

Monitoramento Químico e Microbiano da Mistura Diesel/Biodiesel Durante Armazenamento Simulado



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
23**

**Monitoramento Químico e Microbiano
da Mistura Diesel/Biodiesel Durante
Armazenamento Simulado**

*Itânia Pinheiro Soares
Léia Cecília de Lima Fávoro
Betania Ferraz Quirino
Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa
Betulia de Moraes Souto
Paula Fernandes Franco
Patrícia Portela de Medeiros Brunale
Artur Fiuza Borges Arantes
Ana Carolina Bitencourt de Araújo
Bruno Rafael de Lima Moraes
Nelson Geraldo de Oliveira*

***Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2019***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroenergia

Presidente
Alexandre Alonso Alves

Secretária-Executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros
Adilson Kobayashi, André Leão, Dasciana Rodrigues, Emerson Leo Schultz, Felipe Carvalho, Thaís Salum, Wesley Leal

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Rejane Maria de Oliveira

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e tratamento das imagens
Maria Goreti Braga dos Santos

Foto da capa
Itânia Pinheiro Soares

1ª edição
Publicação digital (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroenergia

Monitoramento químico e microbiano da diesel/biodiesel durante armazenamento simulado / Itânia Pinheiro Soares ... [et al.]. – Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2019.

PDF (33 p.) – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177-0395 ; 23)

1. Degradação. 2. Microrganismos. 3. Estocagem. 4. Qualidade. 5. Combustível. I. Fávoro, Leila Cecília de Lima. II. Quirino, Betania Ferraz. III. Costa, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves. IV. Souto, Betulia de Moraes. V. Franco, Paula Fernandes. VI. Brunale, Patrícia Portela de Medeiros. VII. Arantes, Artur Fiuza Borges. VIII. Araújo, Ana Carolina Bitencourt de. IX. Moraes, Bruno Rafael de Lima. X. Oliveira, Nelson Geraldo de. XI. Série.

CDD (21. ed.) 662.669

© Embrapa, 2019

Sumário

Resumo5

Abstract7

Introdução.....8

Material e Métodos13

Resultados e Discussão18

Conclusões.....29

Referências29

Monitoramento Químico e Microbiano da Mistura Diesel/Biodiesel Durante Armazenamento Simulado

Itânia Pinheiro Soares¹

Léia Cecília de Lima Favaro²

Betania Ferraz Quirino³

Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa⁴

Betulia de Moraes Souto⁵

Paula Fernandes Franco⁶

Patrícia Portela de Medeiros Brunale⁷

Artur Fiuza Borges Arantes⁸

Ana Carolina Bitencourt de Araújo⁹

Bruno Rafael de Lima Moraes¹⁰

Nelson Geraldo de Oliveira¹¹

Resumo – Apesar da semelhança com o diesel, o biodiesel possui algumas particularidades que lhe conferem características diferenciadas, no que diz respeito à estabilidade. O biodiesel é oxigenado e possui insaturações nas cadeias carbônicas. É mais suscetível à oxidação e, por ser mais higroscópico que o diesel, também pode ser favorecido por um aumento na contaminação microbiana. Para monitoramento da mistura biodiesel/diesel, foi feita a coleta de uma amostra de diesel B (B7 S500; 7% v/v de biodiesel no diesel) em um posto da região Centro-Oeste, e de uma amostra de diesel A (S500)

¹ Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

² Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

³ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁴ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁵ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁶ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁷ Química, mestre em Tecnologias Química e Biológica, especialista em regulação da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, colaboradora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁸ Graduando em Ciências Farmacêuticas, colaborador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁹ Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, colaboradora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

¹⁰ Biólogo, técnico de laboratório da Universidade Federal do Maranhão, colaborador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

¹¹ Agrônomo, doutor em Agronomia, colaborador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

em uma distribuidora da região Centro-Oeste. As amostras foram armazenadas em tanques réplicas (tanque da distribuidora de combustível) e foram feitas análises não constantes da legislação em vigor, durante 90 dias, no tempo zero e a cada 30 dias. As análises químicas foram feitas por cromatografia gasosa, utilizando nonadecanoato de metila como padrão. A análise de variância, com probabilidade de 95%, indicou que com 60 dias de estocagem a amostra já apresentava degradação. Foi feito monitoramento microbiano no tempo zero e aos 60 dias de armazenamento. Foram identificadas as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* tanto no diesel A quanto no diesel B (com adição de biodiesel). No entanto, ambas as amostras apresentaram contagem de microrganismos com índices inferiores aos limites estabelecidos internacionalmente.

Termos para indexação: degradação, microrganismos, estocagem, qualidade, combustível.

Chemical and Microbial Monitoring of Diesel/Biodiesel Blend During Simulated Storage

Abstract – Despite the similarity with petroleum diesel, biodiesel has features that give this biofuel different characteristics regarding fuel stability. Biodiesel is an oxygenated biofuel and it has unsaturated carbon chains. It is more susceptible to oxidation, and because it is more hygroscopic than diesel, an increase in microbial contamination may also be favored. To study the storage of the biodiesel / diesel mixture, a sample of diesel B (B7 S500; 7% v / v biodiesel in diesel) was collected in a Center Western region station (Brazil), and a sample of diesel A (S500) was collected in a distributor tank. Both samples were stored in replicate tanks (fuel distributor tank where diesel is stored) and lab analyses that are not part of the current legislation were performed for ninety days, the first timepoint being zero and the following time points taken every thirty days. Chemical analysis was performed using gas chromatography using methyl nonadecanoate as standard. Analysis of variance, with a probability of 95%, indicated that at sixty days of storage the sample already presented degradation. Microbial monitoring was performed at time zero and at sixty days of storage. The bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* were identified in both diesel A and diesel B (diesel with added biodiesel), however, both samples presented microorganism counts below the internationally fixed limits.

Index terms: degradation, microorganisms, biodiesel, diesel, storage, monitoring.

Introdução

O biodiesel é um biocombustível que foi inserido na matriz energética nacional com a criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em dezembro de 2004. Em 2005, com a aprovação da Lei 11.097, foram determinados percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel fóssil (Brasil, 2005). Inicialmente, essa incorporação ocorreu em caráter autorizativo, no teor de 2% (v/v). A partir de 2008, a mistura tornou-se obrigatória em todo o território nacional. Com o amadurecimento do mercado, esse percentual tem sido ampliado sucessivamente, passando a 11% em setembro de 2019, com incremento de 1% nos anos seguintes, chegando a 15% em 2023.

Combustível biodegradável, derivado de fontes renováveis, formado por ésteres de cadeia longa (em média 18 átomos de carbono), o biodiesel pode ser obtido pela reação de transesterificação entre um óleo vegetal (como, por exemplo, de soja, canola, girassol e algodão) ou gordura animal (sebo bovino, suíno ou de aves) e um álcool, usualmente metanol ou etanol, na presença de catalisador.

O biodiesel possui características físico-químicas semelhantes ao diesel, que é constituído de aproximadamente: 42% de alcanos de cadeias longas, 32% de cicloalcanos, 25% de aromáticos e 1% de outros componentes. Apesar da semelhança química com o diesel, o perfil de ácidos graxos dos óleos e gorduras utilizados na fabricação do biodiesel favorece o desenvolvimento do principal processo de degradação química que o atinge: a oxidação. Conhecida como rancificação oxidativa, essa ação degenerativa decorrente do contato com o oxigênio do ar, via de regra, atua sobre o biodiesel rico em ácidos graxos insaturados, obtido de matérias-primas que dominam o mercado brasileiro (soja, algodão e outros). Essa característica associada à maior higroscopicidade do biodiesel em relação ao diesel tende a causar inúmeros problemas nos sistemas de armazenamento e de injeção nos veículos movidos a diesel, tanto de natureza química quanto microbiana (Cavalcanti, 2009).

Contaminação/degradação química

A degradação química do biodiesel e da mistura com diesel pode ocorrer por oxidação, fotoionização e processos térmicos e hidrolíticos. O processo de degradação química inicia-se principalmente pela oxidação dos carbonos das duplas ligações, formando peróxidos alílicos. Como estes são instáveis, posteriormente, ocorrem outras reações e rearranjos que contribuem para a formação de compostos de cadeias menores como aldeídos e ácidos; ainda podendo haver reações de polimerização (Knothe, 2007).

Dentre os contaminantes químicos do biodiesel encontram-se a água, que normalmente é incorporada ao longo da cadeia, seja no transporte ou durante abastecimento; os mono-, di- e triglicerídeos, o etanol e metanol, não eliminados no processo de purificação e os esteróides e triterpenos, presentes no óleo (Brewer, 2007; Lee et al., 2007; Selvidge et al., 2007; Pfaltzgraf et al., 2007). A água, além de contaminante, promove a sua degradação hidrolítica, trazendo inúmeras consequências, como mencionado anteriormente. A água dissolvida em contato com metais tende a promover a formação de sedimentos metálicos, bem como induz o aparecimento de água livre, seja sob a forma de microgotículas, ou aderida às paredes do tanque, ou mesmo sob a forma decantada, culminando com o acúmulo de água de lastro no fundo de tanques (Cavalcanti, 2009).

Contaminação/degradação microbiana

A contaminação microbiana de combustíveis líquidos é mais notada nos sistemas de armazenamento (Gaylarde et al., 1999). Historicamente, a contaminação microbiana durante o armazenamento é vista como um problema crônico do diesel (Yemashova et al., 2007; Passman, 2013). Com a introdução do biodiesel, foi constatada uma maior susceptibilidade das misturas diesel/biodiesel à contaminação microbiana, à biodegradação e à formação de biomassa durante o armazenamento (Schleicher et al., 2009; Bücker et al., 2011, 2014; Sørensen et al., 2011; Dodos; Zannikos, 2013; Passman, 2013; Soriano et al., 2015).

A ocorrência de microrganismos em combustíveis se deve a diversos fatores. As altas temperaturas que ocorrem durante o processo de produção dos combustíveis esterilizam o material produzido (Associação Brasileira de

Normas Técnicas, 2019). Mesmo assim, durante o armazenamento, ou dependendo das condições de transporte, pode ocorrer a entrada de água e, por conseguinte, contaminação microbiológica e uma possível biodeterioração (Bento, 2014). A água é essencial para a atividade microbiana, em função disso, a maioria das recomendações para evitar a presença ou para mitigar a atividade microbiana em combustíveis inclui o controle da água (Passman, 2013). A água pode vir adsorvida no combustível na usina, transporte, procedimentos de carga e descarga, ventilação indevida, vedação ineficiente e por condensação de gotículas presentes no ar (Soares et al., 2014).

Os microrganismos são provenientes do solo, ar, água e de outro combustível contaminado, podendo também aparecer nos tanques de armazenamento por má lavagem dos mesmos (Gaylarde et al., 1999). Também podem ser carregados nas partículas de pó e nas gotas de água geradas pela condensação, durante o resfriamento do sistema e durante a movimentação do produto na cadeia logística. Após chegarem aos tanques de combustível, os microrganismos podem ficar aderidos às superfícies, em suspensão no produto ou na interface combustível/água, onde ocorre o desenvolvimento mais abundante. Geralmente, a deterioração do sistema e/ou do combustível é devida à atividade de comunidades microbianas complexas (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2019).

Para o crescimento microbiano, são necessários nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre, a maioria deles presentes nos combustíveis. Cálcio, sódio, ferro, magnésio, manganês, cobre, cobalto e níquel são necessários em pequenas quantidades e podem entrar no sistema por partículas de poeira e outros processos, por inibidores de corrosão presentes e por sais inorgânicos contidos na água (Bücker et al., 2011).

A capacidade de metabolizar hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) do diesel é um fator determinante para o crescimento de microrganismos em sistemas de armazenamento e transporte (Yemashova et al., 2007). Alguns fungos e bactérias produzem biossurfactantes que criam condições favoráveis para o consumo de hidrocarbonetos, pois auxiliam a formação de microemulsões na fase aquosa, tornando-os mais disponíveis ao ataque microbiano (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2019). Os metabólitos secretados pelos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos podem servir como nutrientes para outros membros das comunidades microbianas

(Yemashova et al., 2007). Em função disso, podem ocorrer alterações de pH, potencial oxirredutor (ou redox), concentração de água e composição físico-química das fases oleosa e aquosa, no local onde a contaminação microbiana está instalada (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2019). No caso do biodiesel, sua biodegradabilidade deve-se à presença de ésteres de ácidos graxos, que são facilmente degradados por diferentes tipos de microrganismos (Schleicher et al., 2009).

Muitas espécies microbianas têm sido encontradas em combustíveis, embora nem todas sejam capazes de metabolizar hidrocarbonetos. Exemplos de bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e/ou energia estão entre os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* e *Vibrio* (Bastiaens et al., 2000; Boonchan et al., 2000; Das; Chandran, 2011; Brzeszcz; Kaszycki, 2018). Em sua revisão sobre os grupos de bactérias e arqueias capazes de metabolizar hidrocarbonetos (por via aeróbica ou anaeróbica), Prince et al. (2018) relataram pelo menos 320 gêneros diferentes de *Eubacteria* (com destaque para os filos *Actinobacteria*, *Bacterioidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*) e 12 gêneros distintos de *Archaea*. Os fungos comumente isolados de combustíveis e capazes de metabolizar hidrocarbonetos incluem *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Hormoconis*, *Lambertella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pseudallescheria*, *Pseudozyma* e *Rhodotorula* (Bento; Gaylarde, 1996, 2001; Gaylarde et al., 1999; Chaillan et al., 2004; Bento et al., 2005; Bückner et al., 2011; Boelter et al., 2018; Martin-Sanchez et al., 2018; Becarelli et al., 2019).

Como consequência de elevada contaminação microbiana, pode ocorrer o entupimento de filtros, presença de biossedimentos, corrosão influenciada por microrganismos, redução na estabilidade química ou aumento da corrosividade do combustível (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2019).

Monitoramento de contaminação microbiana em combustíveis

A contaminação microbiana de combustíveis pode ocasionar sérios problemas operacionais em sistemas de armazenamento. Bactérias, fungos e arqueias podem causar deterioração por meio de acúmulo de biomassa, de-

gradação de aditivos protetores e produção de coprodutos metabólicos corrosivos (Allsopp et al., 2004).

Os estudos sobre contaminação microbiana em combustíveis líquidos baseiam-se em técnicas de cultivo e identificação fenotípica (Guidelines..., 2007). Entre os métodos disponíveis para estudo da diversidade microbiana, além dos tradicionais, merecem destaque aqueles baseados no sequenciamento de genes codificadores de RNA ribossômico diretamente de amostras ambientais, ou seja, sem a necessidade de cultivo dos microrganismos. Tais abordagens foram desenvolvidas para complementar as abordagens tradicionais dependentes de cultivo, pois consistem na extração de DNA total de amostras ambientais, seguida pelo sequenciamento de genes que compõem o cluster de DNA ribossômico (rDNA). Assim, a utilização de técnicas de sequenciamento de próxima geração (*next-generation sequencing* - NGS) permite ampla cobertura da diversidade microbiana em determinada amostra. Estudos de diversidade microbiana que utilizam essas técnicas moleculares modernas podem fornecer maiores esclarecimentos sobre a eficiência das práticas utilizadas pela indústria. Adicionalmente, a correta identificação dos contaminantes, particularmente dos indicadores de deterioração (bactérias redutoras de sulfato, bactérias ferroxidantes e formadoras de biofilmes), pode facilitar intervenções e medidas de controle.

Nos últimos anos, um número crescente de estudos usando NGS foi realizado para avaliar a diversidade microbiana em amostras de diesel, biodiesel e outros combustíveis líquidos (White et al., 2011; Bucker et al., 2014; Azambuja et al., 2017; Fonseca et al., 2019; Hu et al., 2019a). Por exemplo, White et al. (2011) avaliaram amostras de querosene, diesel e biodiesel em postos de abastecimento utilizando isolamento tradicional e técnicas independentes de cultivo, como DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) e pirosequenciamento de DNA ribossômico 16S. Os autores verificaram que bactérias abundantes em meio de cultura (*Pseudomonas* spp.) não foram observadas na mesma proporção por técnicas moleculares e que bactérias detectadas pelas técnicas moleculares (*Clostridia*, *Halomonas*, *Deltaproteobacteria*) não foram detectadas em meio de cultura, demonstrando a importância de combinar diferentes estratégias para melhor avaliação da composição das comunidades microbianas em amostras de combustíveis líquidos.

Por ser uma estratégia comumente acessível aos laboratórios de microbiologia, a utilização de técnicas baseadas em cultivo é reconhecida como padrão para monitoramento de combustíveis (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2019), apesar de suas limitações. Ainda assim, quando acompanhada de identificação taxonômica por meio de análise do DNA, ela tem contribuído para o entendimento do impacto dos microrganismos na qualidade dos combustíveis líquidos (Restrepo-Flórez et al., 2013; Cazarolli et al., 2018; Hu et al., 2019b).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo realizar o monitoramento químico e microbiológico de uma amostra comercial de diesel B S500 (B7) coletada em posto de combustível da região Centro-Oeste e submetida ao armazenamento simulado. Análises periódicas das características químicas e da composição da comunidade bacteriana cultivável foram realizadas durante o armazenamento. Também são relatados os resultados do monitoramento microbiológico para uma amostra de diesel A S500 coletada em distribuidora da região Centro-Oeste e submetida às mesmas condições de armazenamento.

Material e Métodos

Amostras e condições de armazenamento simulado

O combustível analisado foi o diesel B7 S500 (7% de biodiesel misturado ao óleo diesel S500 - 500 ppm de enxofre; também denominado diesel B), o qual foi coletado do bico da bomba de abastecimento em um posto de combustível na região Centro-Oeste no ano de 2015 e acondicionado em bombonas esterilizadas. O combustível foi fracionado e armazenado em três tanques réplica de metal previamente esterilizados (capacidade para 20 L) para simulação de condições de armazenamento. Cada tanque recebeu 10 L do combustível. Para as análises químicas e microbiológicas, amostragens (em recipientes esterilizados) foram realizadas imediatamente após a coleta (tempo zero) e posteriormente aos 30, 60 e 90 dias de estocagem. Para comparação da comunidade microbiana com a amostra de diesel B7 S500, foi coletada em uma distribuidora da região Centro-Oeste uma amostra de diesel S500 (sem biodiesel, também denominado diesel A). Para as análises

microbiológicas, a amostra de diesel B7 S500 foi codificada como LGB 34 e a amostra de diesel A S500 foi codificada como LGB 25.

Monitoramento químico

Para o monitoramento químico, as amostras coletadas de B7 nos tempos zero, 30, 60 e 90 dias de estocagem simulada foram diluídas em vial de 1,5 mL, na proporção de 25 μL de amostra para 975 μL de heptano. Para análise no GC-FID, foi adicionado na amostra o padrão interno nonadecanoato de metila na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando os seguintes equipamentos: GC-MS QP 2010 (Shimadzu) e GC-FID 7890A (Agilent). Utilizou-se a coluna Rtx-5ms (30 m x 0,25 mm x 0.25 μm). As condições analíticas do GC-MS foram: temperatura do injetor e interface de 250 °C, temperatura da fonte de íons 200 °C, gás de arraste hélio com velocidade linear de 38 cm s⁻¹ e injetor no modo split (25:1). A temperatura da coluna permaneceu a 120 °C por 2 min isotermicamente e depois aumentou a 10°C/min até 300°C. Essa temperatura foi mantida por 5 min isotermicamente. Devido à complexidade da amostra (biodiesel + diesel), foram monitorados os compostos que apresentaram sinal mais intenso entre C15 e C28. Dessa forma, o método foi otimizado no GC-MS e, em seguida, foi adaptado para o GC-FID ajustando a temperatura do detector FID para 320 °C.

Análises microbiológicas

Isolamento de microrganismos e obtenção de culturas puras

Para o monitoramento microbiológico, foram seguidas as recomendações da ASTM D6974 – 09 (*Standard Practice for Enumeration of Viable Bacteria and Fungi in Liquid Fuels - Filtration and Culture Procedures*. American Society for Testing and Materials, 2012). O foco da análise foi o isolamento de bactérias. Cada amostra (de diesel B7 S500 e de diesel S500) coletada nos tempos zero, 30, 60 e 90 dias foi filtrada em condições assépticas. Para cada amostra, três volumes foram filtrados (2 mL, 20 mL e 200 mL), utilizando-se membrana esterilizada de éster de celulose de 0,22 μm e 47 mm de diâmetro (Millipore®) em sistema de filtração à vácuo (Nalgene®). Para tanto, a bomba

de vácuo foi acoplada ao sistema de filtração e as amostras foram colocadas na parte superior do sistema. Após a passagem de todo o combustível pela membrana, uma alíquota de 10 mL de TWEEN® 80 0,1% esterilizada foi adicionada e filtrada. Por fim, 30 mL de Solução de Ringer esterilizada (composição em g/L: NaCl 2,25; KCl 0,105; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,12; NaHCO_3 0,05) foram adicionados e filtrados.

Cada membrana foi coletada com pinça esterilizada e colocada sobre a superfície do meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma-Aldrich) previamente vertido em placas de Petri (90 mm x 15 mm). Este meio de cultura possui em sua composição triptona (15 g/L), soja enzimaticamente digerida (5 g/L), NaCl (5 g/L) e ágar bacteriológico (15 g/L). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 minutos). Ao meio de cultura resfriado até 50 °C foi adicionado o fungicida Benomyl (Sigma-Aldrich) (200 µg/mL) para evitar o crescimento de fungos; em seguida o meio de cultura foi distribuído nas placas.

Para cada amostra (tempo zero, 30, 60 e 90 dias), foram utilizadas três membranas para cada volume filtrado (2 mL, 20 mL e 200 mL), resultando em 9 membranas por amostra (dispostas sobre 9 placas de Petri contendo o meio de cultura seletivo). As placas com as membranas foram incubadas a 28 °C e diariamente monitoradas quanto ao crescimento bacteriano (por até 15 dias). Após a incubação, as colônias bacterianas foram coletadas da superfície das membranas e inoculadas em novo meio de cultura TSA pelo método de estria por esgotamento. As placas foram novamente incubadas a 28 °C até o crescimento de culturas puras. O número de bactérias isoladas representa o número total que se conseguiu cultivar no meio de cultura padrão após a filtragem e obtenção de culturas puras e não o total de bactérias presentes nas membranas filtrantes.

Preservação de microrganismos

Para a preservação, uma colônia isolada oriunda das placas de purificação da etapa anterior foi coletada e inoculada em tubos de 50 mL contendo 10 mL de meio TSB (Tryptic Soy Broth, Sigma-Aldrich). As bactérias foram incubadas por 16 horas (28 °C; 180 rpm). Em seguida, elas foram preservadas por ultracongelamento (-80 °C) em glicerol 30% em criotubos. As bactérias

foram depositadas na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias - CMMAABio” da Embrapa Agroenergia.

Cultivo e extração de ácidos nucleicos

As bactérias preservadas por ultracongelamento foram reativadas por meio de cultivo em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma-Aldrich). As placas inoculadas foram incubadas por 48-72 horas a 28 °C. Após a checagem do crescimento e pureza da cultura bacteriana, uma colônia isolada de cada linhagem foi coletada e transferida para tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth, Sigma-Aldrich). Os tubos foram incubados por 16-20 horas a temperatura de 28 °C sob agitação de 180 rpm. O conteúdo dos tubos foi centrifugado a 3.000 x g e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* formado foi ressuspenso e lavado com 500 µL da solução STE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 50 mM; EDTA 5 mM pH 8,0) e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. O DNA genômico foi extraído com auxílio do MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 1 µL de RNase [10 µg/µL] e incubadas em estufa por 1 hora a 37 °C. O DNA genômico foi mantido em freezer (-20 °C).

Amplificação de genes por PCR, purificação e sequenciamento

O DNA genômico das bactérias foi utilizado como molde para a amplificação da região 16S do DNA ribossômico por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A região 16S do DNA ribossômico foi amplificada com os primers P0(27f) (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') (Lane, 1999), os quais amplificam uma região de aproximadamente 1.500 pares de bases.

Cada reação foi preparada em volume final de 50 µL contendo: 20 ng de DNA genômico; 0,2 µM de cada primer; 0,2 mM de dNTP; 2,5 mM de MgCl₂; Tampão da Taq DNA polimerase 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100) (Taq pht, Phoneutria) e 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Taq pht, Phoneutria). A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) programado para desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (cada ciclo consistiu em 30

segundos a 94 °C, 1 minuto a 67 °C, 1 minuto a 72 °C) e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio e fotodocumentados sob luz UV. Em seguida, foram purificados utilizando o kit GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo-Scientific). Por fim, esses fragmentos de DNA foram sequenciados (método Sanger) pela empresa Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda. (Indaiatuba, SP), em um sequenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

Análise de DNA utilizando ferramentas de bioinformática

As sequências foram avaliadas com auxílio do software Geneious® 11.0.2 (Kearse et al., 2012) para checagem da qualidade e obtenção da sequência consenso. As sequências com qualidade suficiente para análise foram avaliadas com o auxílio da ferramenta BLAST contra bases de dados curadas de sequências de DNA de bactérias. Para isso, foi utilizada a ferramenta *Classifier* da base de dados *Ribosomal Database Project*, RDP (Wang et al., 2007; Cole et al., 2014), bem como a ferramenta BLASTn da base dados do *GenBank*¹², incluindo comparação com sequências de linhagens tipo (*type strains*). Além da análise contra essas duas bases de dados, também foi realizada a análise filogenética, que foi conduzida utilizando o software MEGA version 5.10 (Kumar et al., 2018). Para a análise filogenética, foi necessária a construção de *datasets* contendo as sequências obtidas neste trabalho e sequências oriundas de linhagens tipo (*type strains*) de espécies de bactérias filogeneticamente relacionadas. As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o método "General time reversible mode" com 1.000 Bootstrap e o modelo de árvore filogenética Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) (Tamura et al., 2011).

¹² Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

Resultados e Discussão

Monitoramento químico

Devido à complexidade das amostras (biodiesel+diesel), foram monitorados os compostos que apresentaram sinal mais intenso entre C15 e C28, nas análises cromatográficas. Dessa forma, o método foi otimizado no GC-MS e, em seguida, foi adaptado para o GC-FID, ajustando a temperatura do detector FID para 320 °C. A Figura 1 mostra os cromatogramas obtidos em ambos os equipamentos para a amostra de diesel B7 S500 do tempo zero.

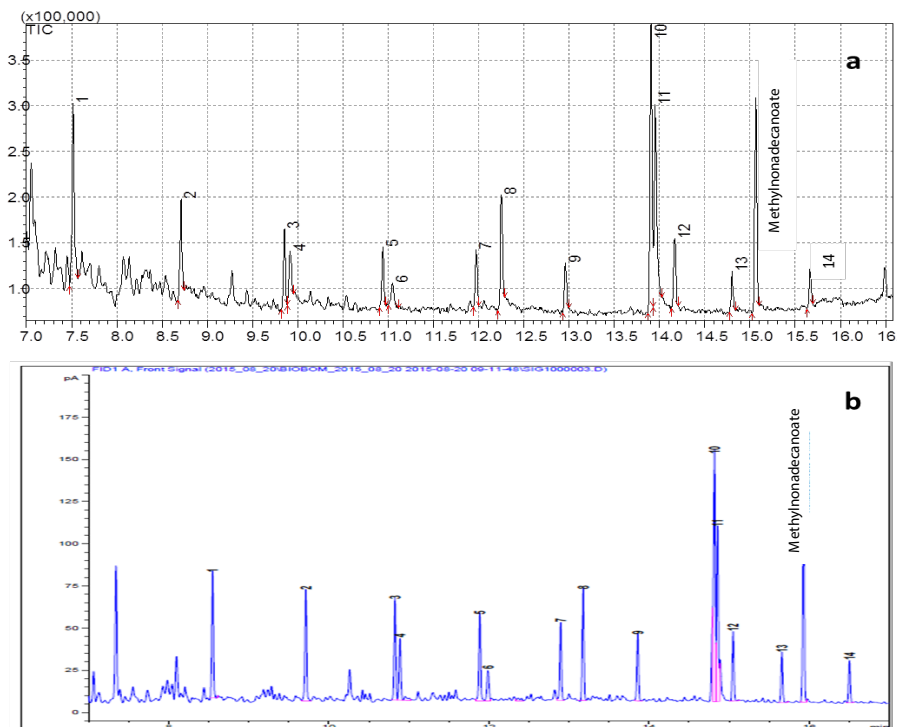


Figura 1. Cromatograma da amostra de diesel B7 S500 (tempo zero de estocagem) por cromatografia gasosa (GC): (a) cromatograma dos íons totais (TIC) e (b) cromatograma por detector de ionização por chama (FID). 1. Pentadecano, 2. Hexadecano, 3. Heptadecano, 4. 2,6,10,14-tetrametil pentadecano, 5. Octadecano, 6. 2,6,10,14-tetrametil hexadecano, 7. Nonadecano, 8. Metil hexadecanoato, 9. Eicosano, 10. 8,11-Metil octadecadienoato, 11. Metil octadecenoato, 12. Metil octadecanoato, 13. Docosano, 14. Octacosano.

A avaliação da degradação química foi feita pela determinação das áreas dos picos dos compostos relacionados, normalizadas pela área do padrão, preparado no dia da análise. A Figura 2 apresenta um gráfico comparativo das áreas dos 14 compostos, listados na Tabela 1, durante os 90 dias de estocagem.

Observa-se que as áreas dos compostos sofreram variação ao longo dos 90 dias de estocagem. Em vista do exposto, foi necessário realizar a análise de variância pelo teste de Tukey, com significância de 95%, utilizando o software Statistica®. Os dados com as médias das áreas dos picos cromatográficos são apresentados na Tabela 1.

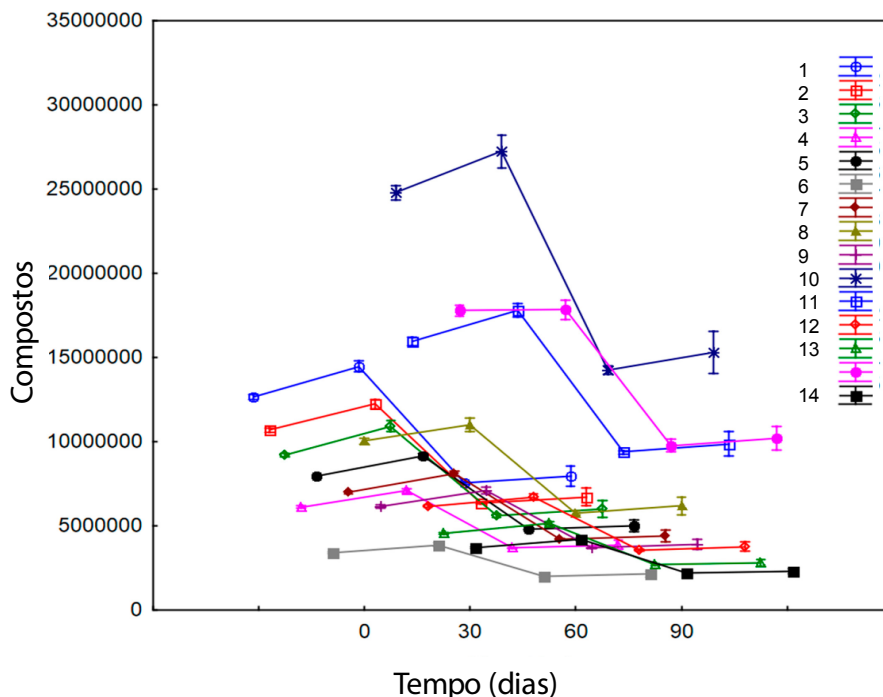


Figura 2. Áreas dos picos de CG-FID das substâncias de interesse detectadas após 90 dias de estocagem simulada de diesel B7 S500 em tanques réplica.

Tabela 1. Avaliação das médias das áreas dos picos cromatográficos dos compostos monitorados no diesel B7 S500 submetido a estocagem simulada (teste Tukey).

Composto		Tempo (dias)			
		0	30	60	90
1	Pentadecano $C_{15}H_{32}$	12663520 a	14471432 b	7546114 c	7974578 c
2	Hexadecano $C_{16}H_{34}$	10695257 a	12241825 b	6365499 c	6726539 c
3	Heptadecano $C_{17}H_{36}$	9200583 a	10924542 b	5601141 c	5999445 c
4	2,6,10,14-tetrametil pentadecano $C_{19}H_{40}$	6112790 a	7085996 b	3690543 c	3884314 c
5	Octadecano $C_{18}H_{38}$	7966647 a	9156119 b	4782764 c	5006990 c
6	2,6,10,14-tetrametil hexadecano $C_{20}H_{42}$	3418409 a	3871829 b	2013917 c	2134267 c
7	Nonadecano $C_{19}H_{40}$	6987680 a	8113263 b	25323961 c	26446363 c
8	Metil hexadecanoato $C_{17}H_{34}O_2$	10052508 a	11012416 a	5762324 b	6185032 b
9	Eicosano $C_{20}H_{42}$	6153743 a	7100113 b	3686077 c	3891672 c
10	8,11-Metil octadecadienoato $C_{19}H_{34}O_2$	24791547 a	27249059 a	14258834 b	15298384 b
11	Metil octadecenoato $C_{19}H_{36}O_2$	15961601 a	17807398 b	9381107 c	9879931 c
12	Metil octadecanoato $C_{19}H_{38}O_2$	6183529 a	6720658 a	3556000 b	3765467 b
13	Docosano $C_{22}H_{46}$	4570349 a	5137574 b	2715177 c	2814453 c
14	Metil nonadecanoato (standart) $C_{20}H_{40}O_2$	17798474 a	17837408 a	9771516 b	10226471 b
15	Octacosano $C_{28}H_{58}$	3701708 a	4195582 b	2215678 c	2297978 c

Observa-se na Tabela 1 que, para todos os compostos, houve um aumento de área com 30 dias de estocagem simulada do diesel B7 S500 comparado ao tempo zero. O fato pode ser explicado pela evaporação de compostos voláteis do diesel, fazendo com que os compostos monitorados fossem concentrados. A análise estatística revelou que o tempo de 30 dias é diferente do tempo zero e que os tempos 60 e 90 dias são estatisticamente iguais, porém diferentes de 30 dias, para a maioria dos compostos. Esses dados permitem concluir que em 60 dias de estocagem simulada em tanques réplica houve degradação química dos compostos monitorados.

Monitoramento microbiano

Nas amostras de diesel A S500 (de zero e de 60 dias de estocagem - LGB 25), foram isoladas 10 e 40 bactérias, respectivamente. Do diesel A S500 sem armazenamento (tempo zero), foi possível sequenciar e identificar 5 bactérias. Do diesel A S500 com 60 dias de estocagem, foram sequenciadas e identificadas 36 bactérias.

Nas amostras de diesel B S500 (B7) (de zero e de 60 dias de armazenamento - LGB 34), foram isoladas 25 e 4 bactérias, respectivamente. No tempo zero, conseguiu-se sequenciar e identificar 18 bactérias; com 60 dias de armazenamento, foram sequenciadas e identificadas 3 bactérias.

Foi possível identificar duas famílias de bactérias na amostra de diesel A S500 (LGB 25) do tempo zero, Paenibacillaceae e Bacillaceae, e dois gêneros, *Paenibacillus* e *Bacillus*, conforme mostrado na árvore filogenética na Figura 3.

Da amostra de diesel A S500 (LGB 25) com 60 dias de estocagem, foram identificados dois filos diferentes, Firmicutes e Actinobacteria, e dois gêneros, *Janibacter* e *Bacillus*. Não foram identificadas bactérias da família Paenibacillaceae após o armazenamento, conforme Figura 4.

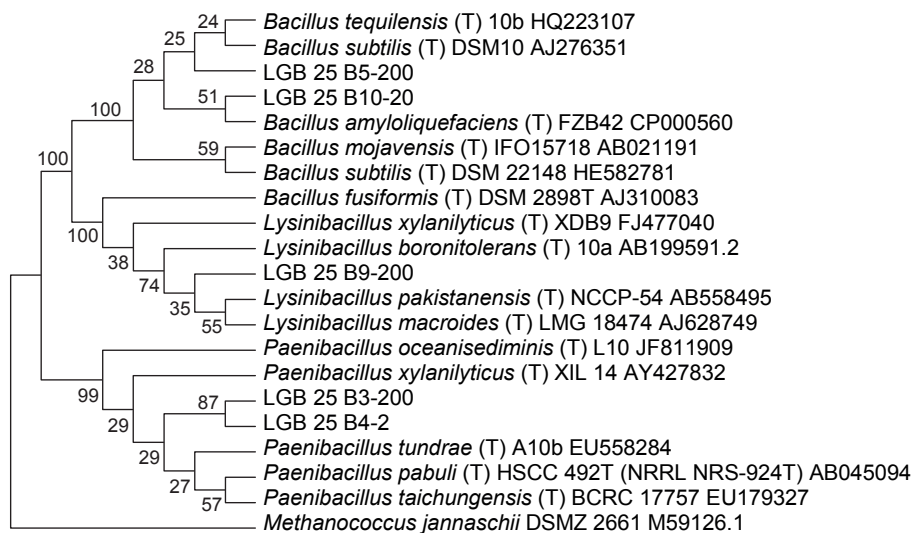


Figura 3. Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região 16S do DNA ribossômico (rDNA) das bactérias isoladas da amostra de diesel A S500 (LGB 25) do tempo zero e dados oriundos de linhagens tipo do banco de dados RDP. Como *outgroup* foi utilizada a sequência 16S do rDNA da arqueia *Methanococcus jannaschii*.

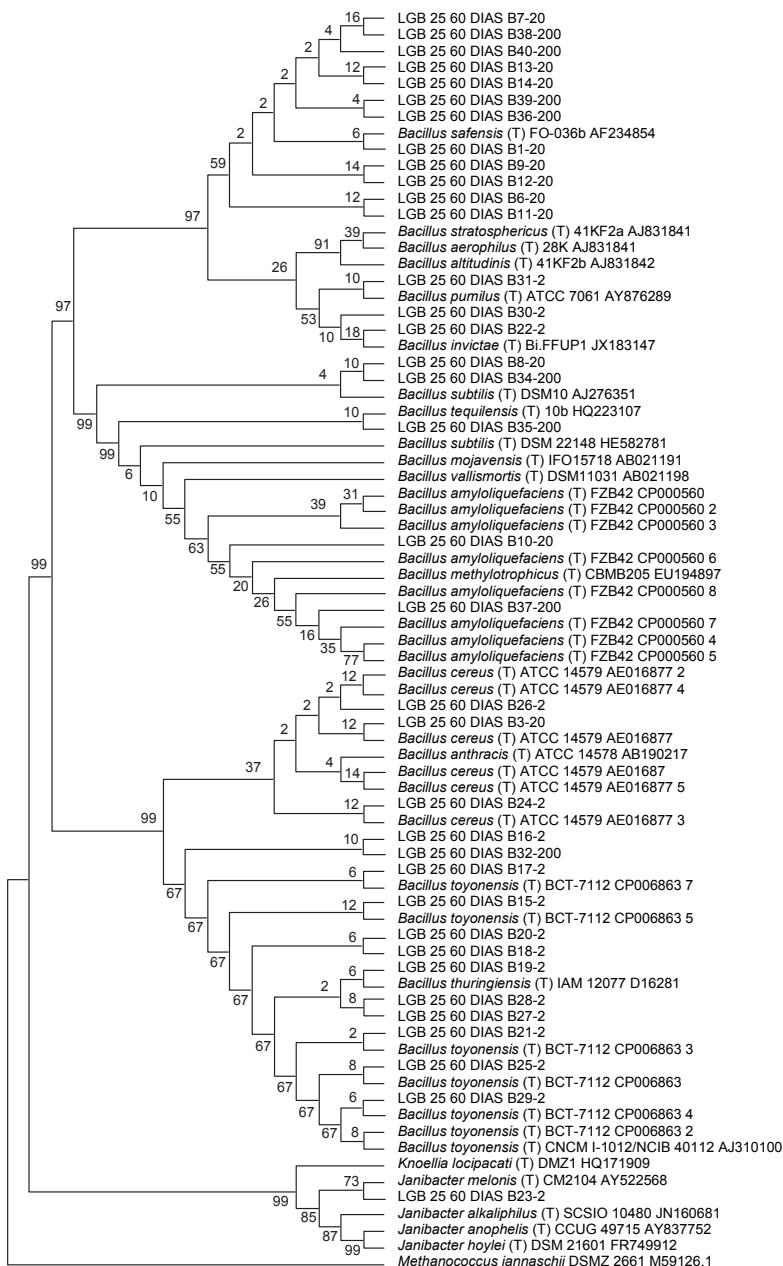


Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região 16S do DNA ribossômico (rDNA) das bactérias isoladas da amostra de diesel A S500, com 60 dias de armazenamento (LGB 25), e de dados do banco de dados RDP. Como *outgroup* foi utilizada a sequência 16S do rDNA da arqueia *Methanococcus jannaschii*.

A amostra de diesel B S500 (B7) (LGB 34) do tempo zero apresentou apenas a família Bacillaceae e o gênero *Bacillus*, conforme Figura 5 abaixo.

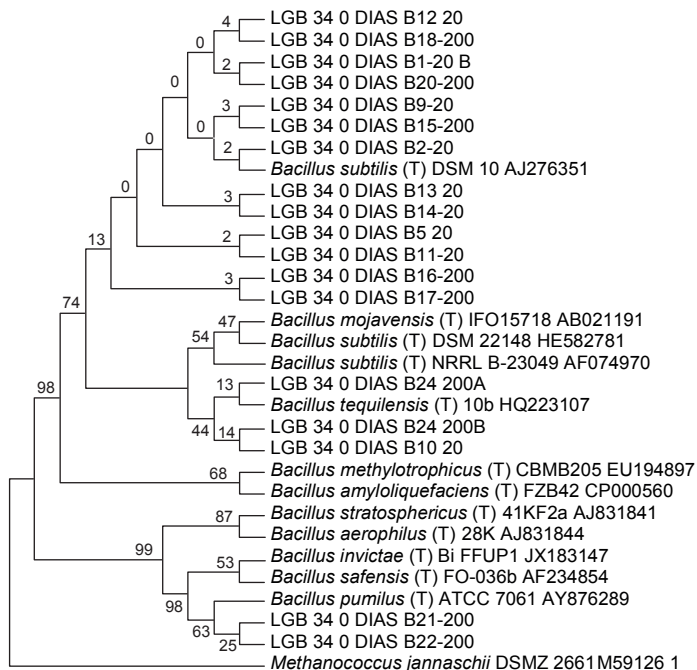


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região 16S do DNA ribossômico (rDNA) das bactérias isoladas da amostra de diesel B S500 (B7) (LGB 34) do tempo zero (sem armazenamento) e dados do banco de dados RDP. Como *out-group* foi utilizada a sequência 16S do rDNA da arqueia *Methanococcus jannaschii*.

Da amostra de diesel B S500 (B7) (LGB 34) armazenada por 60 dias, foi possível isolar apenas uma família Bacillaceae e um gênero *Bacillus*, conforme Figura 6.

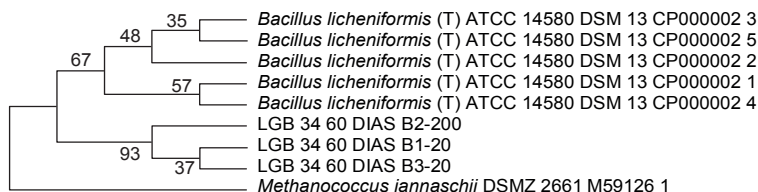
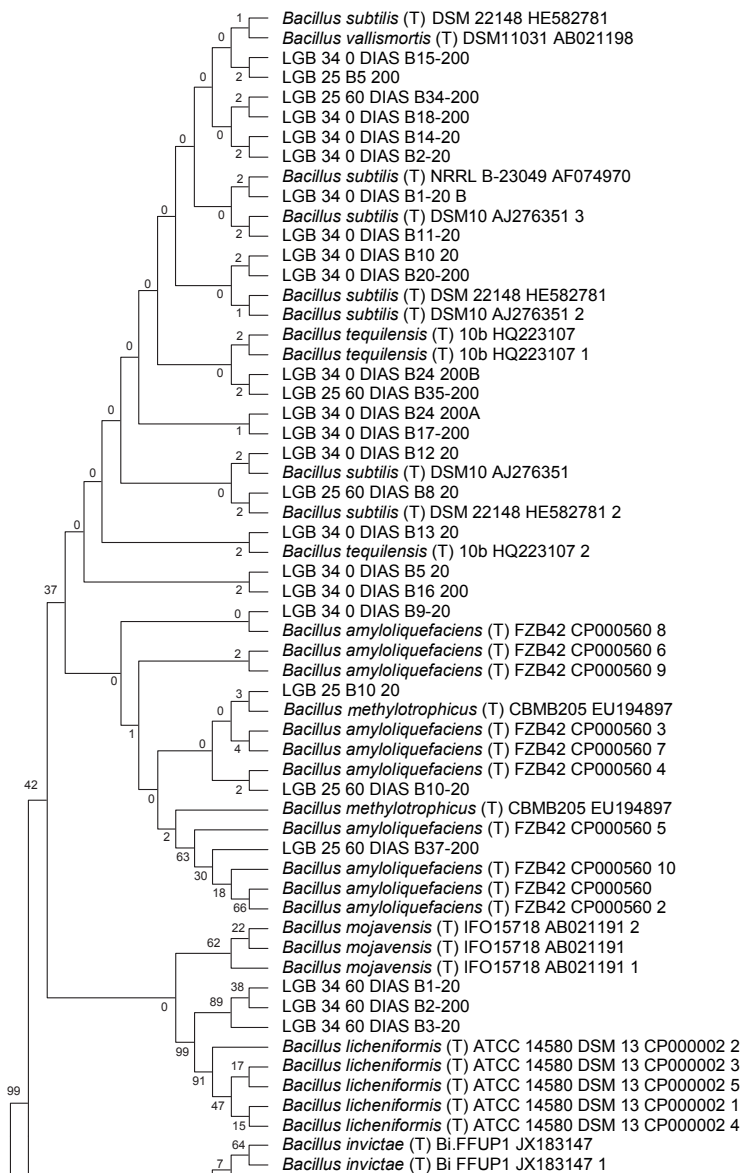


Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região 16S do DNA ribossômico (rDNA) das bactérias isoladas da amostra de diesel B S500 (B7) (LGB 34) com 60 dias de armazenamento e dados do banco de dados RDP. Como *outgroup* foi utilizada a sequência 16S do rDNA da arqueia *Methanococcus jannaschii*.

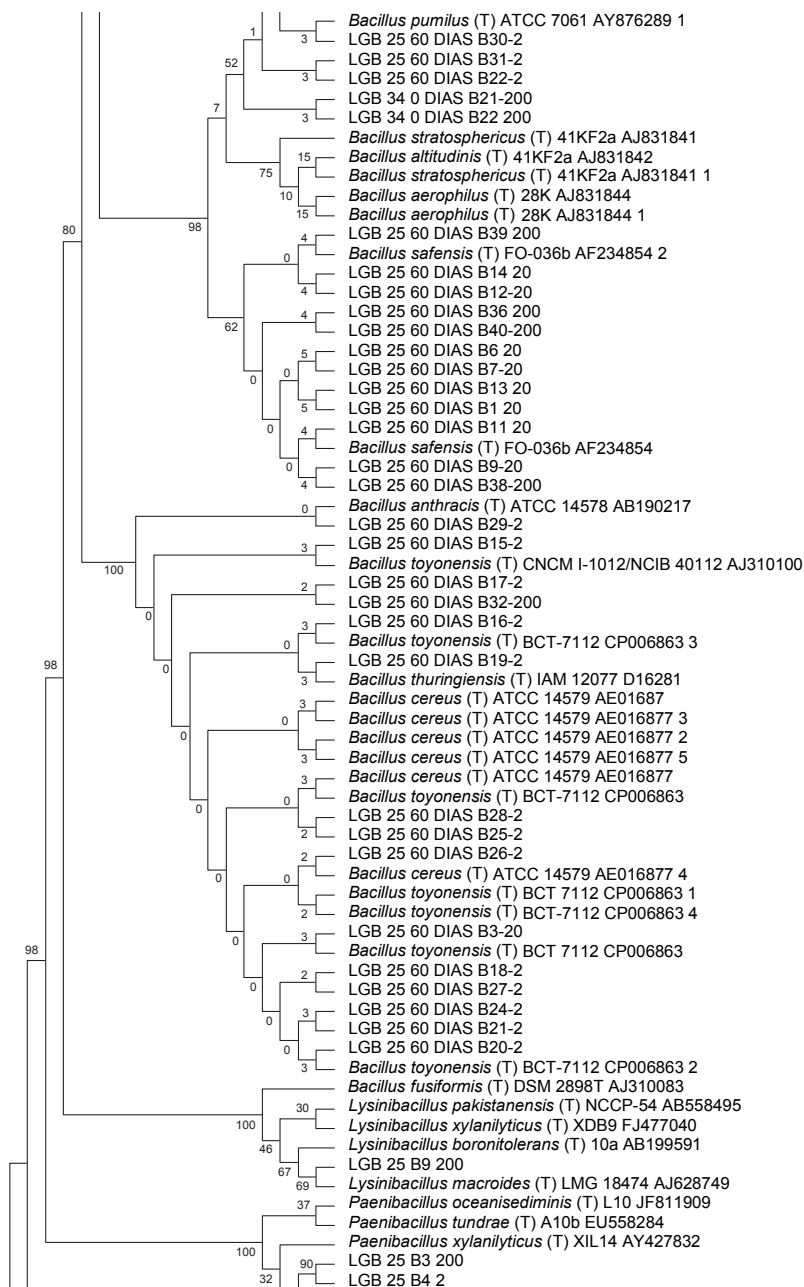
Na Figura 7, estão relacionadas na mesma árvore filogenética, para comparação, as bactérias isoladas nas duas amostras de combustíveis avaliadas no presente trabalho – diesel A S500 e diesel B S500 (B7), com zero e 60 dias de estocagem simulada.



Continua...

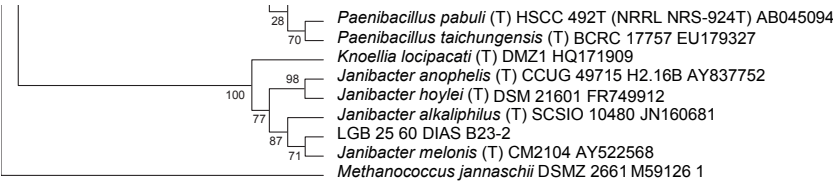
Figura 7. Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região 16S do DNA ribossômico (rDNA) das bactérias isoladas da amostra de diesel A S500 (LGB 25) e diesel B S500 (B7) (LGB 34) com zero e 60 dias de armazenamento simulado e dados do banco de dados RDP. Como *outgroup* foi utilizada a sequência 16S do rDNA da arqueia *Methanococcus jannaschii*.

Figura 7. Continuação.



Continua...

Figura 7. Continuação.



Entre as bactérias isoladas das amostras de diesel A S500 (LGB 25) e de diesel B S500 (B7) (LGB 34), antes da armazenagem e após os 60 dias, a maioria pertence ao gênero *Bacillus*, conforme sumarizado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Relação das bactérias isoladas da amostra de diesel A S500 (LGB 25 - nos tempos zero e 60 dias de estocagem simulada) em nível de gênero e prováveis espécies (filogeneticamente relacionadas de acordo com a análise das sequências da região 16S do DNA ribossômico).

Bactérias isoladas do diesel A S500	
0 dias de estocagem simulada	60 dias de estocagem simulada
2 <i>Paenibacillus taichungensis</i>	12 <i>Bacillus safensis</i>
1 <i>Lysinibacillus macroides</i>	11 <i>Bacillus toyonensis</i>
2 <i>Bacillus subtilis</i>	4 <i>Bacillus subtilis</i>
	4 <i>Bacillus pumilus</i>
	2 <i>Bacillus cereus</i>
	1 <i>Janibacter melonis</i>
	1 <i>Bacillus anthracis</i>
	1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Tabela 3. Relação das bactérias isoladas da amostra de diesel B S500 (B7) (LGB 34 – nos tempos zero e 60 dias de estocagem simulada) em nível de gênero e prováveis espécies (filogeneticamente relacionadas de acordo com a análise das sequências da região 16S do DNA ribossômico).

Bactérias isoladas do diesel B S500 (B7)	
0 dias de estocagem simulada	60 dias de estocagem simulada
13 <i>Bacillus subtilis</i>	3 <i>Bacillus licheniformis</i>
3 <i>Bacillus tequilensis</i>	
2 <i>Bacillus pumilus</i>	

Na amostra de diesel A S500 (LGB 25), houve o aumento do número de isolados ao longo do tempo de armazenamento, enquanto que na amostra de diesel B S500 (B7) (LGB 34) diminuiu o número de isolados obtidos.

A comunidade bacteriana cultivável foi semelhante nas amostras analisadas em nível de gênero e possivelmente diferente em nível de espécie. Em algumas amostras apareceram bactérias que não apareceram nas outras amostras. Por exemplo, *B. subtilis* e *B. pumilus* foram encontradas nas amostras de diesel A e B, e *B. subtilis* só não aparece na amostra de diesel B (LGB 34) com 60 dias de armazenamento. A bactéria *B. pumilus* foi identificada na amostra de diesel A (LGB 25) com 60 dias de armazenamento e no diesel B (LGB 34) do tempo zero (sem armazenamento). Os gêneros *Paenibacillus* e *Lysinibacillus* só apareceram na amostra de diesel A (LGB 25) do tempo zero.

Apesar de terem sido identificadas bactérias nas amostras de diesel do tipo A e B coletadas na região Centro-Oeste, a contagem desses microrganismos indica valores inferiores aos estabelecidos na recomendação da ABNT/NBR 16732, em que são referenciados os limites internacionais de contaminação de combustíveis líquidos por microrganismos.

Conclusões

O monitoramento químico das amostras de diesel B S500 (B7) indicou certa degradação da amostra a partir de 60 dias de estocagem simulada. Foi identificada a presença de bactérias tanto no diesel A S500 quanto no diesel B S500 (B7). Algumas delas presentes em apenas um tipo de diesel. No que se refere à contagem de microrganismos, as amostras de combustíveis analisadas na região Centro-Oeste (posto de combustível e distribuidora da região Centro-Oeste) apresentaram valores abaixo dos limites estipulados internacionalmente.

Referências

ALLSOPP, D.; SEAL, K.; GAYLARDE, C. C. **Introduction to biodeterioration**. 2nd ed. Cambridge: University Press, 2004. DOI: 10.1017/CBO9780511617065.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16732**: combustíveis líquidos e sistemas associados: requisitos para prevenção, monitoramento e controle de contaminação microbiana. Rio de Janeiro, 2019.

AZAMBUJA, A. O.; BÜCKER, F.; QUADROS, P. D.; ZHALNINA, K.; DIAS, R.; VACARO, B. B.; CORREA, C.; FERRÃO, M. F.; CAMARGO, F. A. de O.; TRIPLETT, E.; BENTO, F. M. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying sulfur content, using high-throughput sequencing. **Fuel**, v. 189, p. 340-349, Feb. 2017. DOI: 10.1016/j.fuel.2016.10.108.

BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D.; WATTIAU, P.; HARMS, H.; RUPERT deWACHTER, R.; VERACHTERT, H.; DIELS, L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1834-1843, 2000. DOI: 10.1128/AEM.66.5.1834-1843.2000.

BECARELLI, S.; CHICCA, I.; SIRACUSA, G.; LA CHINA, S.; GENTINI, A.; LORENZI, R.; MUNZ, G.; PETRONI, G.; LEVIN, D. B.; DI GREGORIO, S. Hydrocarbonoclastic Ascomycetes to enhance co-composting of total petroleum hydrocarbon (TPH) contaminated dredged sediments and lignocellulosic matrices. **New Biotechnology**, v. 50, p. 27-36, May 2019. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.01.006.

BENTO, F. M. Até que ponto a contaminação microbiana pode comprometer a qualidade da mistura estocada diesel-biodiesel? In: WORKSHOP CONTROLE PLENO DA QUALIDADE DO BIODIESEL E MISTURA COM DIESEL, 2012, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2014. p. 9-18. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 17).

BENTO, F. M.; BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C.; ENGLERT, G. E.; MULLER, I. L. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 135-142, 2005. DOI: 10.1007/s11274-004-3042-2.

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. DOI: 10.1016/S0964-8305(00)00112-8.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Microbial contamination of stored diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 27, p. 71-75, 1996.

BOELTER, G.; CAZAROLLI, J. C.; BEKER, S. A.; QUADROS, P. D. de; CORREA, C.; FERRÃO, M. F.; GALEAZZI, C. F.; PIZZOLATO, T. M.; BENTO, F. M. *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 30410-30424, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-3015-x.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1007-1019, 2000. DOI: 10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 14 jan. 2005.

BREWER, M. Identification of precipitate found in depot storage tanks containing Swedish Klass1 B5 fuels. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BIODIESEL, 2007, Vienna, Austria. **Proceedings...** [Washington]: USDA; [Kuala Lumpur]: AOCS, 2007.

BRZESZCZ, J.; KASZYCKI, P. Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. **Biodegradation**, v. 29, n. 4, p. 359-407, 2018. DOI: 10.1007/s10532-018-9837-x.

BÜCKER, F.; BARBOSA, C. S.; QUADROS, P. D.; BUENO, M. K.; FIORI, P.; TE HUANG, C.; FRAZZON, A. P. G.; FERRÃO, M. F.; CAMARGO, F. A. de O.; BENTO, F. M. 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, p. 346-355, Nov. 2014. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.05.030.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. do C. R.; CAMARGO, F. A. de O.; BENTO, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 172-178, 2011. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.09.008.

CAVALCANTI, E. H. de S. Estabilidade do biodiesel e misturas: abrangência, limitações dos métodos de avaliação e alternativas futuras. **Revista Biodieselbr**, n. 13, p. 71-73, 2009.

CAZAROLLI, J. C.; BOELTER, G.; LIMA, A. M. d. I. de; HENGLES, T.; CORREA, C.; PERALBA, M. C.; FERRÃO, M. F.; CAVALCANTI, E. H. S.; BISOL, M. V.; BEZERRA, K. S.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; BENTO, M. V. Nature of insoluble material found in the bottom of soybean biodiesel storage tank: chemical and microbiological approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2034-2045, 2018. DOI: 10.21577/0103-5053.20180078.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.-H.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 587-595, Sept. 2004. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.04.006.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D633-D642, Jan. 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1244.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, v. 11, article ID 941810, 2011. 13 p. DOI: 10.4061/2011/941810.

DODOS, G.; ZANNIKOS, F. Microbiological growth study of biodiesel fuel. **SAE International Journal of Fuels and Lubricants**, v. 6, n. 2, p. 419-429, 2013. DOI: 10.4271/2013-01-1148.

FONSECA, M. M. B.; MINNICELLI, C. F.; SILVA-PORTELA, R. C. B.; FARIAS, M. F.; SANTOS, P. R. S.; FERNANDES, G. J. T.; AGNEZ-LIMA, L. F. Unlocking and functional profiling of the bacterial communities in diesel tanks upon additive treatment. **Fuel**, v. 236, p. 1311-1320, 2019. DOI: 10.1016/j.fuel.2018.09.107.

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. 1-10, 1999. DOI: 10.1590/S0001-37141999000100001.

GUIDELINES for the investigation of the microbial content of petroleum fuels and for the implementation of avoidance and remedial strategy. 2nd ed. London: The Energy Institute, 2007.

HU, D.; LIN, W.; ZENG, J.; WU, P.; ZHANG, M.; GUO, L.; YE, C.; WAN, K.; YU, X. Profiling the microbial contamination in aviation fuel from an airport. **Biofouling: the journal of bioadhesion and biofilm research**, v. 35, n. 8, p. 856-869, Oct 2019a. DOI: 10.1080/08927014.2019.1671977.

HU, D.; ZENG, J.; WU, S.; LI, X.; YE, C.; LIN, W.; YU, X. A survey of microbial contamination in aviation fuel from aircraft fuel tanks. **Folia Microbiologica**, v. 65, p. 371-380, 2019b. DOI: 10.1007/s12223-019-00744-w.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, June 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 7, p. 669-677, July 2007. DOI: 10.1016/j.fuproc.2007.01.005.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, June 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley and Sons, 1999. p. 115-175.

LEE, I.; PFALTZGRAF, L. M.; POPPE, G. B.; POWERS, E.; HAINES, T. The role of sterol glucosides on filter plugging. **Biodiesel Magazine**, v. 4, p. 105-112, Apr 2007.

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; BECKER, R.; GORBUSHINA, A. A.; TOEPEL, J. An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 129, p. 89-94, Apr. 2018. DOI: 10.1016/j.ibiod.2018.01.009.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination control in fuels and fuel systems since 1980 – a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 88-104, July 2013. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.08.002.

PFALTZGRAF, L.; LEE, I.; FOSTER, J.; POPPE, G. Effect of minor components on the cloud point and filterability. **Biodiesel Magazine**, Nov 2007.

PRINCE, R. C.; AMANDE, T. J.; MCGENITY, T. J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: MCGENITY, T. (Ed.). **Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes**. Springer, Cham, 2018. p. 1-41. (Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology). DOI: 10.1007/978-3-319-60053-6_15-1.

RESTREPO-FLÓREZ, J.-M.; BASSI, A.; REHMANN, L.; THOMPSON, M. R. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 456-463, Nov 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.068.

SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTOFF, R. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 724-730, Jan. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.029.

SELVIDGE, C.; BLUMENSHINE, S.; CAMPBELL, K.; DOWELL, C.; STOLIS, J. Effect of biodiesel impurities on filterability and phase separation from biodiesel and biodiesel blends. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 10., 2007, Tucson, Arizona. **Proceedings...** [S.l.]: IASH, 2009.

SOARES, I. P.; LAVIOLA, B. S.; SCHULTZ, E. L.; ALMEIDA, J.R.M.; FÁVARO, L. C. L.; DAMASO, M.C.T.; COSTA, P.P.K.; SALUM, T. F. C. **Biodiesel: desafios e oportunidades**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2014. 9 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 8).

SØRENSEN, G.; PEDERSEN, D. V.; NØRGAARD, A. K.; SØRENSEN, K. B.; NYGAARD, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5259-5264, Apr. 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.017.

SORIANO, A. U.; MARTINS, L. F.; VENTURA, E. S. de A.; LANDA, F. H. T. G. de; VALONI, É. de A.; FARIA, F. R. D.; FERREIRA, R. F.; FALLER, M. C. K.; VALÉRIO, R. R.; LEITE, D. C. de A.; CARMO, F. L. do; PEIXOTO, R. S. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 102-114, Apr. 2015. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.11.014.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct 2011. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00062-07.

WHITE, J.; GILBERT, J.; HILL, G.; HILL, E.; HUSE, S. M.; WEIGHTMAN, A. J.; MAHENTHIRALINGAM, E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 4527-4538, 2011. DOI: 10.1128/AEM.02317-10.

YEMASHOVA, N. A.; MURYGINA, V. P.; ZHUKOV, D. V.; ZAKHARYANTZ, A. A.; GLADCHENKO, M. A.; APPANNA, V.; KALYUZHNYI, S. V. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 4, p. 315-337, Jan 2007. DOI: 10.1007/s11157-006-9118-8.

