (NIST, 2014) com similaridade espectral mínima acima de 800 e confirmada através de comparação com os índices de retenção de Van den Dool e Kratz ⁵¹.

A quantificação dos ésteres de ácidos graxos majoritários presentes nas amostras de B5, B10, B50 e B100 e a quantificação dos alcanos presentes nas amostras de B0, B5, B10 e B50 foi realizada nas mesmas condições descritas para a análise qualitativa. Nas condições descritas anteriormente, o espectrômetro de massas com analisador quadrupolar operou em modo de monitoramento de íons selecionados (do inglês “Select Ion Monitoring”). Foram injetadas soluções da mistura dos 6 padrões de ácidos graxos (C14:0, C16:0, 17:0, C18:0, C18:1, C18:2) (Sigma Aldrich) na faixa de 0,5 a 1500 mg L⁻¹. As injeções foram realizadas em triplicatas, e em ordem crescente de concentração das misturas, com as quais se delineou uma curva analítica. As curvas analíticas foram baseadas no método do padrão interno para compensar as possíveis flutuações nas respostas geradas pelo espectrômetro de massas quadrupolar. O padrão interno utilizado foi C19:0 (metil ricinolêico) (Sigma Aldrich) na concentração de 100 mg. L⁻¹ em cada solução. As curvas analíticas foram utilizadas para a quantificação dos ésteres de ácidos graxos nas amostras B5, B10, B50 e B100. O delineamento e análise das curvas analíticas e a quantificação dos ésteres de ácidos graxos selecionados para a análise foram realizados conforme Cunha et al. (2013) ⁵². Os compostos analisados, o padrão interno aplicado e seus íons selecionados podem ser vistos na Tabela 1. Foram injetadas soluções de uma mistura padrão de alcanos saturados C₇-C₄₀ (Supelco, Sigma Aldrich) na faixa de 0,5 a 50 mg L⁻¹. As injeções foram realizadas em triplicatas, e em ordem crescente de concentração das misturas, com as quais se delineou uma curva analítica. As curvas analíticas foram baseadas no método do padrão interno para compensar as possíveis flutuações nas respostas geradas pelo espectrômetro de massas quadrupolar. O padrão interno utilizado foi Naftaleno Deuterado (nC₁₀) (Sigma Aldrich) na

concentração de 30 mg.L⁻¹ em cada solução. As curvas analíticas foram utilizadas para a quantificação dos alcanos C₁₁ a C₂₀ nas amostras de B0, B5, B10, e B50.

Para a análise, 10 mg de amostra foram diluídas em 10 ml de diclorometano (DCM). Em cada vaio adicionou-se 900 µl de DCM, 300 µl da amostra previamente diluída, e 300 µl do padrão interno. O padrão interno utilizado foi etil miristato na concentração de 100 mg L⁻¹ e 30 mg.L⁻¹ naftaleno deuterado (nC₁₀). Os compostos analisados, o padrão interno aplicado e seus íons selecionados podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos monitorados e seus íons selecionados empregados para análise quantitativa dos mesmos em B5, B10, B50 e B100.

Composto		Íons (m/z)			Tempo de retenção
Metil Miristato	C14:0	74	87		38.980
Metil Palmitato	C16:0	74	87		45.260
Metil Heptadecanoato	C17:0	74	87		50.240
Metil Linoleato	C18:2	67	81		53.060
Metil Oleato	C18:1	55	69		53.285
Metil Estearato	C18:0	74	87		54.285
Metil Ricinoleato*	C19:0	41	44	55	63.550

* Padrão interno

4.2.7 Análise estatística

O experimento foi realizado em sextuplicata, sendo utilizadas três replicatas para a extração de DNA. As demais análises (crescimento microbiano, GC×GC/qMS,) foram conduzidas em triplicata e analisadas utilizando-se o programa para análises estatísticas XLStat-Pro 2014. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada por Teste de Tukey (p=0,05).

Os dados sobre a biodegradação dos ésteres de ácidos graxos e dos alcanos, a composição da comunidade bacteriana (qPCR) e a concentração de biodiesel na mistura foram analisados pela Análise dos Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*), utilizando-se a Correlação Spearman utilizando-se o software para análise estatística XLStat-Pro 2014.

4.3 Resultados

4.3.1 Crescimento microbiano-

Na Tabela 3 são apresentados os valores do peso seco da biomassa formada na interface óleo-água aos 10, 20, 30 e 60 dias de experimento, nos diferentes tratamentos.

Para B100 a biomassa formada aos 10 dias de experimento foi 82% maior em relação a biomassa formada em B0 (Tabela 3). Aos 60 dias, o valor da biomassa, em B100 foi 91,3% maior ao mensurado em B0. Em ambos os tempos essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Verificou-se pelos valores obtidos de biomassa formada, que já aos 10 dias de incubação, em todas as condições em que o biodiesel foi adicionado a mistura com diesel, um maior crescimento na interface óleo-água. No entanto, na condição em que o diesel foi avaliado puro, observou-se que a biomassa formada na interface óleo- água, ao longo da avaliação sempre foi menor em relação as misturas, e ao biodiesel puro (Tabela 3). Na mistura B50, a biomassa foi 71,4% maior que a biomassa formada em B0. Nas misturas B10 e B5 a biomassa formada foi 56,5 % e 53,4,3%, respectivamente, superior a biomassa formada em B0. Aos 60 dias, o valor da biomassa, em B50 foi 83,3% em B10 72,2%; e, em B5 75% maior ao valor mensurado em B0.

Aos 60 dias, a biomassa formada em B100 foi 47,8% maior que a biomassa formada em B50; 68,7% maior que a biomassa formada em B10; e, 65,2% maior que a biomassa formada em B5. Sendo estas diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores de peso seco (mg) da biomassa formada na interface óleo-água nos tratamentos contendo B0, B5, B10, B50 e B100; aos 10, 20, 30 e 60 dias.

Tempo (Dias)	Tratamento									
	B0		B5		B10		B50		B100	
Biomassa (mg)	Média	Dp* (\pm)	Média	Dp (\pm)	Média	Dp (\pm)	Média	Dp (\pm)	Média	Dp (\pm)
10	2,0	1,3	4,3	0,4	4,7	1,8	7,0	0,0	11,3	1,8
20	2,3	0,9	2,3	1,1	3,5	0,5	4,0	0,7	16,5	1,5
30	4,3	1,1	5,7	1,8	5,5	1,5	7,3	3,1	16,0	4,7
40	1,0	0,0	4,0	1,3	3,7	1,6	6,0	2,0	11,5	1,5

* Desvio padrão da média

4.3.2 Estrutura da comunidade microbiana-Quantificação de bactérias degradadoras de alcanos, bactérias e fungos por qPCR

A quantificação de bactérias, fungos, e de bactérias degradadoras de alcanos no biofilme formado na interface óleo-água dos tratamentos B0, B5, B10, B50 e B100, aos 10, 20, 30 e 60 dias de incubação foi estimada empregando os genes 16S rRNA, 18S rRNA e alcano mono-oxigenase (*alkB*), respectivamente, por qPCR. A eficiência do PCR, os coeficientes de correlação e o R^2 obtidos para as curvas padrão são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Eficiência do PCR, os coeficientes de correlação e o R^2 obtidos para as curvas padrão.

Alvo	Coefficiente de Correlação	R^2	Eficiência
<i>alk B</i>	$y = -3,4237x + 45,605$	0,9675	96%
<i>18S rRNA</i> (Fungi)	$y = -3,1657x + 50,625$	0,9928	107%
<i>16S rRNA</i> (Bacteria)	$y = -3,5533x + 33,848$	0,9946	91%

A quantificação dos microrganismos foi calculada em relação ao peso seco da biomassa formada na interface óleo-água³⁶. A quantificação dos microrganismos mostram que o biofilme formado na interface óleo água é composto por cerca de 70% de fungos e 30% de bactérias, em todos os tratamentos e tempos avaliados (Figura 1). Em relação a quantificação da população fúngica, observou-se que esta variou entre 10^9 e 10^{12} cópias por miligrama de amostra, nos tratamentos.

A estimativa da população bacteriana variou entre 10^5 e 10^6 cópias por miligrama, nos tratamentos com B0, B5, B10 e B50. Em B100, foi observada uma menor população bacteriana, nos tempos avaliados, sendo que foram observadas entre 10^3 e 10^4 cópias.mg⁻¹ (Figura 1). Os valores foram calculados para se verificar a quantidade de cópias necessárias para compor um miligrama de biomassa na interface óleo-água.

A estimativa da quantidade de microrganismos (bactérias) com o gene *alk B* foi de 10^4 a 10^5 cópias.mg⁻¹ nas amostras B0, B5 e B10 (Figura 1). Em B50, os valores permaneceram entre 10^3 e 10^4 cópias.mg⁻¹ (Figura 1). Em B100, pode-se observar o menores valores para a estimativa de bactérias com o gene *alk B*, que apresentou uma estimativa de 10 cópias.mg⁻¹, aos 20, 30 e 60 dias, não sendo detectado aos 10 dias de avaliação (Figura 1). De acordo com a literatura^{34,53} as bactérias degradadoras de alcanos possuem apenas uma cópia do operon *alk B*.

Em B0, B5 e B10 o percentual bactérias com gene *alk B* foi em torno de 70 - 80 %, em relação ao total de bactérias estimadas pela análise do gene *16S rRNA*. Em B50, houve uma variação nestes percentuais, sendo que foram de 80, 50, 60, e 30%, aos 10, 20, 30 e 60 dias de avaliação. Em B100, a estimativa de bactérias com gene *alk B* em relação ao total de bactérias, foi em torno de 25% do total.

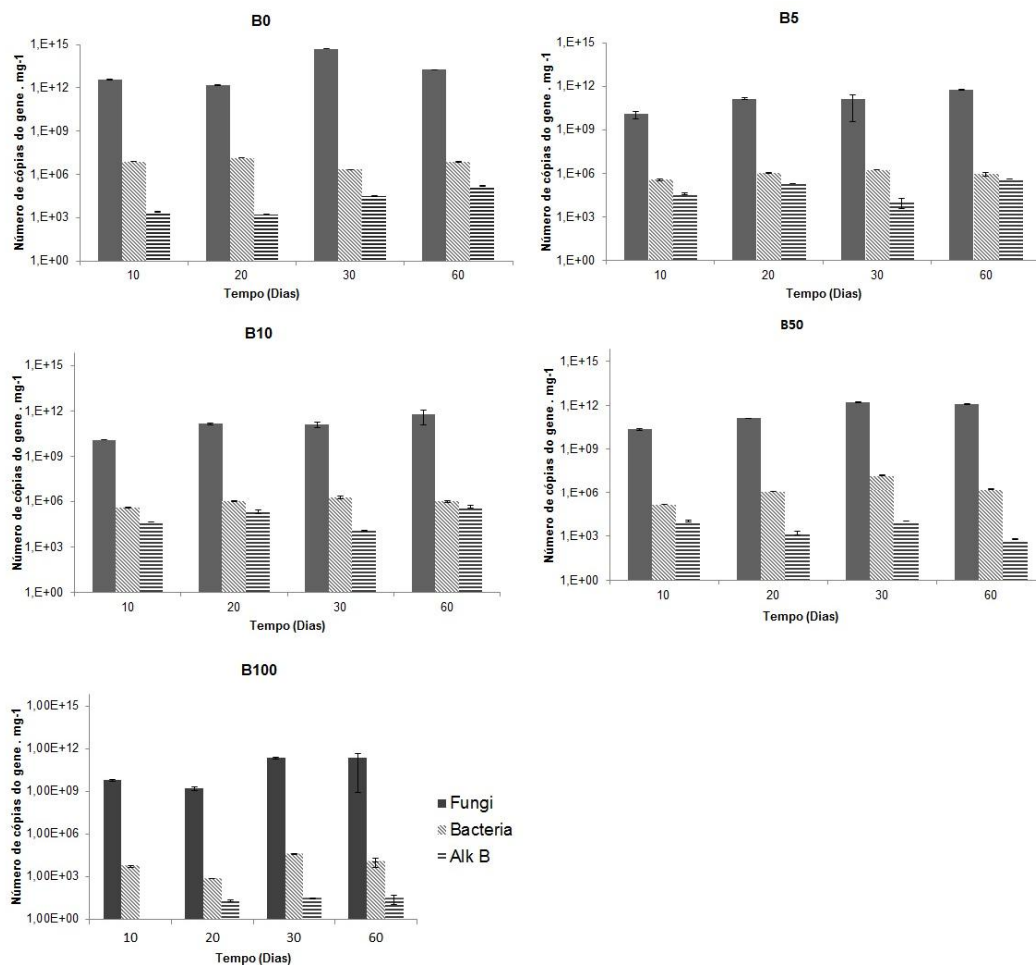


Figura 1: Estimativa da população fúngica, bacteriana de bactérias degradadoras de alcanos por qPCR, do biofilme formado na interface óleo-água, aos 10, 20 30 e 60 dias de incubação, para B0, B5, B10, B50, e B100. Os valores das médias e desvios padrão

foram calculados a partir de reações em duplicatas realizadas em uma única reação de PCR.

4.3.4 Fase aquosa

4.3.4.1 Tensão Superficial

A produção de biossurfactantes foi realizada pela metodologia de avaliação de redução da tensão superficial da fase aquosa, os resultados são apresentados na Tabela 5.

4.3.4.2 Índice de emulsificação IE₂₄

Não foi detectada a formação de emulsificação na realização deste teste nas amostras, nos tempos avaliados.

4.3.4.3 pH

Observou-se que as medidas de pH apresentaram valores em torno de 7,2 no início do experimento, para todos os tratamentos. Aos 10, 20 e 30 dias o pH de todos os tratamentos, com e sem microorganismos manteve-se na faixa de 7,1 a 7,2. Observou-se uma diminuição nos valores de pH ao final de 60 dias, no entanto, não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,005$) entre os tratamentos com microrganismos e os tratamentos controle (Tabela 5).

Tabela 5: Medidas de tensão superficial da fase aquosa avaliada aos 10, 20, 30 e 60 dias de incubação, e pH aos 60 dias

		Dias									
		10 20 30 60								60	
		mN m ⁻¹								pH	
		Média	Dp ±	Média	Dp±	Média	Dp ±	Média	Dp ±	Média	Dp±
B0	Tratamento ^a	40,3	0,2	34,7	2,0	38,3	2,0	36,7	0,7	6,6	0,1
	Controle ^b	33,7	0,2	27,3	0,3	30,5	3,3	37,9	0,2	6,7	0,1
B5	Tratamento	38,1	0,7	40,9	0,4	39,5	1,4	36,3	0,5	6,7	0,1
	Controle	33,3	0,6	32,0	0,1	32,7	0,6	37,1	0,0	6,7	0,1
B10	Tratamento	38,1	0,7	38,1	0,7	38,1	0,0	36,5	0,8	6,6	0,1
	Controle	33,3	0,6	39,1	0,0	36,2	2,9	33,0	0,0	6,6	0,1
B50	Tratamento	37,7	0,8	39,4	0,7	38,6	0,8	37,7	0,7	6,6	0,1
	Controle	33,9	0,4	34,2	0,5	34,1	0,2	30,1	2,0	6,5	0,1
B100	Tratamento	37,6	0,6	37,1	0,8	37,4	0,3	35,1	0,6	6,5	0,1
	Controle	36,1	1,0	35,9	0,1	36,0	0,1	35,9	0,4	6,6	0,1

^a Tratamento com biofilme formado na interface óleo-água, ^b controle sem microrganismos, Dp: Desvio Padrão
Medida de tensão superficial do meio mineral Bushnell-Hass 53,0 mN.m⁻¹

4.3.5. Biodegradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel

A análise inicial do biodiesel puro (qualitativa e semi quantitativa) é apresentada na Tabela 6. A partir destes resultados foram selecionados os ésteres de ácidos graxos majoritários do biodiesel, que foram utilizados para a análise quantitativa da biodegradação do biodiesel nos tratamentos B5, B10, B50 e B100, após 60 dias.

Tabela 6. Análise qualitativa e semi quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel puro (90% soja e 10%sebo) utilizado no estudo.

Nome comum	Nome Formal	Abreviação	%
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	0,1
Ácido Palmítico	Ácido hexadecanóico	16:0	11,15
	Ácido Heptadecanóico	17:0	0,15
Ácido Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	5,0
Ácido Oléico	Ácido <i>cis</i> -9-Octadecadoico	18:1 <i>cis</i>	29,5
Ácido Elaídico	Ácido <i>trans</i> -10-Octadecadoico	18:1 <i>trans</i>	1,55
Ácido Linoléico	Ácido <i>cis</i> -9,12- Octadecadienoico	18:2	50,45
Ácido Araquidônico	Ácido Eicosanóico	20:0	0,1
Total			98%

Inicialmente foram calculadas as concentrações próximas para os ésteres de ácidos graxos metílicos e os alcanos quantificados nas amostras B0, B5, B10, B50 e B100, ao final de 60 dias para as condições com crescimento microbiano e controle, a partir das curvas analíticas (Material Suplementar 1 e 2). As equações obtidas para as curvas analíticas demonstraram que o método utilizado alcançou boa linearidade, os coeficientes de determinação (R^2) para as faixas de concentração delimitadas são apresentados no Material Suplementar 1 e 2.

4.3.5.1 B100

A análise da biodegradabilidade dos ésteres ácidos graxos majoritários presentes no biodiesel utilizado no estudo (10% sebo e 90% soja) pode ser verificada na Tabela 7. No tratamento contendo o biodiesel puro (B100) a biodegradação dos ésteres de ácidos graxos com C18 apresentou a seguinte ordem C18:1*cis*-9 > C18:2 > C18:0.

4.3.5.2 Misturas B5, B10, B50

Na Tabela 7 pode-se observar que a extensão da degradação individual dos ésteres de ácidos graxos nas misturas B5, B10 e B50 diminuiu a medida que aumentou-se a concentração de biodiesel na mistura; exceto C18:1 que apresenta 25,7% de degradação, em B50, sendo este percentual de biodegradação 49% maior do que o observado em B10.

Em relação a ordem de biodegradação dos C18 avaliados, verificou-se que nas misturas B5, B10, e B50 a porcentagem de degradação foi 18:1>C18:2>C18:0.

Tabela 7: Porcentagem da degradação dos ésteres de ácidos graxos avaliados presentes nas misturas B5, B10, B50 e em B100 após 60 dias de incubação.

Ésteres de ácidos graxos	Biodegradação (%)*			
	B100	B50	B10	B5
Metil Miristato (C14:0)	19,0	38,3	-	-
Metil Palmitato (C16:0)	20,1	10,6	12,6	25,5
Metil Heptadecanoato(C17:0)	100	-	-	-
Metil Estearato (C18:0)	13,5	1,5	16,0	17,5
Metil Oléico (C18:1CIS)	18,0	25,7	12,6	34,5
Metil Linoléico (C18:2)	16,7	10,9	17,2	27,7

* O percentual de biodegradação foi calculado da seguinte maneira: % biodegradação= [(concentração ésteres de ácidos graxos no controle- concentração dos ésteres de ácidos graxos na amostra)/ concentração do ésteres de ácidos graxosna amostra controle] × 100.

- não se verificou biodegradação

4.3.6 Biodegradação dos n-alcenos (C₁₀-C₂₀) do diesel

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de biodegradação dos n-alcenos C₁₀-C₂₀, nos tratamentos B0, B5, B10 e B50, ao final de 60 dias. Ao analisar a Tabela 8, pode-se verificar que as maiores porcentagens de degradação dos n-alcenos foram nas misturas

B50 e B10, ou seja, 9 dos 11 n-alcenos analisados, apresentaram as maiores porcentagens de biodegradação em B10 ou em B50.

Também observou-se que C₁₂ e C₁₇, no tratamento B0, apresentaram-se mais degradados no tratamento controle do que na presença de microrganismos; o mesmo foi observado para C₁₀ em B50.

Tabela 8. Porcentagem da degradação dos alcanços (C₁₀-C₂₀) avaliados presentes nas misturas B5, B10, B50 e em B0 após 60 dias de incubação.

Alcanos	Biodegradação (%)			
	B0	B5	B10	B50
C ₁₀	6,3	17,4	22,9	*
C ₁₁	7,9	4,9	3,0	1,4
C ₁₂	*	2,4	6,9	3,0
C ₁₃	9,2	13,5	7,0	19,6
C ₁₄	7,9	14,7	8,9	21,8
C ₁₅	9,6	6,4	16,3	18,5
C ₁₆	14,5	36,1	22,8	21,5
C ₁₇	*	16,1	35,6	17,4
C ₁₈	24,2	16,9	18,4	57,1
C ₁₉	38,3	18,3	61,3	*
C ₂₀	20,5	65,0	11,9	72,1

* o valor da concentração do n-alceno no tratamento apresentava-se superior ao valor do controle

O percentual de biodegradação foi calculado da seguinte maneira: % biodegradação = [(concentração do alceno no controle - concentração do alceno no tratamento) / concentração do alceno no controle] × 100. Considerou-se os valores obtidos em mg.mL⁻¹ até a quarta casa decimal, das triplicatas analisadas por GC qMS)

Realizou-se um PCA que agrupou as misturas de diesel e biodiesel com a maior porcentagem de degradação do ésteres de ácidos graxos do biodiesel, ou com a maior porcentagem de degradação do n-alcanos do diesel em cada amostra (Figura 2).

A maior degradação do éster C16:0 ocorreu nas amostras da mistura B5, em que se observou as maiores porcentagens de degradação nos n-alcanos C₁₀ e C₁₆. A mistura de diesel e biodiesel B10 apresentou-se correlacionada aos maiores percentuais de biodegradação dos n-alcanos C₁₀, C₁₂, C₁₇ e C₁₉. O maior percentual de biodegradação do metil éster C14:0 está correlacionado a B50, o qual apresentou correlação com as maiores porcentagens de biodegradação dos n-alcanos C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₈ e C₂₀.

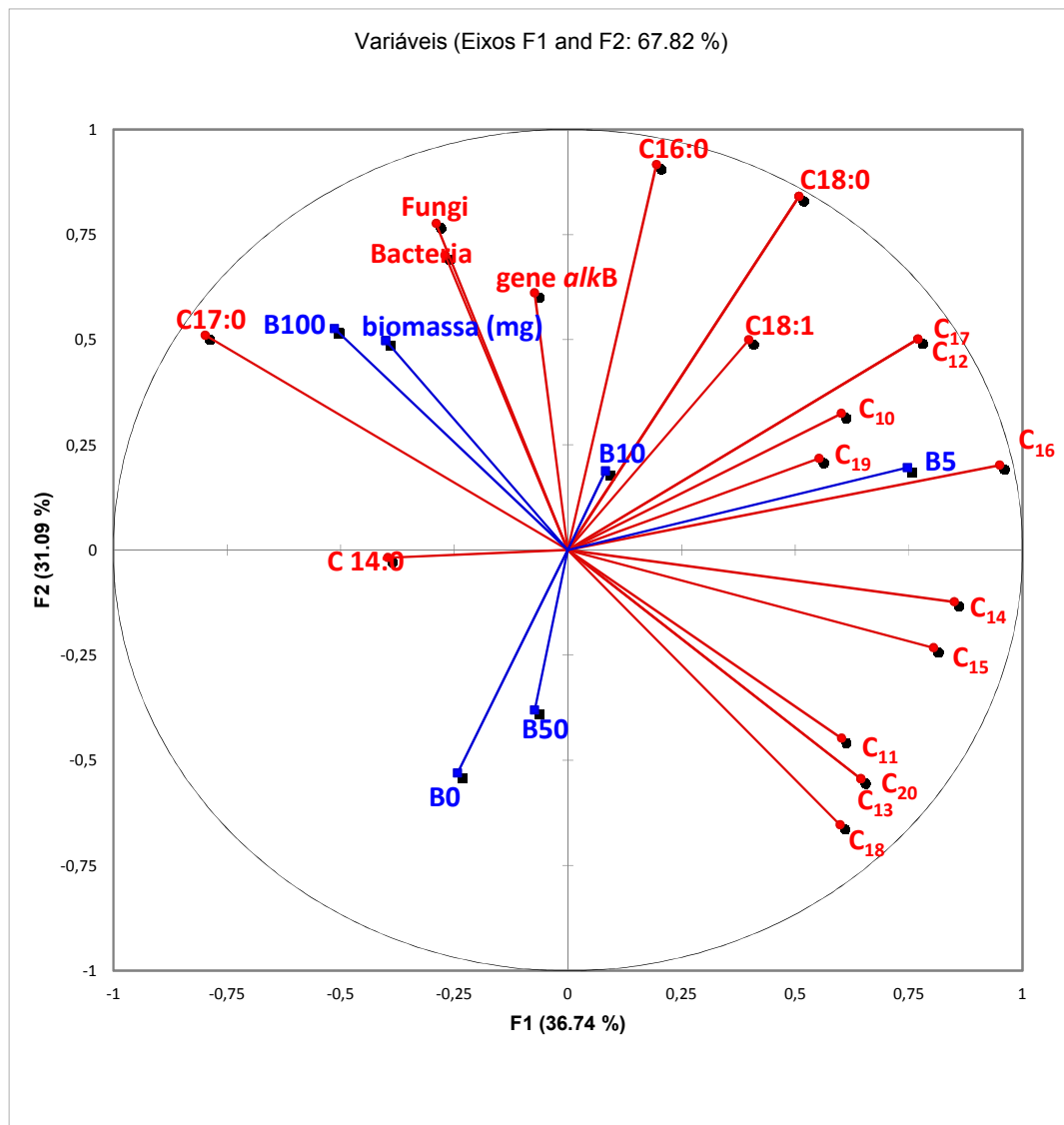


Figura 2: Análise dos componentes principais dos resultados relacionados a biodegradação dos ésteres de ácidos graxos (C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2), dos n-alcenos (C₁₁-C₂₀), a mistura de diesel de biodiesel na mistura (B0, B5, B10, B50 e B100) e a biomassa formada na interface óleo-água (mg). Azul: variáveis suplementares; Vermelho: variáveis ativas.

4.4 Discussão

Neste trabalho, a condição da mistura B50 e de biodiesel puro B100 foram os tratamentos com maior quantidade de biomassa formada na interface óleo-água, ou seja, o inóculo adicionado respondeu em termos de crescimento microbiano, expressando-se pelo biofilme produzido (biomassa-mg). A natureza do inóculo pode ter sido a responsável, pois tratava-se de um grupo de microrganismos que estavam sendo mantidos na mistura B10, ou seja, na presença da mistura diesel e biodiesel. Vários estudos têm mostrado que a adição de biodiesel ao diesel tem influenciado positivamente o crescimento microbiano, embora não exista uma correlação linear entre o teor de biodiesel na mistura e o crescimento microbiano ^{26,31,38,56}. Os autores verificaram que o crescimento microbiano aumentou na presença do biodiesel, mas não houve uma correlação entre a quantidade de biodiesel na mistura e o crescimento, como foi verificado neste estudo.

As análises de correlação (PCA), apresentadas na Figura 4, mostram uma forte correlação, entre a biomassa (mg) formada em B100, e o número de cópias (quantidade) de fungos e bactérias relacionados à composição do biofilme na interface óleo-água. A análise por qPCR avaliou o número de cópias dos genes (*16S e 18S rRNA*) por mg de biomassa formada. O número de cópias dos genes por miligrama foram bastantes similares entre os tratamentos, no entanto a biomassa final formada foi maior em B100.

A análise por qPCR realizada para fungos e bactérias, mostrou no presente estudo, que as mudanças na abundância do número de cópias dos genes *16S rRNA* (Bacteria) e *18S rRNA* (Fungi) por miligrama de biomassa formada na interface óleo-água ocorreram na

mesma ordem de magnitude, sugerindo que a comunidade microbiana não se alterou com o teor de biodiesel, ou durante os tempos avaliados. Cyplik et al. (2010)³⁰, em estudo para avaliar a degradação de diesel, B20 e biodiesel puro (previamente esterilizados) por um consórcio de sete bactérias verificaram, por PCR quantitativo relativo, que a estrutura da comunidade microbiana não foi afetada pelo teor de biodiesel, embora tenham verificado diferentes taxas de degradação do combustível na presença do biodiesel, assim como neste trabalho

Em estudo conduzido por Sørensen et al. (2011)³⁷, com adição da água, proveniente de um tanque de armazenamento, como inóculo, ao diesel puro, e a misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B20, B50) e B100, foi analisada a mudança na estrutura da comunidade microbiana presente na fase aquosa por DGGE, ao final de 41 dias de avaliação. Foi observado que havia um perfil populacional similar entre B0 e B5, e estes perfis foram distintos dos perfis em B10, B20, B50 e B100, indicando que a população observada em baixas concentrações de biodiesel é diferente da população observada em altas concentrações. Os autores verificaram que o perfil da comunidade, ao final do experimento, era distinto da comunidade inicial, indicando uma organização da população em função da mistura com maior ou menor teor de biodiesel. LEE et al.³⁹ conduziram experimentos para avaliar a natureza e o grau da contaminação microbiana e seu potencial de corrosão, utilizando biodiesel puro, diesel com teor ultra baixo de enxofre, e a mistura B5, e diesel convencional. As análises foram conduzidas com e sem a adição de um inóculo ao combustível, este constituído de lodo biológico proveniente de tanque de diesel. Os autores utilizaram a fase aquosa para extração de DNA, e posterior análise por PCR-DGGE. Após seis meses de análise, verificaram que os

microrganismos do inóculo não estavam presentes na comunidade, exceto uma levedura; e constataram que os microrganismos da microbiota original do combustível eram as espécies dominantes em todas as amostras. Os estudos citados acima foram conduzidos a partir da adição de inóculos microbianos de diferentes origens ao combustível, sem que o combustível tivesse sido previamente esterilizado. Situação diferente à do presente estudo, em que houve adição de inóculo microbiano aclimatado ao combustível previamente esterilizado. Os resultados apresentados pelos autores citados, apontam que houve uma competição entre os microrganismos nativos do combustível e os microrganismos inoculados, uma vez que há diferença entre o perfil microbiano inicial e final nas amostras. A competição entre os microrganismos nativos e os inoculados, justifica as grandes mudanças (inicial e final) observadas na comunidade microbiana dos trabalhos citados, indicando que, embora o teor de biodiesel na mistura possa influenciar a composição final da comunidade microbiana, a composição inicial da comunidade microbiana será determinante neste processo de contaminação do combustível.

Pode-se verificar diferenças significativas na biodegradação de ésteres de ácidos graxos do biodiesel e dos n-alcenos do diesel, em relação as diferentes misturas de diesel e biodiesel estudadas, no entanto estes percentuais de degradação diferentes não refletem mudanças na comunidade, de um modo geral. Neste caso, pode-se sugerir que os microrganismos degradadores do combustível compartilham a habilidade em biodegradar os ésteres de ácidos graxos e os n-alcenos estudados. Vários microrganismos, entre bactérias, fungos filamentosos e leveduras são capazes de degradar n-alcenos^{16,35,57,58}. Entre estes, os que são degradadores de n-alcenos de

cadeias de médio comprimento (C₅–C₁₇) frequentemente possuem o citocromo P450 e enzimas integrais de membrana mono-oxigenases, como a *alk B*⁵⁸. A análise por qPCR foi conduzida utilizando-se um gene considerado funcional nessa comunidade, o gene *alk B* que codifica para a enzima alcano mono-oxigenase, responsável pela catálise no primeiro estágio da oxidação aeróbia de n-alcanos. Pode-se verificar que nos tratamentos com diesel puro (B0) e nas misturas com biodiesel, B5 e B10, o percentual em relação a população total de bactérias (gene *16S rRNA*) foi de 70-80%. Já em B50 e B100, verifica-se que esta relação diminuiu, ou seja, apresentou menos bactérias com a capacidade em degradar alcanos, em relação ao total de bactérias (gene *16S rRNA*). As maiores porcentagens de biodegradação de 5 (dos 11 n-alcanos avaliados) foram em B50. Embora tenha sido observado uma quantidade menor de bactérias com o gene *alk B*, a biodegradação dos n-alcanos pode estar associada ao citocromo P450⁵⁸, presente nos fungos que compuseram o biofilme formado na interface óleo-água, que apresentou valores de biomassa superiores a B10, B5 e B0. A menor abundância de bactérias com o gene *alk B* em B100, se justifica pelo fato de que neste tratamento as enzimas alcanos mono-oxigenases não são necessárias, em função da composição química do biodiesel (apenas ésteres de ácidos graxos), neste caso há bactérias com o gene *alk B*, mas ele não é expresso. Mas a detecção de bactérias degradadoras de alcanos, em B100, está relacionada ao inóculo adicionado, confeccionado a partir de borras diversificadas (de B5, biodiesel puro) e aclimatado em B10, o que previamente selecionou bactérias com o gene *alk B*, e que foram adicionadas a todos os tratamentos.

O que pode ser observado em relação às porcentagens de biodegradação dos n-alcanos, é que na presença do biodiesel (B5, B10 e B50) elas foram maiores, quando comparado a B0. Embora não se tenha visualizado uma relação direta entre as porcentagens de

biodegradação e o teor de biodiesel na mistura, verificou-se que em B10 e B50, nove (de 11) n-alcanos apresentaram as maiores porcentagens de biodegradação. Yassine et al. (2013)¹⁵ verificaram que os n-alcanos C₁₀–C₂₁ do diesel, eram metabolizados em uma taxa significativamente maior na presença de biodiesel, em estudo com diesel puro e misturas com biodiesel (B20, B40, B60 e B80) exposto a um consórcio aclimatado de bactérias, sendo que esta taxa foi maior em B20 e B40. Estes mesmo autores¹⁵ verificaram que os ésteres de ácidos graxos co-solubilizavam os n-alcanos do diesel em condições sem os microrganismos (controle), o que por sua vez poderia justificar a utilização mais rápida e a mineralização do diesel, sem que isto acarretasse em uma maior biodegradação do combustível.

Zhang et al. (1998)³³ e Pasqualino et al. (2006)³², relataram um aumento na biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel. Além disso, sugeriram um efeito positivo na biodegradação das misturas, ou seja, o biodiesel, ao ser adicionado no diesel, aumentava a biodegradabilidade do diesel. Os autores sugeriram o cometabolismo como um dos mecanismos de biodegradação de misturas de diesel e biodiesel. DeMello et al. (2007)²⁹, compararam a velocidade de degradação entre 100% de diesel fóssil e B25 (25% de biodiesel misturado ao diesel), em um ambiente marinho, e verificaram que a degradação dos ésteres de ácidos graxos e dos n-alcanos ocorria simultaneamente. Prince et al. (2008)²⁸ em estudo sobre a biodegradação aeróbia da mistura binária B20, verificaram que metil-ésteres de ácidos graxos eram degradados a uma velocidade semelhante dos n-alcanos presentes no óleo diesel, novamente verificando uma relação entre a degradação dos ácidos graxos e a dos hidrocarbonetos.

No presente estudo verificou-se que 10 (de 11) n-alcenos com as menores taxas de degradação ocorreram em B5 ou B0; além disso, a extensão da degradação individual dos ésteres de ácidos graxos nas misturas B5, B10 e B50 diminuiu a medida que aumentou-se a concentração de biodiesel na mistura de uma forma geral. Owsianiak et al. ²⁶, verificaram nas misturas de diesel e biodiesel que continham menos de 10% de biodiesel na composição, os microrganismos degradavam, preferencialmente, os ésteres de ácidos graxos, e que a assimilação dos n-alcenos era menor.

Avaliações que levam em consideração a investigação da produção de metabólitos pelos microorganismos, podem colaborar na compreensão de como o processo de biodegradação ocorre. De uma forma geral, as bactérias que possuem a capacidade em degradar óleo diesel produzem moléculas surfactantes que permitem a emulsificação dos n –alcenos. Além disso, podem produzir biosurfactantes que ao serem excretados para o meio extracelular diminuem a tensão superficial entre o óleo e a água. Estas moléculas e seus efeitos estão associados a um aumento na degradação dos componentes do combustível. As medidas de tensão superficial tanto do controle (sem microrganismos) quanto dos tratamentos foram muito baixas em todos os tratamentos, e similares entre si, logo estes valores não estão associados a produção de moléculas biosurfactantes, e sim a alguma interação entre o combustível e a fase aquosa. Não foi verificada a produção destas moléculas neste trabalho ou mudanças significativas no pH, e mesmo assim observou-se que o processo de biodegradação ocorreu.

4.5 Conclusões

Verificou-se que a presença do biodiesel favoreceu positivamente o crescimento microbiano na interface óleo-água, em que B100 apresentou a maior biomassa. As análises por qPCR informaram sobre a composição do biofilme, assim, baseada na

relação entre número de cópias de fungos e bactérias, verificou-se que a proporção destes microrganismos no biofilme foi em torno de 70% e 30%, respectivamente. Verificou-se que os microrganismos que compuseram o biofilme foram capazes de metabolizar os n-alcenos e os ésteres de ácidos graxos sendo que as porcentagens de degradação dos ésteres de ácidos graxos foram maiores em B5>B10>B50; e, B100 apresentou valores intermediários de degradação; a biodegradação dos alcenos foi maior em B50 e B10> B5e B0.

Agradecimentos

As atividades deste projeto foram financiadas pelo CNPq e CAPES. Também agradecemos a Ipiranga Produtos de Petróleo por fornecer os combustíveis e pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas

- (1) Suflita, J. M.; Aktas, D. F.; Oldham, A. L.; Perez-Ibarra, B. M.; Duncan, K. *Biofouling* **2012**, *28*, 1003–1010.
- (2) Passman, F. J. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2013**, *81*, 88–104.
- (3) Bento, F. M.; Gaylarde, C. C. *Int. Biodeterior. & Biodegrad.* **2001**, *47*, 107–112.
- (4) Bento, F.; Beech, I.; Gaylarde, C.; Englert, G.; Muller, I. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21*, 135–142 LA – English.
- (5) Passman, F. J. *Fuel_and_Fuel_System_Microbiology_Fundam*, 2003, 47.
- (6) Jakeria, M. R.; Fazal, M. A.; Haseeb, A. S. M. A. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *30*, 154–163.
- (7) Bucker, F.; Barbosa, C. S.; Quadros, P. D.; Bueno, M. K.; Fiori, P.; Huang, C. t.; Frazzon, A. P. G.; Ferrão, M. F.; de Oliveira Camargo, F. A.; Bento, F. M. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 2014.
- (8) M. Bento, F.; C. Gaylarde, C. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2001**, *47*, 107–112.
- (9) Knothe, G. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2010**, *36*, 364–373.

- (10) Elshahed, M. S. *J. Adv. Res.* **2010**, *1*, 103–111.
- (11) Passman, F. J. In *Proceedings IASH*, 2003.
- (12) Products, P. 1–11.
- (13) Hill, E.C. ; Hill, G. C. In *11 th, Proceedings Of The International Conference On Stability And Handling Of Liquid Fuels*; 2009; pp. 1525–1580.
- (14) ANP - Agência Nacional do Petróleo, G. N. E. B. **2014**.
- (15) Yassine, M. H.; Wu, S.; Suidan, M. T.; Venosa, A. D. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4619–4627.
- (16) Das, N.; Chandran, P. *Biotechnol. Res. Int.* **2011**, *2011*, 941810.
- (17) Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 503–549.
- (18) Lopes, M.; Serrano, L.; Ribeiro, I.; Cascão, P.; Pires, N.; Rafael, S.; Tarelho, L.; Monteiro, A.; Nunes, T.; Evtuygina, M.; Nielsen, O. J.; Gameiro da Silva, M.; Miranda, A. I.; Borrego, C. *Atmos. Environ.* **2014**, *84*, 339–348.
- (19) Ruane, J.; Sonnino, A.; Agostini, A. *Biomass and Bioenergy* **2010**, *34*, 1427–1439.
- (20) Cremonoz, P. A.; Feroldi, M.; Feiden, A.; Gustavo Teleken, J.; José Gris, D.; Dieter, J.; de Rossi, E.; Antonelli, J. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *43*, 352–362.
- (21) Atabani, a. E. E.; Silitonga, a. S. S.; Badruddin, I. A.; Mahlia, T. M. I. M. I.; Masjuki, H. H. H.; Mekhilef, S. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16*, 2070–2093.
- (22) Khan, T. M. Y.; Atabani, A. E.; Badruddin, I. A.; Badarudin, A.; Khayoon, M. S.; Triwahyono, S. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *37*, 840–851.
- (23) Horel, A.; Schiewer, S. *Chemosphere* **2014**, *109*, 150–156.
- (24) Aktas, D. F.; Lee, J. S.; Little, B. J.; Duncan, K. E.; Perez-Ibarra, B. M.; Suflita, J. M. *Int. Biodeterior. & Biodegrad.*
- (25) Cyplik, P.; Schmidt, M.; Szulc, A.; Marecik, R.; Lisiecki, P.; Heipieper, H. J.; Owsianiak, M.; Vainshtein, M.; Chrzanowski, Ł. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 4347–4352.
- (26) Owsianiak, M.; Chrzanowski, Ł.; Szulc, A.; Staniewski, J.; Olszanowski, A.; Olejnik-Schmidt, A. K.; Heipieper, H. J. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1497–1500.
- (27) Lisiecki, P.; Chrzanowski, Ł.; Szulc, A.; Ławniczak, Ł.; Białas, W.; Dziadas, M.; Owsianiak, M.; Staniewski, J.; Cyplik, P.; Marecik, R.; Jeleń, H.; Heipieper, H. J. *Fuel* **2014**, *116*, 321–327.
- (28) Prince, R. C.; Haitmanek, C.; Lee, C. C. *Chemosphere* **2008**, *71*, 1446–1451.
- (29) DeMello, J. A.; Carmichael, C. A.; Peacock, E. E.; Nelson, R. K.; Samuel Arey, J.; Reddy, C. M. *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, *54*, 894–904.
- (30) Cyplik, P.; Schmidt, M.; Szulc, A.; Marecik, R.; Lisiecki, P.; Heipieper, H. J.; Owsianiak, M.; Vainshtein, M.; Chrzanowski, Ł. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 4347–4352.

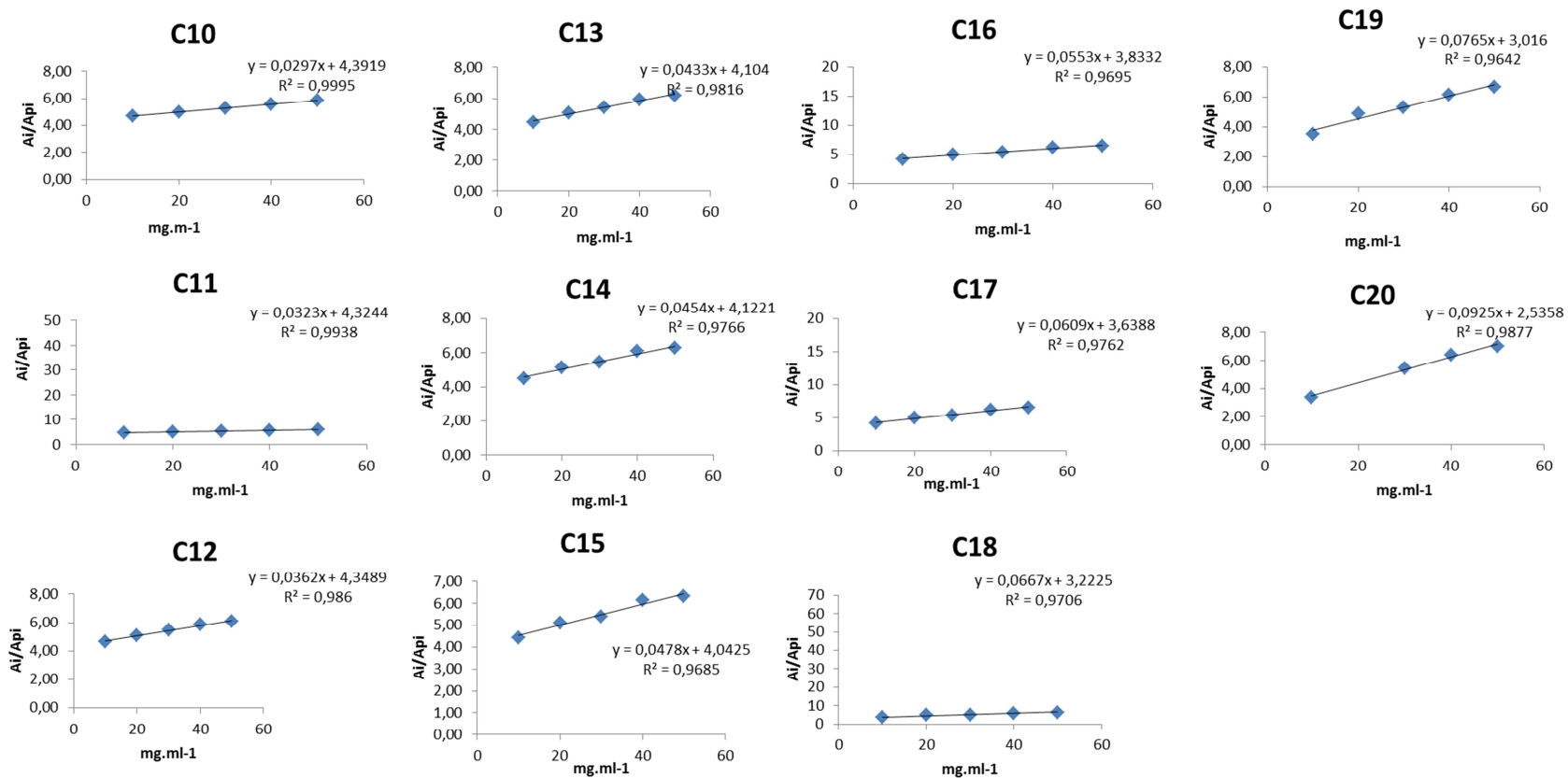
- (31) Bückner, F.; Santestevan, N. A.; Roesch, L. F.; Seminotti Jacques, R. J.; Peralba, M. do C. R.; Camargo, F. A. de O.; Bento, F. M. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2011**, *65*, 172–178.
- (32) Pasqualino, J. C.; Montané, D.; Salvadó, J. *Biomass and Bioenergy* **2006**, *30*, 874–879.
- (33) Zhang, X.; Peterson, C.; Reece, D.; Haws, R.; Möller, G. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* **1998**, *41*, 1423–1430.
- (34) Powell, S. M.; Ferguson, S. H.; Bowman, J. P.; Snape, I. *Microb. Ecol.* **2006**, *52*, 523–532.
- (35) Jurelevicius, D.; Alvarez, V. M.; Peixoto, R.; Rosado, A. S.; Seldin, L. *PLoS One* **2013**, *8*.
- (36) Li, H.; Wang, X.-L.; Mu, B.-Z.; Gu, J.-D.; Liu, Y.-D.; Lin, K.-F.; Lu, S.-G.; Lu, Q.; Li, B.-Z.; Li, Y.-Y.; Du, X.-M. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2013**, *76*, 49–57.
- (37) Sørensen, G.; Pedersen, D. V; Nørgaard, A. K.; Sørensen, K. B.; Nygaard, S. D. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 5259–5264.
- (38) Sørensen, G.; Pedersen, D. V; Nørgaard, A. K.; Sørensen, K. B.; Nygaard, S. D. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 5259–5264.
- (39) Lee, J. S.; Ray, R. I.; Little, B. J. *Biofouling* **2010**, *26*, 623–635.
- (40) White, J.; Gilbert, J.; Hill, G.; Hill, E.; Huse, S. M.; Weightman, A. J.; Mahenthiralingam, E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4527–4538.
- (41) Systems, F.; High, C.; Gas, R.; Procedures, C.; Water, F. A.; Materials, A.; Testing, M.; Blend, B.; Pipelines, P. P.; Registration, F. A. **2011**, 1–5.
- (42) Bushnell, L. D.; Haas, H. F. *J. Bacteriol.* **1941**, *41*, 653–673.
- (43) Hill, E. C. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 121–128.
- (44) Silva, T. R.; Verde, L. C. L.; Santos Neto, E. V; Oliveira, V. M. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2013**, *81*, 57–70.
- (45) Borneman, J.; Hartin, R. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4356–4360.
- (46) Nadkarni, M. A.; Martin, F. E.; Jacques, N. A.; Hunter, N. *Microbiology* **2002**, *148*, 257–266.
- (47) Maila, M. P.; Randima, P.; Drønen, K.; Cloete, T. E. *Soil Biol. Biochem.* **2006**, *38*, 303–310.
- (48) Vainio, E. J.; Hantula, J. **2000**, *104*, 927–936.
- (49) Oros-Sichler, M.; Gomes, N. C. M.; Neuber, G.; Smalla, K. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *65*, 63–75.
- (50) Cooper, D. G.; Goldenberg, B. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 224–229.
- (51) Van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463–471.

- (52) Da Cunha, M. E.; Schneider, J. K.; Brasil, M. C.; Cardoso, C. A.; Monteiro, L. R.; Mendes, F. L.; Pinho, A.; Jacques, R. A.; Machado, M. E.; Freitas, L. S.; Caramão, E. B. *Microchem. J.* **2013**, *110*, 113–119.
- (53) Schulz, S.; Pérez-de-Mora, A.; Engel, M.; Munch, J. C.; Schloter, M. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *80*, 295–298.
- (55) Muyzer, G.; de Waal, E. C.; Uitterlinden, A. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 695–700.
- (56) Schleicher, T.; Werkmeister, R.; Russ, W.; Meyer-Pittroff, R. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 724–730.
- (57) Whyte, L. G.; Schultz, A.; van Beilen, J. B.; Luz, A. P.; Pellizari, V.; Labbé, D.; Greer, C. W. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, *41*, 141–150.
- (58) Rojo, F. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology SE* - 59; Timmis, K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2010; pp. 781–797.

1
2

Material Suplementar 1

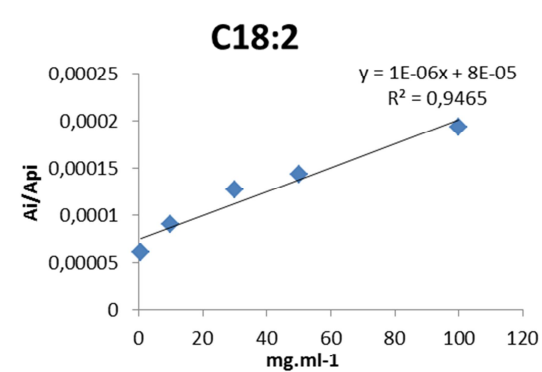
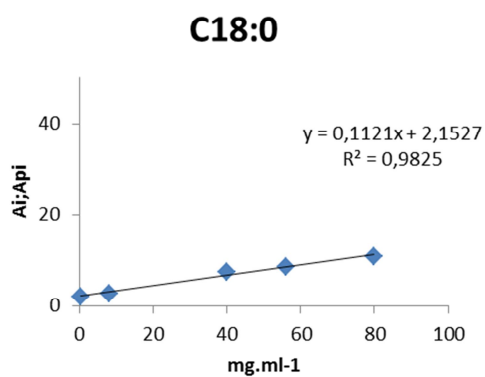
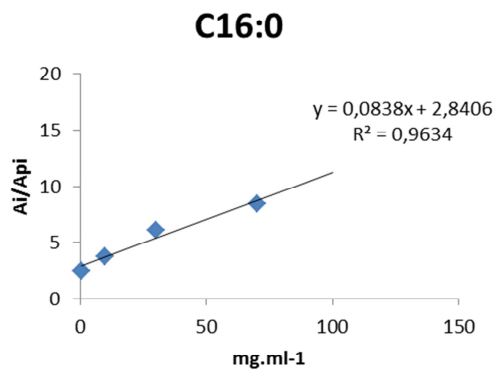
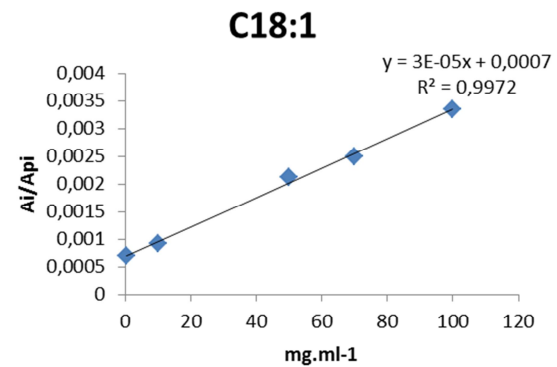
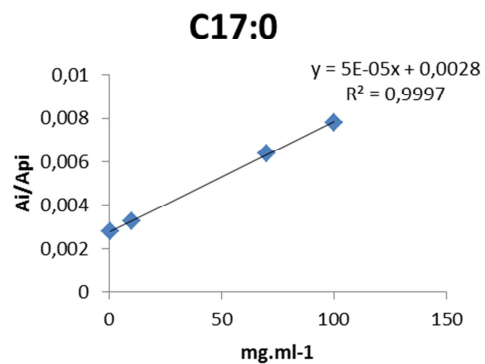
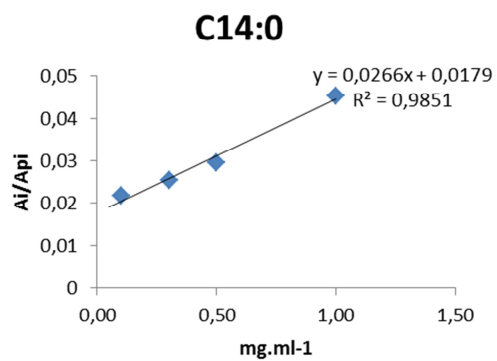
Curvas analíticas obtidas para a determinação quantitativa por GC/qMS de n-alcenos



3
4
5

Material Suplementar 1

Curvas analíticas obtidas para a determinação quantitativa por GC/qMS de ésteres de ácidos graxo

1
2
34
5

5. CAPÍTULO 3
FUEL BIODEGRADATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION
OF MICROBIAL BIOFILMS IN STORED DIESEL/BIODIESEL BLEND
B10 AND THE EFFECT OF BIOCIDES

Este artigo foi publicado na Revista International Biodegradation and
Biodeterioration, Volume 95, Part B, Novembro 2014, 346–355.

Doi:10.1016/j.ibiod.2014.05.030

Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide

Francielle Bucker ^{a*}, Cristiane Santos Barbosa ^a, Patrícia Dörr Quadros ^a, Mariana Krüger Bueno^a, Paula Fiori^a, Chun te Huang^b, Ana Paula Guedes Frazzon^c, Marco Flores Ferrão^b, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo^d, Fátima Menezes Bento ^a

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

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

^c Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, N° 500 Porto Alegre, RS, Brazil.

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

*corresponding author

Tel: +55 51 3308 4497

E-mail: franbucker@gmail.com

Highlights

The microbial composition in diesel-biodiesel blend B10 was characterized and monitored by culture and non culture methods.

Illumina high throughput sequencing showed that the microbial population in the B10 system includes Archea, the Euryarchaeota and Crenarchaeota.

After 60 days' storage, the system treated with 500 ppm (a.s.) of a multifunctional biocide package yielded more interfacial biomass, indicating that sub-effective doses may lead to increased microbial growth.

Infrared analyses showed biodiesel degradation by the microbial population in fuel both with and without biocide.

Abstract

Microbial biofilms are formed at oil/water interfaces in storage tanks containing diesel-biodiesel blends, decreasing fuel quality and increasing economic and environmental losses. Biocides may suppress the microorganisms responsible for the damage, but they are not used in all parts of the world. A B10 diesel-biodiesel blend (oil as received with or without an inoculum derived from diesel sludge) was incubated with or without 3,3'-methylene bis(5-methyloxazolidine, MBO) - 100% and 50% formulations at 1000, 500 and 0 ppm - over 60 days. The biofilms formed at the oil-water interface were collected for extraction of genomic DNA followed by amplification, purification, and Illumina HiSeq sequencing of the 16S rRNA gene. The prevalent genera in the control fuel (as-received and inoculated) were similar at 28 days (*Pseudomonas*, *Comamonas* and *Burkholderia*); by the 60th day, the microbial community had changed only in the as-received fuel, where the prevalent genera were *Comamonas*, *Klebsiella*, and *Tolomonas*. Archea were detected in samples at 28 and 60 days. 500 ppm (as supplied) MBO 50% did not control the microbial growth and an interfacial biofilm was formed. After 28 days of incubation taxonomic diversity in the as-received fuel and inoculated fuel decreased by 99.7% and 80.9%, respectively. The analysis also revealed that Firmicutes dominated the communities in the treatments with 500 ppm (as supplied) MBO 50%, followed by Proteobacteria, except in the 60 days sample from the as-received fuel, where Proteobacteria dominated, followed by Firmicutes. Inoculation increased degradation of the fuel.

Keywords: Biocide MBO, storage, Illumina Hi Seq, microbial community, biodiesel, PCR

5.1. Introduction

Microbial contamination of fuel can occur at various points in the distribution system, but is particularly noticeable during storage, especially if there is free water in the tank. Biodeterioration of the fuel is shown by the accumulation of biomass and degradation of fuel components (hydrocarbons, fatty acid esters, etc) and provokes blockage of filters, damage to the injection system, and reduced product quality (Gaylarde et al., 1999; Bento et al., 2005; Passman et al., 2005, 2013; Bucker et al., 2011; Zimmer et al., 2013). It is accepted that problems in diesel oil are chronic, but recent changes in the composition of this fuel, the introduction of biodiesel mixtures, reduction of sulfur levels and increase in the use of additives, have increased the biodeterioration risks (Dodos, 2011; Passman, 2013). Various studies have demonstrated that diesel/biodiesel blends are more susceptible to biodegradation and biomass formation during storage (Passman et al., 2005; Sørensen et al., 2011; Bucker et al., 2011; Silva et al., 2012; Passman, 2013).

The removal of bottom water and/or chemical control with biocides are the preventive treatments most frequently recommended (Gaylarde et al., 1999, Bento & Gaylarde, 2001, ABNT 15512, 2008; Siegert et al., 2009; Passman, 2013). The free water formed in the tank bottom by condensation from humid air stimulates the production of microbial biofilms (Gaylarde et al., 1999, Bento & Gaylarde, 2001, Passman, 2013). Biocide use in fuel is allowed in the USA, following regulations of the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA) (Passman, 2013). In Brazil, this does not happen (for diesel B). One potential antimicrobial compound for use in fuels is 3,3-methylenebis (5-methyloxazolidine – MBO), which has been used principally for aviation fuel (Passman, 2013).

Studies on microbial contamination in fuel storage tanks traditionally use isolation and cultivation techniques. These are the methods recommended in the Standard Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems (ASTM 6469-11). However, such techniques can underestimate the microbial diversity, being unable to identify the greater part of the species in the population. White et al. (2011) showed that traditional culture methods identified the predominance of bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Bacillus* in contaminated diesel, while culture-independent techniques (pyrosequencing of the 16S rRNA gene) indicated that the genera *Marinobacter*,

Achromobacter, *Burkholderia* and *Halomonas* were the most common. It has been shown that the addition of biodiesel to diesel oil makes the fuel more susceptible to microbial contamination (Bücker et al., 2011; Sørensen et al., 2011; Silva et al., 2012). Lee et al. (2010) and Sørensen et al. (2011), using DGGE, showed that the microbial communities in fuel blends varied according to the proportion of biodiesel present. This and other molecular techniques are important to identify previously undetected contaminants, discover the dynamics of growth in the fuel and determine populations resistant or tolerant to antimicrobial treatments.

We applied Illumina high throughput sequencing to study the diversity of microbial communities in microcosms simulating B10 storage with and without MBO in pure form (MBO 100%) and as an additive package (MBO50%).

5.2. Materials and Methods

5.2.1. Fuel

Fuels used were: low sulfur content (50ppm) diesel oil (Diesel A), and Biodiesel (80% soy and 20% tallow), provided by Ipiranga Produtos de Petróleo S/A (Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil). B10 blend was prepared in the laboratory by aseptically mixing 10% Biodiesel and 90% Diesel A. The fuels were used in as-received condition, without sterilization.

5.2.2 Biocide test

3,3'-methylene bis(5- methyloxazolidine (MBO) was tested in the pure form (MBO100%) and as an additive formulation containing 50% biocide (MBO50%)” for its ability to inhibit microbial growth. Final concentrations of 1000, 500 and 0 ppm (control) of either were added to the oily phase and homogenized before adding the flasks with water phase sterilized (mineral medium). MBO concentrations (500 and 1000 ppm) are presented as supplied (a.s.) or active ingredient (a.i.).

5.2.3 Simulated storage

60mL Bushnell-Haas mineral medium (Bushnell and Haas, 1941) were sterilized in 200 mL glass flasks. 20mL B10 blend was added and the flasks were incubated at 28°C for 60 days. Destructive (microcosms) sampling was carried out in quintuplicate at every

14 days. Measures for analyzing the estimation of microorganisms in the aqueous phase, oily phase and the biomass formed at the oil-water interface were performed in triplicate. The other two replicates were used for DNA extraction of biomass formed at the oil-water interface (just at 28 and 60 days). From each repetition was assembled a sample of extracted DNA in a single tube.

5.2.4 Inoculation

Two levels of fuel contamination were used: fuel as received from the distributor and the same fuel inoculated with a mixture of microorganisms prepared according to ASTM E1259 (ASTM, 2010). For the latter, an Erlenmeyer flask containing 100 mL of Bushnell–Haas broth (Bushnell and Haas, 1941) supplemented with 2% sterile B10 blended fuel was inoculated with 5 mL of microbial sludge mix previously obtained from various fuels (diesel, biodiesel and diesel/biodiesel blends B4 and B5) and incubated at 28°C and 200 rpm for 7 days. In order to obtain the media microbial challenge the inoculum prepared as above was then diluted 1:10 to produce the medium challenge (1×10^6 CFU/mL to bacteria and fungi) using Bushnell–Haas broth.

5.2.5 Analysis

5.2.5.1 Microbial growth

The aqueous phase from the microcosms were periodically diluted in sterile saline and plated on plate count agar (PCA - Himedia) for heterotrophic bacteria. Fungi were enumerated on potato dextrose agar (PDA - Himedia). Plates were incubated at 28°C for 48 h in the case of PCA and 7 days for PDA. The enumeration of microorganisms from oil phase was performed according to the French Standard AFNOR- M 07-070/92 (Hill, 1998). 5 mL of B10 blend was collected, diluted in an aqueous solution of 0.1% Tween 80 and plated on agar (PDA) for fungi and for heterotrophic bacteria (PCA).

After 28 and 60 days, the interfacial biomass was filtered through previously weighed filter paper. To remove adhered fuel from the biomass, discs were filter 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 recorded. Biomass weight was calculated as final weight minus initial weight (mg); triplicate values were averaged.

5.2.5.2 Oil-water interface

5.2.5.2.1 DNA extraction

The biomass formed at interface oil-water from two replicates (microcosms destructives) after 28 and 60 days was centrifuged at 6,000 rpm for 10 m in sterile 15mL tubes containing 5mL Mili Q water to remove excesso oil. The supernatant was discarded and 300 mg of the pellet was used for DNA extraction using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO Inc., Laboratories, USA), according to manufacturer's instructions, modified as described by Silva et al. (2012). Separate extractions for each replicate were done and was assembled a sample of extracted DNA in a single tube for each time (28 and 60 days), from two replicates.

5.2.5.2.2 Analysis of the microbial population by IlluminaHiSeq - high throughput sequencing of the 16S rRNA gene

The extracted genomic DNA was quantified and standardized prior to amplification of the V4 region of the 16S rDNA gene by PCR. Primers used were 515F and 806R (Caporaso et al., 2010). DNA was denatured at 94°C for 3 min, followed by 20 cycles of 94°C for 45 sec, 53°C for 30 sec, and 65°C for 90 sec. Final elongation was at 65°C for 10 m. The PCR products were purified using the Qiagen™ PCR purification kit, following the manufacturer's protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA) apart from the elution step, when sterile water was used. The final product was quantified by fluorimetry in a Qubit 2.0 Fluorimeter (Invitrogen, NY, USA).

The DNA was sequenced in an Illumina II GAx sequencer (Illumina, Inc., CA, USA) with 101 reading cycles and paired sequences processed according to Fagen et al. (2012) and Giongo et al. (2010 a,b). First, sequences were trimmed to remove low quality bases and the first 7 bases corresponding to the primer, using the programme Trim2, available at <https://gist.github.com/1006830> (Huang et al., 2003). The reads were then separated by barcode (<https://gist.github.com/1006983>); each barcode represents an individual sample. They were then analyzed using the software CLC v3.0.2b and the 16S RDP data bank (Cole et al., 2009).

The taxonomic groups, based on the NCBI taxonomy data bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), were generated using TaxCollector pipeline (Giongo et

al., 2010 b). Sequences were filtered and classified by similarity, considering a minimum of 80% similarity for phylum and 95% for genus. An abundance matrix of taxonomic units was then created for each taxonomic level. Pairs that did not correspond to RDP sequences were assigned to their last common ancestor (LCA), and those that did not pair with an LCA, or any alternative in the RDP data bank, were considered unclassified. To standardize the various levels of sequencing, the abundance matrices for the taxonomic units of each sample were divided by the total number of pairings after the cut.

5.2.5.4 Analysis of oil phase

After 60 days, the oil phase was removed from each flask and stored at 4°C. The chemical changes in the fuel phase were analyzed by FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). FTIR spectra were obtained using the Perkin Elmer Spectrum 400 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 4000 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) and Principal Component Analysis (PCA) in the spectral region from 1800 to 650 cm^{-1} using MATLAB 7.11 (The Mathworks) and PLS-Toolbox 6.0 software (Eigenvector Research).

5.3. Results

5.3.1. Microbial growth and biocide action

The viable cell concentrations in the aqueous and oil phases of the flasks with the as-received and inoculated fuels, with and without biocide, over the 60 days of incubation, are shown in Figures 1 and 2. Table 1 presents the interfacial biomass levels in the flasks.

Pure MBO (MBO 100%) controlled microbial growth and interfacial biomass formation at both concentrations used (500 and 1000 ppm **active ingredient**- a.i.) in all flasks. The results at 500 ppm **as supplied** (a.s.) MBO 50% in as-received fuel, showed that microbial numbers in the aqueous and oil phases were reduced, but interfacial biomass was still formed and, in fact, reached a mass 5.5 times higher than in the control flasks. In the inoculated fuel, an initial reduction in bacterial cell numbers in both phases was followed by growth. Fungal numbers in the oil phase, however, fell below control levels at 14 and 42 days, and no fungi were detected at 60 days (Fig 2b) and interfacial biomass levels were reduced in comparison to the control (Table 1). This indicates that the 500 ppm (a.s.) MBO 50% had fungistatic activity.

1000 ppm (a.s.) MBO50% controlled microbial growth in the aqueous and oil phases in as-received fuel and, for the first few days only, in the inoculated fuel, especially in the aqueous phase. An interfacial biomass was finally formed in the inoculated flasks, although this was considerably reduced in comparison to the controls.

We observed that 1000 ppm (a.s.) MBO 50% (that corresponds to 500 ppm a.i.) performs as well as 500 ppm MBO 100% (also 500 ppm a.i.).

Table 1. Biomass at the oil/water interface in microcosms with MBO 50% and MBO100%, at 1000, 500 and 0 (Control) ppm as supplied and active ingredient, respectively, added to fuel as-received and with a microbial inoculum (ASTM E1259-10).

Biocide (ppm)	Fuel as received					Inoculated fuel (ASTM E1259-10)				
	0 Control	MBO 50%		MBO 100%		0 Control	MBO 50%		MBO 100%	
Time (days)		500 (a.s.)	1000 (a.s.)	500 (a.i.)	1000 (a.i.)		500 (a.s.)	1000 (a.s.)	500 (a.i.)	1000 (a.i.)
14	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
28	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
42	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
60	32 ± 5	176 ± 2	0.0	0.0	0.0	41 ± 9.5	28 ± 6	20 ± 3	0.0	0.0

(a.s.): as supplied; (a.i.): active ingredient.

+: growth at oil/water interface.

-: no growth at oil/water interface.

Bold denotes dry weight (mg) of biomass formed at oil/water interface at the end of 60 days.

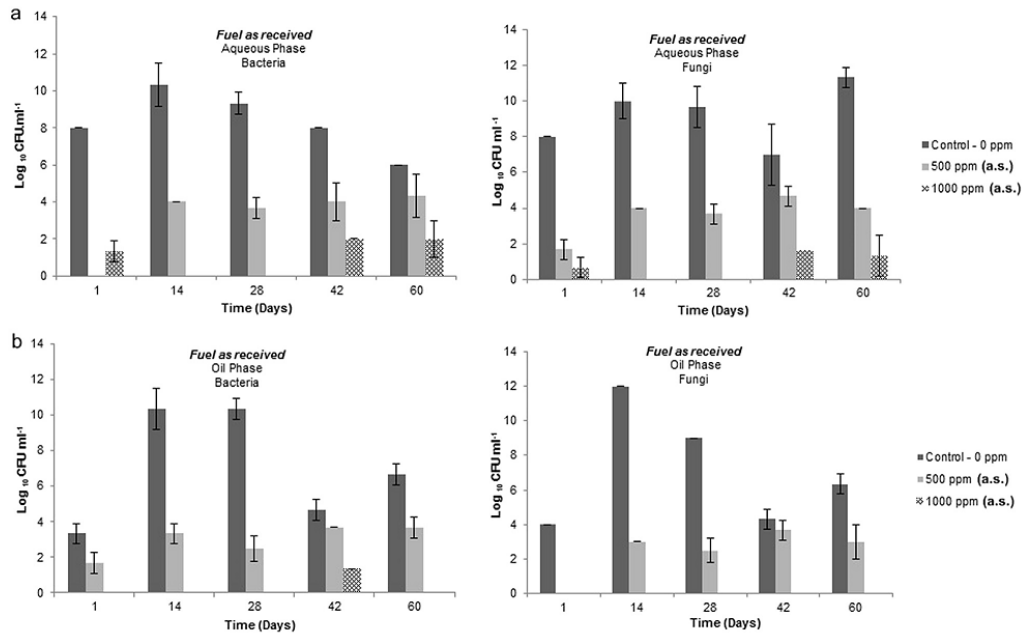


Figure 1. Microbial counts in *fuel as received* (Control, 500 and 1000 ppm (as supplied) MBO 50% after 1, 14, 28, 42 and 60 days. a) aqueous phase; b) oil phase.

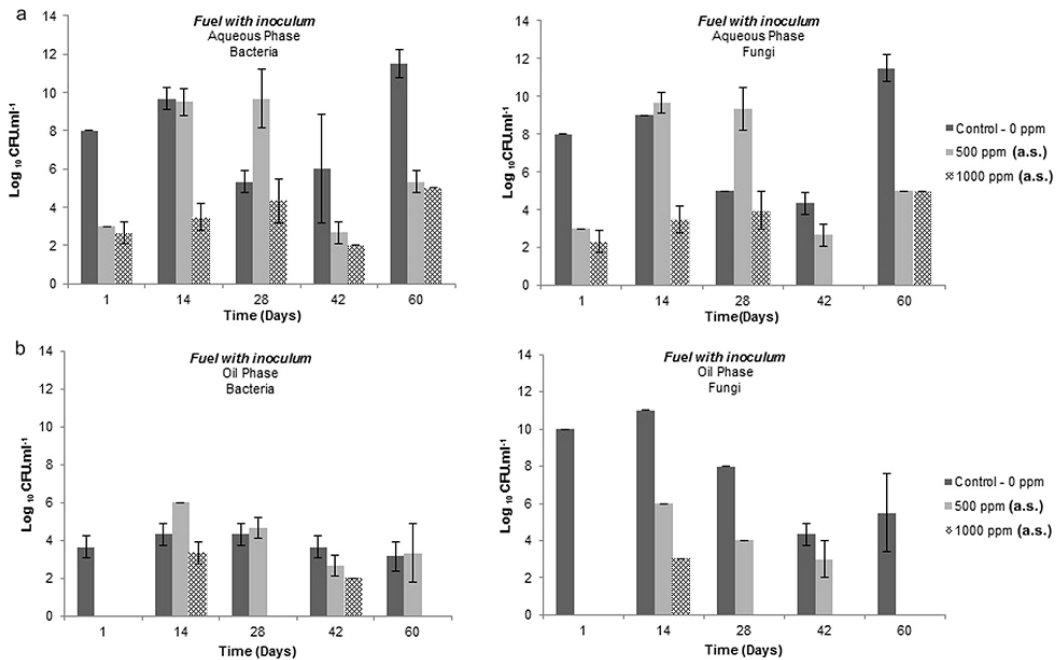


Figure 2. Microbial counts in *fuel with inoculum* (Control, 500 and 1000 ppm (as supplied) MBO50% after 1, 14, 28, 42 and 60 days. a) aqueous phase; b) oil phase.

5.3.2 Microbial community revealed by ILLUMINA HiSeq analysis of 16S rRNA gene

A total of 421,182 V6 16S rRNA gene amplicons were obtained by ILLUMINA HiSeq from eight samples of the interfacial biomass from the treatments without MBO (0 ppm) and with 500 ppm (a.s.) of MBO50% at 28 and 60 days, as well as from one sample of the inoculum (Table 2).

The best match analysis of metagenomic readings against all available archeal and bacterial genomes revealed a very small number of archeal sequences, < 5% of the total. Sequences from the archeal phyla Euryarchaeota and Crenarchaeota were detected at 28 and 60 days in all the samples analyzed except at 28 days in as-received fuel with 500 ppm (a.s.) MBO50% .

The analysis also revealed that Firmicutes dominated the communities from the treatments with 500 ppm (a.s.) MBO50%, followed by Proteobacteria, except in the 60 day flask with as-received fuel (Figure 3), in which the predominant community were Proteobacteria (70%), followed by Firmicutes (24%). The Proteobacteria also dominated the communities from all treatments without MBO (control) (Figure 3), followed by Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria.

The otherwise uncharacterized inoculum showed 76.5% Proteobacteria, 17.6% Bacteroidetes and 4.5% Firmicutes (Figure 3).

Table 2. Total sequences obtained by high throughput sequencing (ILLUMINA HiSeq) and classified with the RDP data bank.

Treatment MBO 50% (ppm-a.s.)	Contamination level	Time (days)	Classified	Not classified	Total
	Inoculum	0	40,274	47,576	87,850
0	Fuel as received	28	10,731	12,263	22,994
500	Fuel as received	28	14	40	54
0	Inoculated fuel	28	22,359	28,845	51,204
500	Inoculated fuel	28	3435	6361	9796
0	Fuel as received	60	12,539	25,722	38,261
500	Fuel as received	60	9487	12,241	21,728
0	Inoculated fuel	60	65,677	105,331	171,008
500	Inoculated fuel	60	5477	12,810	18,287
Total			169,993	251,189	421,182

(a.s.): as supplied.

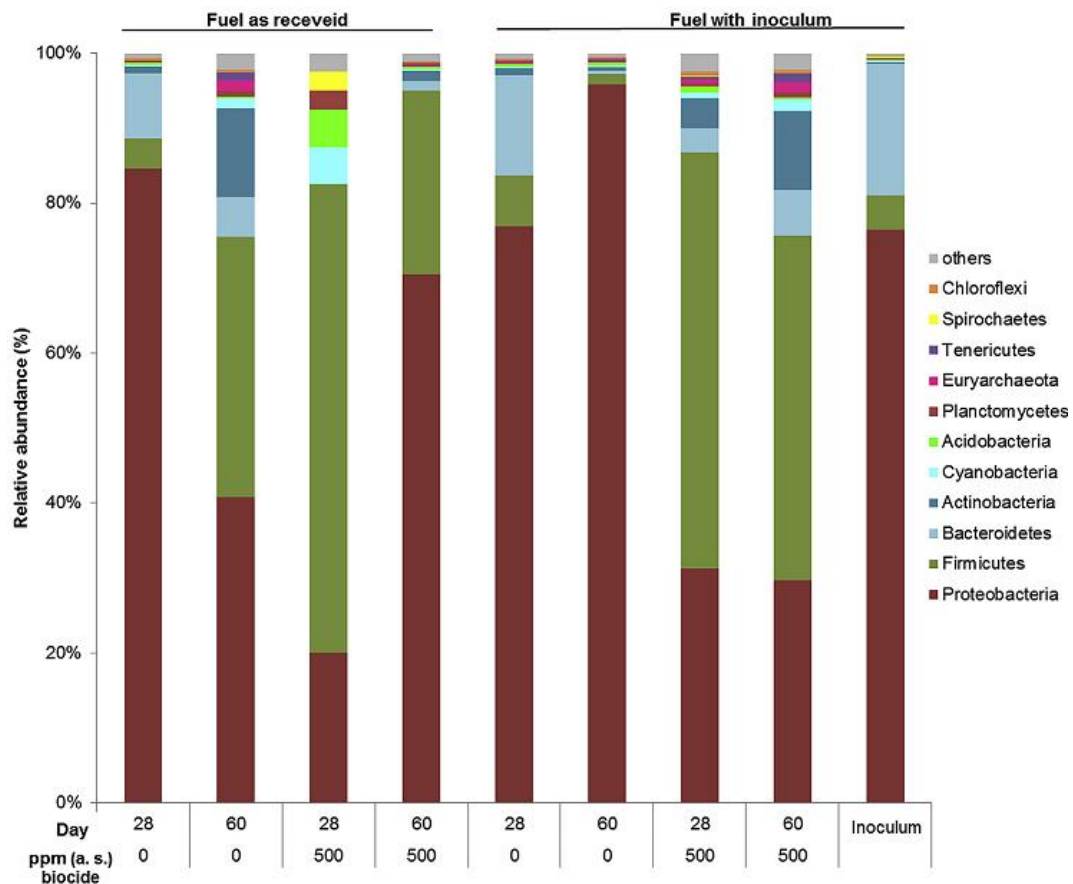


Figure 3. Microbial communities analyzed by RDP classifier using 16S rRNA gene hit reads blasted and extracted from metagenomic data sets. Relative abundance at phylum level after 28 and 60 days, and comparison with the added inoculum.

*Others: refers to prokaryotes with relative abundance below 1%.

5.3.2.1 Microbial community in untreated fuel

In the control treatment without biocide, as-received fuel after 28 day's incubation contained predominantly *Pseudomonas* (22.2%), followed by *Comamonas* (10.4%), *Burkholderia* (3.1%), *Dysgonomonas* (2.8%), and *Hylemonella* (2.3%) (Fig. 4 e Table 3). After 60 days, the population changed to: 13.7% *Comamonas*, 4.5% *Klebsiella*, 3.4% *Tolomonas*, and there was an increase in endospore-forming bacteria such as *Bacillus* (1.1%) and *Clostridium* (0.5%).

The inoculum, derived from contaminated fuel sludge, yielded the following principal taxa: *Comamonas* (10.5%), *Burkholderia* (16.4%), *Dysgonomonas* (5.9%), *Hylemonella* (4.7%), *Klebsiella* (1.7%) (Fig. 4 and Table 3).

The 28-day control treatment for the inoculated fuel produced *Pseudomonas* (12.2%), *Comamonas* (10.7%), *Burkholderia* (7.1%), *Dysgonomonas* (4.6%), and *Hylemonella* (2.0%) (Fig. 4). After 60 days, the 3 principal taxonomic groups remained: *Pseudomonas* (19.2%), *Comamonas* (9.9%), and *Burkholderia* (3.6%) (Fig.4 and Table 3).

Thus the inoculum did not greatly affect the microbial richness or diversity within the fuel/water systems.

5.3.2.2 Microbial community: Impact of 500 ppm (a.s.) MBO 50% on the oil/water interface microbial community

The effect of 500 ppm (a.s.) MBO 50% in as-received fuel on the microbial community was evaluated after 28 days of experiment. A total of 22,994 OTUs were identified from the fuel as received control (0 ppm) (between classified and unclassified sequences), and in the treatment with 500 ppm (a.s.) MBO50% in as-received fuel were identified 54 OTUs . It was found that 500 ppm (a.s.) MBO50% in as-received fuel led to a reduction of 99,77% in the number of sequences identified (Table 2). The predominant genera identified were: *Comamonas* (7.04%), *Hylemonella* (1.8%), *Coprococcus* (1.8%), *Klebsiella* (1.8%), *Desulfovibrio* (1.8%), *Propionispora* (1.8%), *Staphylococcus* (1.8%), *Leptolyngbya* (1.8%), *Faecalibacterium* (1.8%), *Roseburia* (1.8%), *Treponema* (1.8%), and *Prochlorococcus* (1.8%) (Fig 4 and Table 3).

Although there was a reduction in diversity at 28 days, this concentration (500 ppm a.s.) of MBO50% did not effectively control the microbial community, and the biomass formed at the interface was 5.5 times greater than in the control.

In the inoculated fuel 500 ppm (a.s.) MBO50% reduced the number of sequences at 28 days by a factor of 5.2 compared to the control. The predominant genera were: *Comamonas* (12.0%), *Coprococcus* (7.5%), *Pseudomonas* (4.2%), and *Clostridium* (1.8%) (Fig. 4). There was 32% less biomass than in the control. After 60 days, the populations differed between inoculated and as-received fuels, suggesting the differential selection of microorganisms by the biocide (Fig.4 and Table 3).

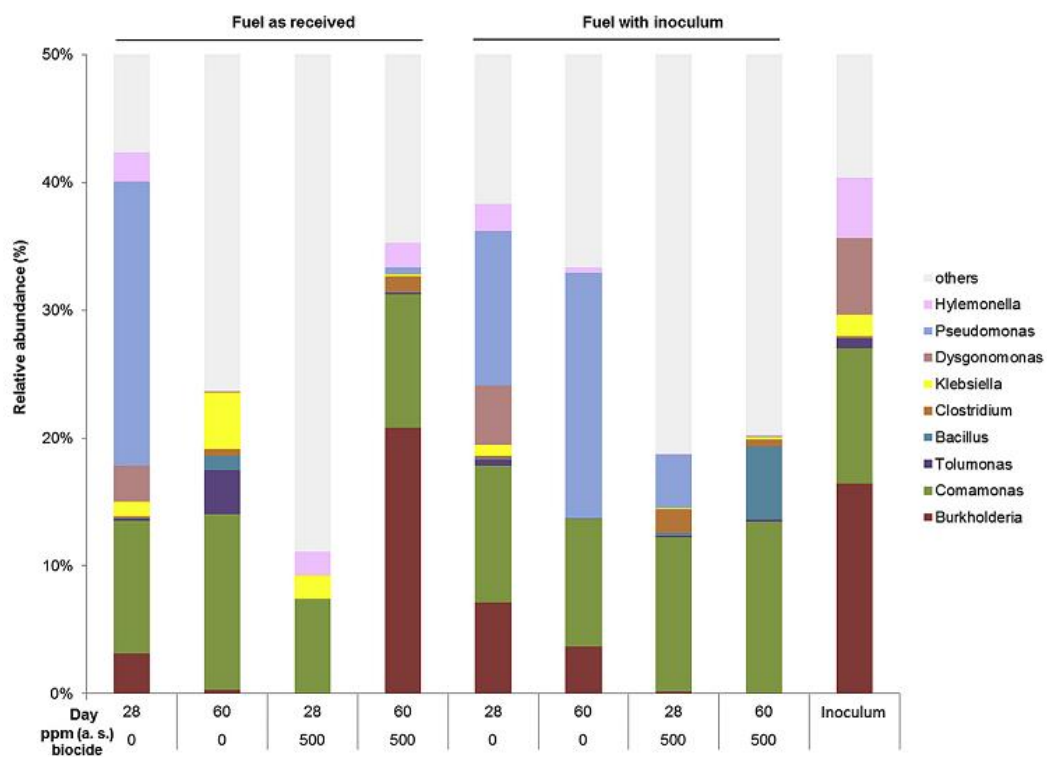


Figure 4. Relative abundance of genera determined by 16S rRNA gene analysis (>1%) in microbial communities from control and inoculated treatments, with and without biocide, after 28 and 60 days.

*Others: refers to prokaryotes with relative abundance below 1%.

Table 3. Relative abundance of 16S rRNA gene, at genera level after 28 and 60 days, from fuel as received and fuel with inoculum, and comparison with the pure inoculum. Only the OTUs with averaged relative abundance $\geq 0.01\%$ are listed and classified at genera level.

Table 3
Relative abundance of 16S rRNA gene, at genera level after 28 and 60 days, from fuel as received and fuel with inoculum, and comparison with the pure inoculum. Only the OTUs with averaged relative abundance $\geq 0.01\%$ are listed and classified at genera level.

Genera	Fuel as received				Fuel with inoculum				Inoculum	Average between treatments
	28 days/	60 days/	28 days/	60 days/	28 days/	60 days/	28 days/	60 days/		
	0	0	500	500	0	0	500	500		
	ppm	ppm	ppm a.s.	ppm a.s.	ppm	ppm	ppm a.s.	ppm a.s.		
<i>Comamonas</i>	10.4	13.75	7.41	10.4	10.73	9.98	12.08	13.42	10.56	10.97
<i>Pseudomonas</i>	22.25	+	0.00	+	12.12	19.21	4.21	+	+	6.53
<i>Burkholderia</i>	3.12	+	0.00	20.83	7.10	3.65	+	+	16.45	5.73
<i>Dysgonomonas</i>	2.78	+	0.00	+	4.62	0.00	+	+	5.95	1.50
<i>Hylemonella</i>	2.30	+	1.85	1.94	2.07	+	+	+	4.70	1.50
<i>Coprococcus</i>	+	+	1.85	2.82	+	+	7.53	+	+	1.39
<i>Klebsiella</i>	1.21	4.37	1.85	+	+	0.00	+	+	1.67	1.16
<i>Bacillus</i>	+	1.11	0.00	+	+	+	+	5.73	+	+
<i>Tolomonas</i>	+	3.46	0.00	+	+	0.00	+	+	+	+
<i>Clostridium</i>	+	+	0.00	1.24	+	+	1.87	+	+	+
<i>Desulfovibrio</i>	+	+	1.85	+	+	+	+	+	+	+
<i>Propionispora</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	+	+	+	+
<i>Staphylococcus</i>	+	+	1.85	0.00	+	+	+	+	0.00	+
<i>Leptolyngbya</i>	+	+	1.85	+	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Paenibacillus</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	1.14	+	+
<i>Faecalibacterium</i>	+	+	1.85	+	+	+	+	+	+	+
<i>Roseburia</i>	0.00	+	1.85	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Treponema</i>	0.00	+	1.85	0.00	+	+	+	+	+	+
<i>Prochlorococcus</i>	+	+	1.85	0.00	0.00	+	0.00	0.00	+	+
<i>Oscillospira</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfobacterium</i>	0.00	+	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Bacteroides</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ca, Azobacteroides</i>	+	+	0.00	0.00	+	0.00	+	+	+	+
<i>Roseomonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+	0.00	+
<i>Brachymonas</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aeromonas</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	0.00	+	+	+
<i>Oscillatoria</i>	0.00	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+
<i>Acetobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	0.00	0.00	0.00	+	+
<i>Thiomonas</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+	+
<i>Stenotrophomonas</i>	+	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+
<i>Methyloversatilis</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+	+
<i>Coprobacillus</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	+
<i>Sutterella</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	0.00	+	+
<i>Lysobacter</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Anaerostipes</i>	0.00	+	0.00	+	0.00	+	+	+	0.00	+
<i>Anaerospira</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	+	0.00	+	+
<i>Prevotella</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Anaeroplasma</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Ruminococcus</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i>	0.00	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+
<i>Calothrix</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Cyclobacterium</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	+
<i>Sedimentibacter</i>	+	+	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+
<i>Pandoraea</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	0.00	0.00	+	+
<i>Novosphingobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	0.00	0.00	+
<i>Ralstonia</i>	+	+	0.00	+	+	+	0.00	+	+	+
<i>Edwardsiella</i>	+	0.00	0.00	0.00	+	0.00	+	+	+	+
<i>Lautropia</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Veillonella</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Deinococcus</i>	0.00	+	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Methylobacterium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+	0.00	+
<i>Halorubrum</i>	0.00	+	0.00	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Providencia</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	0.00	+	+	+
<i>Kingella</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	0.00	+	+
<i>Rhodocyclus</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+	+
<i>Streptococcus</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Rhodiferax</i>	+	0.00	0.00	+	+	0.00	0.00	0.00	+	+
<i>Capnocytophaga</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Magnetococcus</i>	0.00	+	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Eubacterium</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ca, Solibacter</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microvirgula</i>	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	0.00	+
<i>Spongibacter</i>	+	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+
<i>Natronococcus</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	+
<i>Methanocorpusculum</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Methanocella</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Dyella</i>	+	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	0.00	0.00	+

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Relative abundance of 16S rRNA gene (%)										
Genera	Fuel as received				Fuel with inoculum				Inoculum	Average between treatments
	28 days/ 0 ppm	60 days/ 0 ppm	28 days/ 500 ppm a.s.	60 days/ 500 ppm a.s.	28 days/ 0 ppm	60 days/ 0 ppm	28 days/ 500 ppm a.s.	60 days/ 500 ppm a.s.		
<i>Shewanella</i>	+	+	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+	+
<i>Blautia</i>	0.00	+	0.00	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Rhodoplanes</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Macrococcus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	+	0.00	+
<i>Bifidobacterium</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Psychrobacter</i>	+	0.00	0.00	0.00	+	+	+	+	+	+
<i>Pantoea</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	+	+	+	+
<i>Taylorella</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+	+
<i>Ca. Pelagibacter</i>	+	+	0.00	+	+	+	0.00	+	+	+
<i>Ca. Glomeribacter</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+	+
<i>Photobacterium</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	0.00	0.00	+
<i>Halorhodospira</i>	+	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+
<i>Sporotalea</i>	+	+	0.00	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Janthinobacterium</i>	+	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+	+
<i>Zoogloea</i>	0.00	+	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+	+
<i>Sphingomonas</i>	0.00	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	0.00	+
<i>Cytophaga</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>Butyrivibrio</i>	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Thermosinus</i>	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+	+	+	+
<i>Serratia</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	+	+	+	+
<i>Flavobacterium</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	+	0.00	+
<i>Vogesella</i>	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+	+
<i>Volucrobacter</i>	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+	0.00	+	+
<i>Lysinibacillus</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Gemmata</i>	+	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Sphingobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+
<i>Streptomyces</i>	0.00	+	0.00	+	+	+	+	0.00	+	+
<i>Alicyclobacillus</i>	0.00	+	0.00	+	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Delftia</i>	+	+	0.00	+	+	0.00	+	+	0.00	+
<i>Thioalkalimicrobium</i>	+	+	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+
<i>Caloramator</i>	0.00	0.00	0.00	+	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Ca. Phytoplasma</i>	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Rhodococcus</i>	+	+	0.00	0.00	+	+	0.00	+	+	+
<i>Epulopiscium</i>	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+	0.00	0.00	+
<i>Cupriavidus</i>	+	+	0.00	+	+	+	+	+	+	+
<i>LE30</i>	+	+	0.00	0.00	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+
<i>Sarcina</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	+	0.00	0.00	+
<i>Rhodovibrio</i>	0.00	0.00	0.00	+	+	+	+	+	0.00	+
<i>Sphingopyxis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	0.00	+
<i>Actinomyces</i>	+	+	0.00	0.00	+	0.00	+	0.00	+	+
<i>Halomonas</i>	0.00	+	0.00	0.00	+	+	+	+	0.00	+
<i>Corynebacterium</i>	+	+	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	0.00	+
<i>Dechloromonas</i>	+	0.00	0.00	+	+	0.00	0.00	0.00	+	+
<i>Nitrosomonas</i>	0.00	0.00	0.00	+	+	+	0.00	+	+	+
<i>Pediococcus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	+	+	+	+	+	+

(a.s.): as supplied.

+: <1% Relative abundance.

5.3.3 Biodegradation of biodiesel (HATR- FTIR)

This technique detects degradation of carbonyl (C=O) groups in the methyl and ethyl esters of the biodiesel; however, the regions of the B10 blend spectrum analyzed showed no specific absorption band and the carbonyl groups are found within the peaks at 1750 and 1735 cm⁻¹ (Fig. 5).

The dendrogram (Fig. 6) shows the result of grouping the spectra. Treatments with pure MBO show lower carbonyl consumption, as does the as-received fuel with 1000 ppm (a.s.) MBO50%; in other words, those treatments in which there was no formation of interfacial biomass. The as-received fuel is also found in this cluster, even though growth occurred (Table 1).

After 60 days, in the treatments which showed no interfacial biomass and no growth on plates – that is, flasks with inoculum plus MBO100% (1000 and 500 ppm- a. i.) and the

as-received fuel with 1000 ppm (a.i) MBO100% and 1000ppm (a.s.) MBO50% - the carbonyl peak remained, indicating no degradation of the biodiesel (Fig. 5). No secondary peaks were seen at 1710 cm^{-1} , indicating low degradation when compared with the flasks with microbial growth.

Within the flasks showing growth, the control as-received fuel showed the lowest decrease in carbonyl groups; the inoculated control showed 17% more degradation.

Degradation was 6% higher with 500 ppm (a.s) MBO50% than in the as-received fuel control. This was also the treatment in which raised interfacial biomass was found (Section 3.1). In the inoculated fuels degradation was 17% higher in the control, 29% in 1000 ppm MBO50% treatments and 40% with 500 ppm MBO50% .

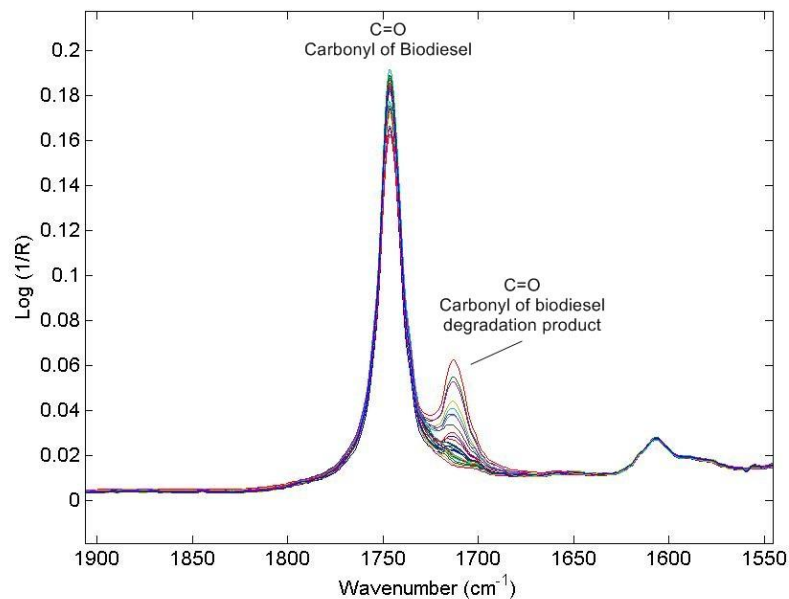


Figure 5. HATR-FTIR spectra for B10 blend from all treatments.

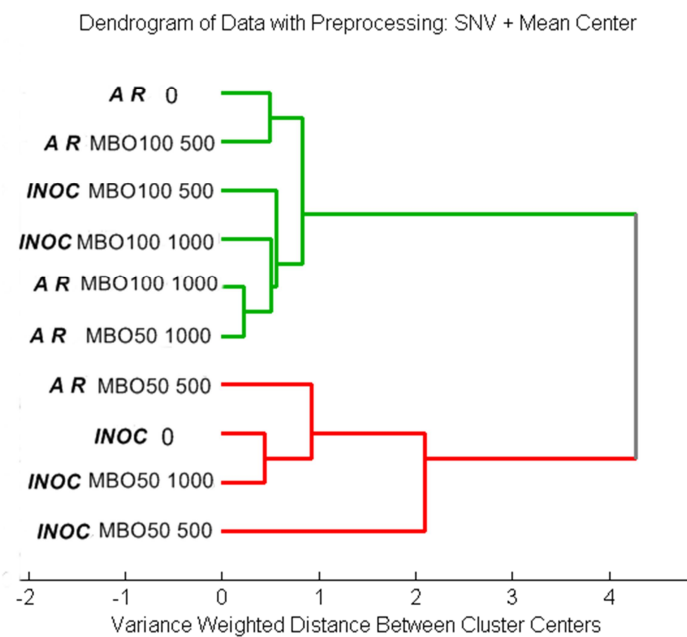


Figure 6. Dendrogram obtained by infrared analysis. AR: *fuel as received*; INOC: *inoculated fuel*. MBO50: **MBO 50%**. MBO100: **MBO100%** 0, 500 and 1000 ppm as supplied and active ingredient, respectively.

5.4. Discussion

Illumina rapid throughput DNA sequencing detected a diverse microbial community in the fuel microcosms; the classifiable sequences were from 112 genera (relative abundance of sequences $\geq 0,01\%$). The control as-received fuel in the microcosm showed that the native population, containing genera not previously reported as diesel and biodiesel storage contaminants, was able to form a biofilm at the oil/water interface. 80 genera at 28 days and 70 at 60 days of incubation were identified in this microcosm, corroborating the conclusions of Lee et al. (2010) on the underestimation of microbial diversity in fuels when only culture and DGGE are used in the evaluation. They examined the nature and degree of microbial contamination and its potential for corrosion, using biodiesel (B100), ultra-low sulfur diesel (ULSD), a mixture of both (B5 and B100), and high sulfur diesel. Inoculated and uninoculated diesels were studied and the aqueous phase used for DNA extraction and PCR-DGGE analysis. They identified 6 genera: *Bradyrhizobium*, *Chelatococcus*, *Sphingomonas*, *Melhylobacterium*, *Bacillus*, and *Thermomonas*. The underestimation of diversity was also reported by Sørensen et

al. (2011) utilizing DGGE. These authors analyzed changes in community structure in the aqueous phase from contaminated fuels (B5, B10, B20, B50 and B100), using an inoculum from bottom water of a diesel storage tank. They showed that the community profile at the end of 41 days was different from the initial one, and varied according to the proportion of diesel to biodiesel. The genera detected were *Aerosphaera*, *Clostridium*, *Novosphingobium*, *Sphingobium* and *Brevundimonas*.

White et al. (2011) systematically investigated the bacterial community diversity in contaminated fuels, diesel from a storage tank, marine diesel from a ship and stored rail grinder fuel, using pyrosequencing of the 16S rRNA gene. Proteobacteria and Firmicutes formed the largest proportion of reads in the 51,499 V6 16S rRNA gene amplicons pyrosequenced. The most abundant genera were *Marinobacter* (in stored diesel), *Achromobacter* (ship fuel tank) and *Burkholderia* (rail grinder fuel tank). In our as-received fuel the main organisms identified were *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Dysgonomonas*, *Hylemonella*, *Klebsiella* and *Tolomonas*. Archea (Euryarchaeota and Crenarchaeota) were also detected, confirming the information contained in the review of microbial contamination of fuels published recently by Passman (2013).

White et al. (2011) performed pyrosequencing analysis and observed the presence of microorganisms not related with fuel contamination. The authors related the presence of the phyla Tenericutes, Lentisphaerae and Spirochaetes. In the present study, we also found the presence of microorganisms that are not associated with biodegradation of fuels during storage, including the genera *Leptolyngbya*, *Prochlorococcus*, and *Spirochaete* and *Treponema*.

A high proportion of bacteria detected in our study was the genus *Comamonas* (*Betaproteobacteria*), which has not previously been isolated from diesel or biodiesel. Cyplik et al. (2011) have stated that representatives of the *Comamonadaceae* family preferred aerobic conditions in diesel fuel, biodiesel and blend B20; in anaerobic conditions this group was outgrown. The genus has an important role in the catabolism of xenobiotics in contaminated areas, but, in spite of being able to utilize amino acids, peptone and organic acids, rarely uses carbohydrates as carbon source (Ma et al., 2009). The predominance of this genus in our fuels could be linked to their capacity to use aromatics and short chain fatty acids as a carbon source (Ma et al., 2009; Das and

Chandran, 2011), and corroborates studies showing that *Comamonas* can adapt very well, both ecologically and physiologically, to the environment (Ni et al., 2013; Folarin et al., 2013).

Both aerobic and anaerobic microorganisms comprise the microbial community in the interfacial biofilm, which could be involved in fuel degradation. Most anaerobic microorganisms were observed in microcosms after 60 days, indicating the development of anaerobic niches in the biofilm.

Our studies differed from the real situation in that the Bushnell-Haas medium used as the aqueous phase contains all the minerals required for the growth of the microorganisms, not necessarily found in the tank bottom water. Oxygen availability and temperature will also have affected the results. Storage tanks normally contain anoxic niches where anaerobes, such as the corrosion-causing sulfate-reducers, can grow, and the constant temperature of our experiments will have influenced the final population, favoring mesophiles. Hence the microbial richness and diversity demonstrated in our flasks does not necessarily reflect the real situation, but it does indicate the extremely wide range of microorganisms that exist and can grow in stored diesel/biodiesel fuels.

The biocide used in this investigation, 3,3'-methylene bis(5-methyloxazolidine) (MBO), an oil-soluble compound with a K_p value of 0.5 : 80, acted differently on the aqueous and oil phase populations, probably because of its differential solubility in these phases (Raikos et al., 2012). It was evaluated different concentrations of MBO (500 and 1000 ppm) presented as supplied (a.s.) or active ingredient (a.i). The most important indicator of biocide efficacy in these systems, according to Passman et al. (2011), is its ability to prevent the formation of a biofilm at the oil/water interface. This is the microbial community that will adhere to the tank walls and initiate corrosion and biodeterioration processes within the fuel (Bento et al., 2005; Aktas et al., 2010; Lee et al., 2010; Passman, 2013). Any treatment that does not prevent biofilm formation will not have an appropriate cost benefit.

Other parameters must be considered when testing and applying a biocide, among them fuel grade, fuel:water ratio, aqueous phase chemistry, challenge population (inoculum), test environment, measured parameters, pH (Passman, 2013). Differential oil/water solubility is, however, one of the most important. According to the literature (Siegert et

al., 2009; Passman, 2013), fuel soluble biocides with high partition coefficients (K_p), are the most suitable for use in storage tanks; they will distribute well in the two tank phases.

Siegert (2009) determined the effect of MBO (Grotamar 71) on pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Y. albicans*, *Rhodotorula* sp., *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, and *Fusarium* sp. inoculated into diesel oil plus 0.1% aqueous phase. 200 ppm MBO caused a $6 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$ reduction in *C. albicans*, *Rhodotorula* sp., and *Fusarium* sp. after one hour and in *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Y. albicans* and *A. niger* after 2 h. Zimmer et al. (2013) used a multifunctional package equal to MBO50% and showed 400 ppm to be effective against low level contamination in fuel received from the distributor. However, no inhibitory effect was observed for medium and high microbial challenge levels in diesel/biodiesel blends (B7 and B10) at 400 ppm.

Many biocides have been tested against bacteria of the genus *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), which is consistently cited in the literature as one of the principal fuel biodeteriorating contaminants (Gaylarde et al., 1999; Van Hamme et al., 2003; Yemashova et al., 2007; Das and Chandran, 2011). It is a non-fastidious genus that can grow in a wide variety of media and is easily enumerated as CFU mL^{-1} to assess the level of fuel contamination (Passman, 2003). White et al. (2011) determined that *Pseudomonas* represented 21% of all isolates using traditional culture techniques, but only 1.1% of amplicons obtained by pyrosequencing of the 16S rRNA gene. In our study, the *Pseudomonas* genus composed 22% of the microbial community in the control (0 ppm) as-received fuel and 12% in inoculated fuel at 28 days (Table 3). It was also present in inoculated fuel at 19% and <1% in as-received fuel at 60 days. Hence, this genus is an important part of the normal fuel community, justifying its use in biocide tests.

Inoculated fuel became more degraded than uninoculated. This result was obviously influenced by the fact that the organisms used were obtained from contaminated fuel samples (sludge) and were, thus, already adapted to this environment (Paixão et al., 2003). In addition, our sludge inoculum had been grown in B10 and Bushnell-Haas for one week prior to use, assuring its replicating ability in this environment. The use of deteriorogenic species or an uncharacterized inoculum from a microbially contaminated fuel system for biocide testing has been recommended in ASTM E 1259 (ASTM, 2010).

It is notable that the addition of our adapted inoculum to the fuel did not greatly affect the final composition of the predominant population. Lee et al. (2010), cited previously, showed that the organisms in their inoculum disappeared from the community after 6 months (apart from a yeast) and that those present in the original fuel microbiota became the dominant species.

We showed that fuel degradation, as evaluated by HATR-FTIR, was related to interfacial biofilm formation, as was also observed by Zimmer et al. (2013). These authors used the same technique to demonstrate a 30% degradation of biodiesel B10 with microbial contamination of $8 \log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ after 60 days of incubation, even though treated with 400 ppm (a.s) MBO. In our studies, a minimum of 500 ppm (a.s.) MBO was required to prevent biomass formation and fuel degradation.

5.5. Conclusions

This study has revealed that microbial contamination in B10 microcosms can be effectively controlled with the use of pure MBO at 500 ppm (a.i). The prokaryotic community changed and was reduced significantly after 28 days with MBO 50%; however, at 60 days prokaryotic community diversity in samples treated with only 500 ppm (a. s.) MBO50% was restored. This confirms that MBO affects microbial community structure in the fuel, but that some microorganisms are resistant to the biocide.

Acknowledgements

Funding for this project was supplied by CNPq and CAPES. We also thank Ipiranga Produtos de Petróleo for providing the fuels and technical support. The authors are grateful to Eric Tripplet for performing ILLUMINA analysis at the University of Florida.

References

- Aktas, D.F., Lee, J.S., Little, B.J., Ray, R.I., Davidova, I. a., Lyles, C.N., Suflita, J.M., 2010. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. *Energy & Fuels* 24, 2924–2928. doi:10.1021/ef100084j

- Bento, F., Beech, I., Gaylarde, C., Englert, G., Muller, I., 2005. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 135–142 LA – English. doi:10.1007/s11274-004-3042-2
- Bento, F.M., Gaylarde, C.C., 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *Int. Biodeterior. & Biodegrad.* 47, 107–112.
- Bücker, F., Santestevan, N.A., Roesch, L.F., Seminotti Jacques, R.J., Peralba, M. do C.R., Camargo, F.A. de O., Bento, F.M., 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 65, 172–178. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.008
- Bushnell, L.D., Haas, H.F., 1941. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *J. Bacteriol.* 41, 653–673.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2010. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.1000080107
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, a S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–5. doi:10.1093/nar/gkn879
- Cyplik, P., Schmidt, M., Szulc, A., Marecik, R., Lisiecki, P., Heipieper, H.J., Owsianiak, M., Vainshtein, M., Chrzanowski, Ł., 2011. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 4347–4352.
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 941810. doi:10.4061/2011/941810
- Fagen, J.R., Giongo, A., Brown, C.T., Davis-Richardson, A.G., Gano, K. a, Triplett, E.W., 2012. Characterization of the Relative Abundance of the Citrus Pathogen *Ca. Liberibacter Asiaticus* in the Microbiome of Its Insect Vector, *Diaphorina citri*, using High Throughput 16S rRNA Sequencing. *Open Microbiol. J.* 6, 29–33. doi:10.2174/1874285801206010029
- Folarin, Y., An, D., Caffrey, S., Soh, J., Sensen, C.W., Voordouw, J., Jack, T., Voordouw, G., 2013. Contribution of make-up water to the microbial community in an oilfield from which oil is produced by produced water re-injection. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 81, 44–50. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.017
- Gaylarde, C.C., Bento, F.M., Kelley, J., 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev. Microbiol.* 30, 01–10. doi:10.1590/S0001-37141999000100001

- Giongo, A., Davis-Richardson, A.G., Crabb, D.B., Triplett, E.W., 2010. TaxCollector: Modifying Current 16S rRNA Databases for the Rapid Classification at Six Taxonomic Levels. *Diversity* 2, 1015–1025. doi:10.3390/d2071015
- Huang, X., Wang, J., Aluru, S., Yang, S., Hillier, L., 2003. PCAP: A Whole-Genome Assembly Program 2164–2170. doi:10.1101/gr.1390403.1
- Lee, J.S., Ray, R.I., Little, B.J., 2010. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling* 26, 623–635. doi:10.1080/08927014.2010.504984
- Ma, Y.-F., Zhang, Y., Zhang, J.-Y., Chen, D.-W., Zhu, Y., Zheng, H., Wang, S.-Y., Jiang, C.-Y., Zhao, G.-P., Liu, S.-J., 2009. The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6812–9. doi:10.1128/AEM.00933-09
- Ni, B., Zhang, Y., Chen, D.-W., Wang, B.-J., Liu, S.-J., 2013. Assimilation of aromatic compounds by *Comamonas testosteroni*: Characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6031–6041.
- Paixão, S.M., Santos, P., Tenreiro, R., Anselmo, A.M., 2003. Performance evaluation of mixed and pure microbial inocula as surrogate culture in a BOD5 test. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 539–544. doi:10.1023/A:1025110500903
- Passman, F.J., 2003. *Fuel_and_Fuel_System_Microbiology_Fundam.*
- Passman, F.J., 2013. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 81, 88–104. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.002
- Passman, F.J., Dobranic, J.K., 2005. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional sulfur diesel fuels, in: 9 Th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels. pp. 18–22.
- Raikos, V., Vamvakas, S.S., Sevastos, D., Kapolos, J., Karaiskakis, G., Koliadima, A., 2012. Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. *Fuel* 93, 559–566. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.028
- Siegert, W., Gmbh, M., Straße, R.K., n.d. Microbial Contamination in Diesel Fuel – Are new Problems Arising from Biodiesel Blends ?
- Silva, G.S., Marques, E.L.S., Dias, J.C.T., Lobo, I.P., Gross, E., Brendel, M., da Cruz, R.S., Rezende, R.P., 2012. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Appl. Soil Ecol.* 55, 27–35.

- Silva, T.R., Verde, L.C.L., Santos Neto, E.V., Oliveira, V.M., 2012. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.005
- Sørensen, G., Pedersen, D. V, Nørgaard, A.K., Sørensen, K.B., Nygaard, S.D., 2011. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresour. Technol.* 102, 5259–5264.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 503–549.
- Ward, O.P., Singh, A., Van Hamme, J.D., Voordouw, G., 2009. Petroleum Microbiology, in: Edition), E.-C.M.S.B.T.-E. of M. (Third (Ed.), . Academic Press, Oxford, pp. 443–456.
- White, J., Gilbert, J., Hill, G., Hill, E., Huse, S.M., Weightman, A.J., Mahenthalingam, 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. Microbiol.* 77, 4527–38. doi:10.1128/AEM.02317-10
- Yemashova, N., Murygina, V., Zhukov, D., Zakharyantz, A., Gladchenko, M., Appanna, V., Kalyuzhnyi, S., 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 6, 315–337. doi:10.1007/s11157-006-9118-8
- Zimmer, A., Cazarolli, J., Teixeira, R.M., Viscardi, S.L.C., Cavalcanti, E.S.H., Gerbase, A.E., Ferrão, M.F., Piatnicki, C.M.S., Bento, F.M., 2013. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *Fuel* 112, 153–162. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.062

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS

6.1 Crescimento Microbiano

A influência da adição do biodiesel ao diesel no crescimento microbiano foi avaliada no presente trabalho, com os microrganismos nativos do combustível, ou seja, na condição determinada como recebido da distribuidora; e, com os microrganismos não caracterizados, introduzidos no combustível, conforme sugerido na Norma ASTM E-1259, estabelecida para estudos com esta finalidade. Verificou-se, nos dois cenários de contaminação, combustível como recebido da distribuidora e contaminado com inóculo não caracterizado (Capítulos 1 e 2) que o maior crescimento microbiano na interface óleo água ocorreu nos tratamentos com biodiesel puro, ou seja, em B100, e, seguido por B50. Além disso, quando se compara o crescimento microbiano na interface óleo-água das misturas de diesel e biodiesel (B50, B5 e B10) ao crescimento em B0, verifica-se que nas misturas o crescimento foi maior, e estatisticamente significativo ($p < 0,05$), ao final dos experimentos. Em estudos anteriores (Owsianiak et al., 2009; Schleicher et al., 2009; Sørensen et al., 2011; Bückner et al., 2011), não se observou uma correlação linear em relação ao teor de biodiesel na mistura e o crescimento microbiano, no entanto,

verificou-se que o biodiesel, e sua adição ao diesel, favorece o crescimento de microrganismos na interface óleo-água.

No terceiro capítulo, que trata sobre experimento com biocida na mistura B10, ao avaliar o crescimento microbiano a partir da condição inicial de contaminação (a condição na presença apenas da população nativa do combustível como recebido da distribuidora); e, da condição com adição de inóculo não caracterizado (10^5 UFC.mL⁻¹) verificou-se que o inóculo adicionado não aumentou a desenvolvimento da biomassa na interface óleo água ao final do experimento. Mesmo com uma estimativa inicial de microrganismos maior na condição com inóculo, do que na condição como recebido, a biomassa formada foi inferior, ou relativamente igual, àquela observada na condição do combustível como recebido. Neste caso, observou-se que a adição do biocida MBO (presente no pacote multifuncional de aditivos) na concentração de 500 ppm (a.s), aos tratamentos conduzidos a partir do combustível como recebido da distribuidora, provocou uma aumento significativo na biomassa, tanto em relação ao controle, quanto a condição com inóculo. O que pode-se se inferir é que a população nativa do combustível apresentou características e mecanismos de resistência a este biocida, além disso os demais componentes do pacote multifuncional de aditivos podem ter contribuído como fonte de carbono e nutrientes para os microrganismos. O mesmo crescimento não foi observado no caso em se adicionou o inóculo, e 500 ppm (a.s) presente no pacote multifuncional de aditivos. Neste situação, provavelmente, possa ter ocorrido uma competição natural entre os microrganismos do inóculo e a

comunidade nativa do combustível de modo a selecionar aqueles sensíveis ao biocida.

6.2 Biodegradação de diesel e biodiesel

Estudos demonstram que a degradação dos constituintes do óleo diesel é realizada por diversos microrganismos da comunidade microbiana em diversos ambientes (solo, água) contaminados por óleo diesel, em que se observa que alguns microrganismos degradam determinadas frações do diesel, enquanto outros são especializados na degradação de outras frações. A degradação está diretamente relacionada à expressão de genes relacionados às enzimas que degradam frações mais lábeis como os alcanos, por uma grande parte da microbiota; ou a frações mais recalcitrantes, como os anéis benzênicos fundidos. Fazem parte deste grupo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que podem ser degradados por populações microbianas, mais especializadas, quando comparada àquela que utiliza os alcanos como fonte de carbono e energia. A adição do biodiesel ao diesel de petróleo tem gerado questionamentos relacionados a um aumento, ou não, da biodegradação do diesel em função da adição biodiesel, pela comunidade microbiana.

O presente estudo mostrou que as maiores porcentagens de biodegradação do biodiesel foram verificadas na mistura de diesel e biodiesel B5 (Capítulos 1 e 2). Além disso, verificou-se que a medida que aumentou o teor de biodiesel na mistura, diminuiu o percentual de degradação da maioria dos ésteres de ácidos graxos analisados. O tratamento B100, apresentou, em

ambos os estudos, valores intermediários (quando comparado a B5, B10 e B50) de degradação dos ésteres de ácidos graxos.

No Capítulo 2, avaliou-se a biodegradação dos n-alcanos e verificado que as porcentagens de degradação dos foram maiores em B50 e B10 > B5 e B0. Além disso, verificou-se que 10 (de 11) n-alcanos com as menores taxas de degradação estavam em B5 e/ou B0; e, as porcentagens de biodegradação de 9 (de 11) n-alcanos apresentaram as maiores porcentagens de biodegradação em B10 e/ou B50.

Os processos envolvidos na biodegradação das misturas diesel e biodiesel ainda não foram completamente caracterizados. Estudos sugerem que possam ocorrer transformações co-metabólicas, em que a degradação do composto é parcial, por ação de uma ou mais enzimas de uma rota catabólica, sem que o produto resultante contribua para o crescimento do microrganismo. Zhang et al. (1998) e Pasqualino et al. (2006) sugerem que na presença do biodiesel, em mistura com o diesel, há uma transformação co-metabólica dos hidrocarbonetos, aumentando a biodegradação da mistura, devido a competência enzimática dos microrganismos selecionados pela adição do biodiesel ao diesel. Zhang et al. (1998), observaram o cometabolismo na biodegradação de misturas de diesel e biodiesel. Foi verificado que na presença de ésteres de ácidos graxos, a taxa de degradação do diesel aumentou três vezes, quando comparada a tratamentos em que o diesel era a única fonte de carbono. Pasqualino et al. (2006), sugeriram um efeito positivo na biodegradação das misturas, ou seja, o biodiesel, ao ser adicionado no diesel, aumentou a biodegradabilidade do diesel, através do cometabolismo.

Owsianiak et al. (2009) e Mariano et al. (2008) não observaram o co-metabolismo na degradação das misturas de diesel e biodiesel, em experimento com a adição de microrganismos isolados de locais com histórico de contaminação. Um aumento de 26% foi verificado na eficiência de biodegradação quando a fonte de carbono foi alterada, de diesel puro para biodiesel puro, por Owsianiak et al. (2009).

DeMello et al., (2007) e Prince et al. (2008) verificaram que a velocidade de biodegradação dos éteres de ácidos graxos, nas misturas diesel/biodiesel, utilizando microrganismos não aclimatados, e microrganismo de água do mar, respectivamente, foi similar a velocidade de degradação dos alcanos. DeMello et al. (2007), compararam a velocidade de degradação entre 100% de diesel fóssil e B25 (25% de biodiesel misturado ao diesel), em um ambiente marinho, e verificaram que a degradação dos ésteres de ácidos graxos e dos n-alcanos ocorre simultaneamente, e mais rapidamente do que outros componentes do diesel. Prince et al. (2008), em estudo sobre a biodegradação aeróbia da mistura binária B20, verificaram que metil-ésteres de ácidos graxos foram degradados a uma velocidade semelhante dos n-alcanos presentes no óleo diesel, novamente verificando uma relação entre a degradação dos ácidos graxos e a dos hidrocarbonetos.

A degradação dos hidrocarbonetos do diesel, e dos ácidos graxos do biodiesel, em uma mistura pode ocorrer se a comunidade microbiana expressar diferentes competências fisiológicas (presença de determinados genes e expressão). Em resposta a adição do biodiesel na mistura as comunidades microbianas pode apresentar mudanças, em sua composição e

estrutura da comunidade microbiana que irá constituir o biofilme na interface óleo-água. (Sørensen et al., 2011) conduziram experimentos com adição da água proveniente de um tanque de armazenamento como inóculo, a B0, e a misturas de diesel e biodiesel (B5, B10, B20, B50) e B100, e analisaram as mudanças na estrutura da comunidade microbiana presente na fase aquosa por PCR-DGGE. Após 41 dias de avaliação, verificaram um perfil populacional similar entre B0 e B5, e estes perfis eram distintos dos perfis em B10, B20, B50 e B100, indicando que a população presente em baixas concentrações de biodiesel é diferente da população em altas concentrações. Os autores verificaram que o perfil da comunidade, ao final do experimento, era distinto da comunidade inicial, indicando uma organização da população em função da mistura com maior ou menor concentração de biodiesel.

Considerando a composição do diesel e do biodiesel, verifica-se que a adição progressiva do biodiesel (aumento da concentração do biodiesel no diesel) implica diretamente na diminuição da fração mais recalcitrante do diesel (hidrocarbonetos com anéis aromáticos, como o benzeno), e com isso populações como bactérias degradadoras destes grupos químicos podem ser suprimidas, constituindo mais uma mudança na composição da comunidade em função da adição do biodiesel (Cyplik et al., 2011).

6.3 Caracterização da comunidade microbiana

Os dados sobre a composição das comunidades microbianas constituinte das biomassas formada na interface óleo água no experimentos conduzidos com biodiesel puro (B100), B50, B10 e B5, a partir do combustível

como recebido da distribuidora foram avaliadas por sequenciamento de alto rendimento utilizando-se a Plataforma Illumina.

Os resultados do sequenciamento pela Plataforma Illumina MiSeq mostraram a predominância de *Actinobateria*, *Firmicutes*, e *Proteobacteria*, em nível de Filo; e, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Bacilli*, em nível de Classe, após 40 dias de incubação. Embora os perfis taxonômicos tenham sido similares, os tratamentos B5, B10, B50 e B100 apresentam diferenças em relação à abundância relativa dos grupos taxonômicos que compõem a comunidade bacteriana.

No estudo conduzido somente com a mistura B10, caracterizou-se a comunidade microbiana em condições com e sem a adição da molécula biocida MBO pelo sequenciamento na Plataforma Illumina HI-Seq. Verificou-se que nos tratamentos sem a adição da molécula biocida, ou seja, os controles, tanto para condição combustível como recebido, quanto na condição com adição de inóculo, o Filo *Proteobacteria* foi predominante, seguido por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*.

Nos dois estudos (Capítulos 1 e 3) verifica-se que os Filos predominantes, exceto por *Bacteroidetes*, são os mesmos, apresentando diferenças em relação à abundância relativa dos grupos taxonômicos que compõem a comunidade bacteriana. Observa-se uma inversão na abundância no grupo predominante classificado entre os estudos no experimento com B100, B50, B10 e B5 (Capítulo 1) em que *Actinobacteria* é o grupo predominante, enquanto que no estudo somente com B10 (Capítulo 3) *Actinobacteria* é o menos abundante. O Filo *Proteobacteria* apresenta a maior

abundância relativa no estudo com B10 somente, e menor abundância relativa no estudo com B100, B50, B10 e B5, entre os filos classificados.

No Capítulo 1, a abundância total de fungos, total de bactérias e de bactérias degradadoras de alcanos no biofilme formado na interface óleo-água dos tratamentos com B0, B5, B10, B50 e B100, aos 10, 20, 30 e 60 dias foi estimada baseada na quantificação dos genes *18S rRNA* (Fungi), *16S rRNA* (Bacteria) e alcano mono-oxigenase utilizando metodologia de qPCR. As estimativas da abundância de microrganismos mostram que o biofilme formado na interface óleo água é composto por cerca de 70% de micélio fúngico e 30% por bactérias, em todos os tratamentos e tempos avaliados

Em B0, B5 e B10 o percentual bactérias com gene *alk B* foi em torno de 70 - 80 %, em relação ao total de bactérias estimadas pela análise do gene *16S rRNA*. Em B50, houve uma variação nestes percentuais, sendo que foram de 80, 50, 60, e 30%, aos 10, 20, 30 e 60 dias de avaliação. Em B100, a estimativa de bactérias com gene *alk B* em relação ao total de bactérias, foi em torno de 25% do total.

No estudo conduzido com a mistura B10 (Capítulo 3), a qualidade da sequências e a qualidade da análise permitiram a classificação a nível de gênero, com dados satisfatórios. Assim, obtiveram-se os seguintes resultados: na condição *combustível como recebido*, aos 28 dias, apresentou a predominância de alguns gêneros classificados como *Pseudomonas* (22,2%), *Comamonas* (10,4%), *Burkholderia* (3,1%), *Dysgonomonas* (2,8%), *Hylemonella* (2,3%), aos 20 dias; aos 60 dias, apresentou a seguinte distribuição taxonômica dos gêneros classificados predominantes: *Comamonas*

(13,7%), *Klebsiella* (4,5%), *Tolumonas* (3,4%). No tratamento Controle com adição de inóculo, a distribuição taxonômica dos gêneros classificados predominantes aos 28 dias foi: *Pseudomonas* (12,2%), *Comamonas* (10,7%), *Burkholderia* (7,1%), *Dysgonomonas* (4,6%), *Hylemonella* (2,0%). A análise deste tratamento, após 60 dias, mostrou que a distribuição taxonômica dos gêneros classificados predominantes foi similar a distribuição aos 28 dias, apresentando: *Pseudomonas* (19,2%), *Comamonas* (9,9%), *Burkholderia* (3,6%).

As técnicas de sequenciamento de alto rendimento vem sido utilizadas em estudos sobre composição e mudanças na estrutura na análise de comunidades microbianas devido ao seu aprofundamento no nível de sequenciamento (Caporaso et al., 2010). O sequenciamento através da Plataforma Illumina apresenta bom custo benefício e, é um método de alta cobertura para caracterização de comunidades microbianas (Claesson et al., 2010; Zhou et al., 2010; Caporaso et al., 2012; Nelson et al., 2014). O curto comprimento das sequências obtidas (geralmente entre 36 e 76 pb) pelo sequenciamento na Plataforma Illumina, pode ser uma fator limitante a aplicação da técnica, pois a identificação dos fragmentos não chega a ser realizada a nível de gênero, em alguns estudos (Claesson et al., 2010). Mas, os recentes avanços e a otimização da técnica aumentaram o número de pares de bases das sequências (100 pb), bem como a qualidade das sequências (Bokulich et al., 2013). São aspectos e melhorias que reforçam a precisão e garantem uma adequada da classificação pelo sequenciamento na Plataforma

Illumina, viabilizando a análise em ambientes com comunidades complexas (Bokulich et al., 2013; Chao et al., 2014; Nelson et al., 2014).

As Plataformas de sequenciamento utilizadas nos estudos deste trabalho foram Plataforma MiSeq e Plataformas HiSeq (Capítulos 1 e 3, respectivamente) diferem acentuadamente em escala. A Plataforma Hi-Seq produz 450 GB de dados por dia, em uma corrida de 10,8 dias, há produção de 1.6 bilhões de leituras de sequências com 100 pares de bases cada. A Plataforma Mi-Seq foi delineada para ser realizada em experimentos com duração de 1 dia, e gera 1,5GB de dados por dia, produzindo cerca de 5 milhões de leituras de sequências com 150 pares de bases. Se a intenção for identificar organismos raros em uma comunidade, uma diferença no número de pares de bases pode ser fundamental para uma análise correta de identificação. Estas metodologias ainda dependem da análise por bioinformatas treinados que saibam analisar de forma eficiente os dados gerados, além disso a qualidade das sequencias geradas podem influenciar a análise final.

Os dados sobre a composição da comunidade indicam que a adição do inóculo teve pouca influência sobre a composição final da comunidade microbiana. Esta constatação ocorre pela análise dos tratamentos avaliados, aos 28 dias, que apresentaram uma estrutura da comunidade com gêneros similares entre si, e em proporções similares. Além disso, a composição bacteriana inicial do inóculo era *Comamonas* (10,5%), *Burkholderia* (16,4%), *Dysgonomonas* (5,9%), *Hylemonella* (4,7%), *Klebsiella* (1,7%) (distribuição taxonômica dos principais gêneros classificados). Indicando que a população nativa do combustível influenciou a composição final da comunidade

microbiana, nas duas condições. Conclusão similar foi obtida por Lee et al. (2010), que conduziram experimentos para avaliar a natureza e o grau da contaminação microbiana e seu potencial de corrosão, utilizando biodiesel puro, diesel com teor ultra baixo de enxofre, e a mistura B5, e diesel convencional. As análises foram conduzidas com e sem a adição de um inóculo ao combustível, este constituído de lodo biológico proveniente de tanque de diesel. Os autores utilizaram a fase aquosa para extração de DNA, e posterior análise por PCR-DGGE. Após seis meses de análise, verificaram que os microrganismos do inóculo não estavam presentes na comunidade, exceto uma levedura; e constataram que os microrganismos da microbiota original do combustível eram as espécies dominantes.

Uma grande fração dos microrganismos que compõem a comunidade microbiana dos biofilmes formados na interface óleo-água, nos estudos realizados, têm sido relatados na literatura como contaminantes de combustíveis, por tradicionais técnicas de cultivo, e também por técnicas utilizando sequenciamento por alto rendimento.

A abordagem molecular da diversidade microbiana em sistemas óleo-água foi avaliada por White et al. (2011), utilizando DGGE e Pirosequenciamento 454. Os autores utilizaram o sobrenadante resultante da centrifugação de amostras combinadas da fase óleo, da interface óleo-água, e da fase aquosa de amostras da mistura de diesel e biodiesel. Após a realização do sequenciamento do pirosequenciamento da região V6 do gene 16S rRNA, os autores verificaram que *Betaproteobacteria* (42.8%) and *Gammaproteobacteria* (30.6%) eram os grupos predominantes (ambos

Proteobacteria), e o gêneros mais abundantes foram *Marinobacter* (15.4%), *Achromobacter* (41.6%), *Burkholderia* (80.7%), e *Halomonas* (66.2%).

6.4 Controle do Crescimento Microbiano- Biocidas

Avaliou-se a efetividade do biocida MBO MBO (3,3'-methylene bis (5- methyloxazolidine) sobre o crescimento microbiano, utilizando-se o MBO na forma pura (100%) e como um aditivo na concentração de 50% (MBO 50%), nas concentrações de 1000, 500 e 0 ppm (Controle). A avaliação do efeito do MBO 100%, ou seja, do produto contendo apenas o princípio ativo e os excipientes de veículo, indicou que esta molécula foi biocida, nas duas concentrações testadas (500 e 1000 ppm). Verificou-se que não se formou biomassa na interface óleo-água, e não foi constatado crescimento (UFC) a partir de amostras da fase aquosa e oleosa, tanto para o combustível como recebido, como inoculado (ASTM E1259).

O uso do pacote multifuncional de aditivos contendo MBO (tratamento MBO 50%) na concentração de 500 ppm apresentou efeito biostático sobre a comunidade microbiana, da fase aquosa e oleosa, do combustível como recebido da distribuidora, apresentando uma contagem $\leq 2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, na primeira avaliação; pois, aos 14, 28, 42 e 60 dias a estimativa da comunidade foi superior ao tempo inicial, e apresentou valores em torno de $\leq 4 \log_{10}$ UFC mL⁻¹. Embora 500 ppm de MBO50%, na condição *como recebido*, tenha reduzido UFC mL⁻¹ da comunidade das fases aquosa e oleosa, o biocida não apresentou efeito inibitório sobre aqueles microrganismos

que constituem a biomassa na interface óleo água, pois esta apresentou peso seco 5,5 vezes superior a aquela formada no tratamento *Controle* (0 ppm).

A utilização de 500 ppm MBO50%, no combustível com adição de inóculo não caracterizado, reduziu a comunidade para $< 3 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, no primeiro dia de avaliação (nas fases aquosa e oleosa). Aos 14 e 28 dias, a comunidade (bactérias e fungos filamentosos) da fase aquosa apresentou em torno de $9 \log_{10}$ UFC mL⁻¹. A população bacteriana da fase oleosa apresentou $5 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, sendo estes valores similares ou superiores a aqueles do *Controle* (0 ppm). Aos 60 dias, estas populações apresentaram cerca de $5 \log_{10}$ CFU mL⁻¹. A população fúngica da fase oleosa apresentou valores inferiores ao controle entre 14 e 42 dias; e, não se verificou crescimento em placas aos 60 dias. A estimativa de UFC das comunidades mostraram que o uso de 500 ppm MBO50% não apresentou efeito biocida sobre a comunidade da fase aquosa e oleosa, do tratamento do combustível com adição de inóculo não caracterizado, porém os valores do peso seco da biomassa (interface óleo água) foram inferiores ao tratamento *Controle* (0ppm). Os resultados apontaram que houve uma mudança na composição da comunidade microbiana, quando aplicado biocida, na concentração de 500 ppm (MBO 50%), e sua efetividade esteve relacionada a composição inicial da comunidade microbiana, uma vez que houve diferenças entre a população final do combustível como recebido e inoculado, bem como diferenças significativas entre os valores de biomassa formada.

O uso da concentração de 1000 ppm de MBO50% promoveu o controle da população microbiana na condição *combustível como recebido da*

distribuidora. As populações fúngicas e bacterianas nesta concentração apresentaram valores $\leq 2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, tanto na fase aquosa, quanto na fase oleosa, a partir do primeiro dia de avaliação; e, mantiveram-se até os 60 dias. Na condição com adição de inóculo não caracterizado ao combustível, a concentração de 1000 ppm MBO50%, apresentou efeitos diferentes sobre a fase aquosa e fase oleosa. Na fase aquosa a estimativa das populações bacterianas e fúngicas foi $2 \log_{10}$ UFC mL⁻¹ no primeiro dia de avaliação, indicando um controle sobre a comunidade; no entanto, ao final de 60 dias, as populações de bactérias e as fúngicas apresentaram valores de estimativa de $5 \log_{10}$ UFC mL⁻¹. Na fase oleosa, não houve crescimento em placa no primeiro dia, aos 14 dias observou-se que a comunidade apresentava $\leq 3 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, e aos 60 dias não verificou-se o crescimento de colônias nas placas. Estes resultados mostram que MBO 50% (1000 ppm), na condição de combustível com inóculo, apresentou um efeito inibitório sobre a comunidade microbiana; no entanto, esta se restabeleceu ao longo do tempo e formou uma biomassa na interface-óleo água.

Quando houve a adição do biocida (500 ou 1000 ppm MBO 50%) ao microcosmo, verificou-se que a contagem (UFC) dos microrganismos da fase aquosa era diferente da contagem da fase oleosa, o que pode estar relacionado ao coeficiente de partição óleo água do biocida (Raikos et al., 2012).

O monitoramento da contaminação microbiana durante o armazenamento do combustível, e o seu controle com uso de procedimentos adequados, são medidas que podem garantir, ao consumidor final, um produto

com qualidade e redução de custos. O impacto do biocida em evitar a formação de um biofilme na interface óleo água é o indicador da eficiência do tratamento (Passman et al., 2013). Dependendo da composição da comunidade microbiana do biofilme, podemos encontrar uma maior aderência às paredes do tanque e a propagação de processos de biocorrosão e biodeterioração do combustível, por exemplo (Bento et al., 2005; Aktas et al., 2010; Lee et al., 2010; Passman, 2013). De acordo com Passman (2013) um biocida que não tenha um grande espectro de ação, ou seja ser efetivo contra fungos e bactérias, não conseguirá preservar o combustível e tampouco apresentar custo benefício viável.

Para a aplicação de um biocida, como forma de controle da contaminação microbiana, estudos em microcosmos podem fornecer informações para sua aplicabilidade no campo (Passman, 2013). Os microcosmos simulam as condições durante o armazenamento em campo, como a presença de água, a interface óleo-agua, e a contaminação natural do combustível, ou com a adição de um inóculo não caracterizado. A partir de estudos em condições laboratoriais, pode-se inferir sobre a eficácia de um determinado biocida, em relação à concentração a ser aplicada para controlar o desenvolvimento de biofilmes em tanques de armazenamento em condições reais. Estes biofilmes constituem um dos maiores problemas resultantes da contaminação durante o armazenamento, e caso não seja realizada uma avaliação prévia da atuação do biocida sobre esta estrutura, seria como diminuir sua aplicabilidade em condições reais (Passman, 2013).

7. CONCLUSÕES

Os maiores valores de biomassa formada foram nos microcosmos cotendo B50 e B100.

Os resultados obtidos pela análise do sequenciamento de alto rendimento, com a Plataforma Illumina, mostram que estrutura e a composição da comunidade do combustível como recebido da distribuidora que constituiu s biofilmes na interface óleo-água em B5, B10, B50 e B100 foram os Filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*, que apresentaram abundâncias relativas diferentes entre os tratamentos. Neste caso, houve uma relação entre os tratamentos com maior biomassa formada e a maior diversidade da comunidade, em nível de Família.

Na presença do inóculo aclimatado ao combustível previamente esterilizado, não observou-se mudanças na comunidade microbiana (FUNGI e BACTERIA) pelo DGGE, entre B5, B10, B50 e B100. Neste caso, verificou0se uma relação de 70% de Fungos e 30% de Bactérias na composição do biofilme por qPCR.

Para quase todos os ésteres analisados, as maiores porcentagens de biodegradação de ésteres de ácidos graxos foram observadas em B5, seguidas por B10>B50. B100 apresentou valores de biodegradação intermediários quando comparado às misturas.

Para quase todos os n- alcanos analisados as maiores porcentagens de biodegradação foram observadas em B50 e B10, seguidas por B5 e B0.

A comunidade microbiana nos microcosmos contendo a mistura B10, apresentou, aos 28 dias *Pseudomonas*, *Comamonas* e *Burkholderia*, como gêneros prevalentes para a condição combustível como recebido da distribuidora e contaminado com inóculo. Aos 60 dias observou-se que a comunidade alterou-se na condição inicial combustível como recebido da distribuidora apresentando *Comamonas*, *Klebsiella* e *Tolomonas* como gêneros prevalentes.

O biocida MBO controlou o crescimento microbiano na interface óleo água, exceto na condição 500 ppm MBO 50%. O biocida nesta concentração favoreceu o crescimento microbiano e alterou a comunidade; em que observou-se que o biofilme apresentou a prevalência de *Firmicutes* aos 28 dias, e uma mudança na estrutura aos 60 dias, quando Proteobacteria foi predominante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS, D. F. et al. Anaerobic Metabolism of Biodiesel and Its Impact on Metal Corrosion. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 2924–2928, 20 maio 2010.

BENTO, F. et al. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 135–142 LA – English, 2005.

BOKULICH, N. A. et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 57–59, 2013.

BÜCKER, F. et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 172–178, jan. 2011.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 3 jun. 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CHAO, Y. et al. Hydrophobicity of diverse bacterial populations in activated sludge and biofilm revealed by microbial adhesion to hydrocarbons assay and high-throughput sequencing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, n. 0, p. 379–385, 1 fev. 2014.

CLAESSON, M. J. et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 22, p. e200–e200, 29 dez. 2010.

CYPLIK, P. et al. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4347–4352, 2011.

DEMELLO, J. A. et al. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 7, p. 894–904, jul. 2007.

LEE, J. S.; RAY, R. I.; LITTLE, B. J. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. **Biofouling**, v. 26, n. 6, p. 623–635, 12 jul. 2010.

MARIANO, A. P. et al. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1323–1328, 2008.

NELSON, M. C. et al. Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16s rRNA gene amplicon surveys. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

OWSIANIAK, M. et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1497–1500, fev. 2009.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 10, p. 874–879, out. 2006.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, n. 0, p. 88–104, jul. 2013.

PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1446–1451, abr. 2008.

RAIKOS, V. et al. Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, v. 93, n. 0, p. 559–566, mar. 2012.

SCHLEICHER, T. et al. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 724–730, 2009.

SØRENSEN, G. et al. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5259–5264, 2011.

WHITE, J. et al. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4527–38, jul. 2011.

ZHANG, X. et al. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 41, n. 5, p. 1423–1430, 1998.

ZHOU, X. et al. The next-generation sequencing technology application. **Protein & Cell**, v. 1, n. 6, p. 520–536 LA – English, 2010.