

# Contaminação microbiana de biodiesel (B100), diesel (B0), e blendas (B7) comercializadas no Estado de Goiás e no Distrito Federal

*Artur Fiuza Borges Arantes<sup>1</sup>, Mariana Santos Tamietti<sup>2</sup>, Ana Carolina Bitencourt de Araujo<sup>3</sup>, Patrícia Portela de Medeiros Brunale<sup>4</sup>, Bruno Rafael de Lima Moraes<sup>5</sup>, Paula Fernandes Franco<sup>6</sup>, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa<sup>7</sup>, Paula Marcela Duque Jaramillo<sup>8</sup>, Betania Ferraz Quirino<sup>9</sup>, Betulia de Moraes Souto<sup>10</sup>, Itânia Pinheiro Soares<sup>11</sup>, Léia Cecília de Lima Fávaro<sup>12</sup>*

## Resumo

No Brasil, atualmente, o monitoramento da qualidade do biodiesel, por meio de ensaios físico-químicos, é feito apenas na usina e nos postos de combustíveis, quando em mistura com o diesel. Apesar do conhecimento dos efeitos deletérios da ação microbiana nos combustíveis líquidos, não há no momento legislação específica nacional que regule a avaliação da presença de microrganismos contaminantes em combustíveis líquidos e sistemas associados. Nesse contexto, buscou-se determinar as comunidades microbianas cultiváveis contaminantes em amostras representativas de diesel (B0, uma amostra S500 obtida de distribuidora no DF), de biodiesel (B100, duas amostras obtidas de tanques de armazenamento de usina de produção em Goiás e uma de distribuidora no DF), bem como de blendas biodiesel/diesel (B7, com duas amostras de S500 e duas de S10 obtidas de diferentes postos de gasolina no DF). Todas as amostras foram processadas imediatamente após a coleta para o isolamento de microrganismos. Na sequência, duas amostras de diesel (B0 S500 de distribuidora do DF e blenda B7 S500 de posto de combustível do DF) foram coletadas e submetidas à simulação de estocagem em protótipos de tanques de 20 litros, com isolamentos de microrganismos realizados aos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Cada amostra

<sup>1</sup> Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, artur.arantes@colaborador.embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga, mestranda em Biologia Molecular na Universidade de Brasília, mariana.tamietti@colaborador.embrapa.br

<sup>3</sup> Bióloga, mestre em Ciências Genômicas, Universidade Católica de Brasília, anaraujo.df@gmail.com

<sup>4</sup> Química, mestre em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, patybrunale@globlo.com

<sup>5</sup> Biólogo, graduado em Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília, bruno.moraes@colaborador.embrapa.br

<sup>6</sup> Bióloga, mestre em Biologia Molecular na Universidade de Brasília, analista da Embrapa Agroenergia, paula.franco@embrapa.br

<sup>7</sup> Química, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

<sup>8</sup> Biomédica, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Paula.jaramillo@colaborador.embrapa.br

<sup>9</sup> Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

<sup>10</sup> Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

<sup>11</sup> Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

<sup>12</sup> Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

foi filtrada (volumes de 2 mL, 20 mL e 200 mL) em membrana de 0,22 micrômetros (três membranas para cada volume), e alíquotas foram dispostas em meios de cultura TSA, MEA, e YPDA contendo fungicida ou antibióticos, para o isolamento de bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente. Isolaram-se bactérias e fungos de todas as amostras avaliadas, constituindo-se um banco de microrganismos contaminantes de biodiesel/diesel com mais de 700 linhagens preservadas. Análise das sequências do DNA ribossômico revelou que as bactérias identificadas até o momento pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Janibacter*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*. Já os fungos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Byssoschlamys* e *Paecilomyces*. O conhecimento da diversidade microbiana de combustíveis é importante para melhor compreensão do papel e do impacto desses microrganismos contaminantes na qualidade do combustível armazenado.

**Palavras-chave:** fungos filamentosos. bactérias. biocombustíveis. isolamento microbiano. DNA ribossomal.

## Introdução

É sabido que o biodiesel pode sofrer degradação química, a qual pode ser potencializada por fatores como temperatura, luz e umidade. Além disso, o biodiesel também pode sofrer degradação mediada por microrganismos, que têm seu crescimento estimulado pela presença de água livre e outros micronutrientes (CHAO et al., 2010). De fato, as temperaturas elevadas que ocorrem durante os processos de produção dos combustíveis esterilizam o combustível produzido. No entanto, durante o armazenamento, ou dependendo das condições de transporte, pode ocorrer a entrada de água nos sistemas e, por conseguinte, a contaminação microbiológica e uma possível biodeterioração. A água é um fator essencial para a atividade microbiana e, devido a esse, fato a maioria das recomendações para evitar a presença e a atividade de microrganismos envolve o controle da água nos sistemas (PASMANN, 2013; SOARES et al., 2014).

Apesar do conhecimento dos efeitos deletérios da ação microbiana nos combustíveis líquidos, especialmente diesel e biodiesel, não há no momento legislação específica no Brasil que regule a avaliação de contaminação microbiológica em combustíveis líquidos e sistemas associados. Nesse contexto, buscou-se acessar as comunidades microbianas cultiváveis contaminantes de diesel, biodiesel e blendas biodiesel/diesel, utilizando-se amostras coletadas no Estado de Goiás e no Distrito Federal.

## Materiais e métodos

### Coleta de amostras de combustível

A coleta foi realizada em bombonas estéreis, com auxílio de luvas e utensílios esterilizados, conforme recomendações da norma internacional ASTM D6469-16 (ASTM D6974-16 Standard Practice for Enumeration of Viable Bacteria and Fungi in Liquid Fuels—Filtration and Culture Procedures). Os combustíveis coletados foram representativos de diferentes pontos da cadeia de produção e distribuição dos

combustíveis. Oito amostras foram processadas para análise microbiológica imediatamente após a coleta, enquanto duas amostras foram coletadas e armazenadas em protótipos de tanques de estocagem para amostragens ao longo do tempo.

As amostras que foram processadas para isolamento microbiano imediatamente após a coleta foram: a) biodiesel (B100), sendo duas amostras de tanques de armazenamento de usina de produção no Estado de Goiás e uma amostra de tanque de armazenamento de uma distribuidora no DF; b) diesel (B0), sendo uma amostra (S500) obtida de distribuidora no DF; c) blends de diesel B7, sendo duas amostras de S500 e duas amostras de S10 obtidas de diferentes postos de gasolina no DF. Amostras de diesel (B0 S500 de distribuidora do DF e blenda B7 S500 de posto de combustível do DF) foram coletadas e submetidas à simulação de estocagem em protótipos de tanques de 10 litros. Isolamentos de microrganismos foram realizados nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

### Isolamento de microrganismos contaminantes de biodiesel, diesel e blends

Para o isolamento, cada amostra foi filtrada (2 mL, 20 mL e 200 mL) em membrana de 0,22 micrômetros (três membranas para cada volume), a qual foi disposta em meios de cultura TSA, MEA, e YPDA contendo fungicida ou antibióticos, para o isolamento de bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente (ASTM D6469). As placas foram incubadas a 28 °C e monitoradas por até 30 dias quanto ao crescimento de microrganismos. O número de microrganismos foi contado e as colônias foram purificadas até a obtenção de culturas puras. As bactérias foram preservadas por ultracongelamento e os fungos foram preservados pelo método Castellani (1967).

### Identificação molecular de bactérias e fungos contaminantes de biodiesel, diesel e blends

As bactérias e fungos foram cultivados e submetidos à extração de ácidos nucléicos. Para bactérias, a região 16S do DNA ribossômico foi amplificada com os iniciadores universais P0(27f) (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCGGAACG-3') (LANE, 1999), os quais amplificam uma região de aproximadamente 1.500 pares de bases. Para os fungos, a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico foi amplificada com os primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), os quais amplificam uma região de aproximadamente 600 pb (FAVARO et al., 2011). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio e fotodocumentados sob luz UV. Os produtos de amplificação foram purificados e o sequenciamento foi realizado para ambas as fitas com os mesmos iniciadores descritos. As sequências foram analisadas com auxílio do software CodonCode Aligner<sup>13</sup> para análise de qualidade e obtenção da sequência consenso. As sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST nas bases de dados de microrganismos: MycoBank, Ribosomal Database Project e GenBank<sup>14</sup>.

<sup>1</sup> Disponível em: <<http://www.codoncode.com/>>

<sup>2</sup> Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

## Resultados e Discussão

Os resultados de isolamento de combustível não armazenado estão representados na Tabela 1. Na Tabela 2, estão representados os dados de isolamento de amostras armazenadas por até 90 dias. Isolaram-se fungos e bactérias de todas as amostras e tipos de combustíveis. Uma coleção de microrganismos contaminantes foi estabelecida e encontra-se armazenada na Embrapa Agroenergia. Sua identificação parcial revela que as bactérias pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Janibacter*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*, e que os fungos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Byssoschlamys* e *Paecilomyces*.

Gassen et al. (2015) identificaram *Aspergillus* e *Paecilomyces* em amostras de biodiesel, diesel e blendas biodiesel/diesel. Esses microrganismos seriam responsáveis por maior deterioração de amostras contendo biodiesel comparado a amostras de diesel puro.

**Tabela 1.** Número de microrganismos cultiváveis isolados a partir de amostras de combustíveis provenientes de diferentes pontos da cadeia produtiva, no ano de 2015. Para essas amostras, as análises foram realizadas imediatamente após a coleta (tempo zero).

Nº	Amostra	Origem	Linhagens obtidas e purificadas (fungos/bactérias)	Linhagens preservadas (fungos/bactérias)
1	ANP S500/B7/Coleta 22-01-2015/Posto B/Asa Norte	DF	14/14	14/14
2	ANP S500/B7/Coleta 22-01-2015/Posto C/Asa Norte	DF	6/46	6/46
3	ANP S10/B7/Coleta 22-01-2015/Posto A/Asa Norte	DF	8/21	8/21
4	ANP S10/B7/Coleta 22-01-2015/Posto C/Asa Norte	DF	7/10	7/10
5	ANP B100/Coleta 05-14/Goiás	GO	13/4	13/4
6	B100 / Coleta 16-06-15 / (B100 Metílico)	GO	9/51	8/45 (*)
7	B100 / Distribuidora / Coleta 03-07-2015 (LGB-024/2015)	DF	26/17	23/16 (*)
8	Diesel S500 / Distribuidora /	DF	43/30	39/30 (*)

(\*) Alguns microrganismos não permaneceram viáveis após a preservação.

Dentre as amostras apresentadas na Tabela 1, observou-se uma grande variação nas quantidades de fungos e bactérias em amostras de coletas nos postos, nas quais não se pode aferir se a concentração de enxofre (S500 e S10) no combustível afetou diretamente o crescimento dos microrganismos. Observou-se que as amostras de B100 e diesel da distribuidora (6, 7 e 8) apresentaram quantias consideráveis tanto de fungos quanto de bactérias. Nos tanques das distribuidoras, existe um grande volume de combustível que pode ser proveniente de diversos lotes e diferentes origens e composições, como no caso do biodiesel. Esse fato pode explicar a maior concentração de microrganismos.

Observou-se ainda que em quase todas as amostras não houve redução entre as linhagens purificadas e preservadas.

**Tabela 2.** Número de microrganismos cultiváveis isolados a partir de amostras de combustíveis provenientes de diferentes pontos da cadeia produtiva, no ano de 2015. Para essas amostras, as análises foram realizadas em diferentes tempos de estocagem.

Amostra	Origem	Linhagens obtidas, purificadas e preservadas (fungos/bactérias)				
		Tempo zero lavagem do tanque (Fungo/ Bactéria)	Tempo zero (Fungo/ Bactéria)	Tempo 30D (Fungo/ Bactéria)	Tempo 60D (Fungo/ Bactéria)	Tempo 90D (Fungo/ Bactéria)
Diesel S500 / Distribuidora / Linha de bombeamento. Coleta 03-07-2015 (LGB- 025/2015)	DF	13/27	22/10	16/6	13/40	68/20
B7 (S500) Posto / Coleta 17- 08-2015 (LGB-034/2015)	DF	35/45	19/26	50/8	9/4	103/29

Na Tabela 2, observamos que foram identificados fungos e bactérias na lavagem do tanque, durante a esterilização para receber o combustível. Em relação à amostra S500, houve uma redução da presença de fungos entre os tempos Zero e 60 dias, com aumento não esperado, superior a cinco vezes aos 90 dias. Com as bactérias, houve um decréscimo em sua contagem, com aumento aos 60 dias, seguido de nova redução aos 90 dias. Para a amostra B7, houve uma significativa oscilação na contagem de fungos, uma expressiva redução na contagem de bactérias e um crescimento inesperado de ambos para o tempo de 90 dias.

Não fosse o comportamento observado aos 90 dias, poderia inferir-se que nas condições avaliadas, a amostra que contém biodiesel estaria com menor grau de contaminação por microrganismos, muito embora isso não reflita necessariamente em degradação do combustível.

## Conclusões

Com análises apenas no tempo zero, podemos inferir que a contaminação está mais relacionada às condições de armazenamento da amostra que propriamente à composição desta. Em relação à estocagem por período de até 90 dias, serão necessários mais testes que possam explicar as oscilações observadas.

## Agradecimentos

Embrapa e CNPq.

## Referências

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water: Further researches. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CHAO, Y.; LIU, N.; ZHANG, T.; CHEN, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 11, p. 3358-3364, 2010.

FAVARO, L. C. DE L.; MELO, F. L. DE; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS One**, v. 6, n. 8, artigo e14828, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014828>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, edição especial, p. 88-104, 2013.

GASSEN, J.; BENTO, F. M.; FRAZZON, A. P. G.; FERRÃO, M. F.; MARRONI, I. V.; SIMONETTI, A. B. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 541-547, 2015.

SOARES, I. P.; LAVIOLA, B. G.; SCHULTZ, E. L.; ALMEIDA, J. R. M. de; FAVARO, L. C. de L.; DAMASO, M. C. T.; COSTA, P. P. K. G.; SALUM, T. F. C. **Biodiesel: desafios e oportunidades**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2014. 9 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 08).