



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA BIOLÓGICA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS
CULTIVÁVEIS CONTAMINANTES DE DIESEL A E DIESEL B S500**

PATRÍCIA PORTELA DE MEDEIROS BRUNALE

Brasília – DF

2017

PATRÍCIA PORTELA DE MEDEIROS BRUNALE

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS
CULTIVÁVEIS CONTAMINANTES DE DIESEL A E DIESEL B S500**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica Biológica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica Biológica.
Orientadora: Dra. Betania Ferraz Quirino.

Brasília – DF

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Patrícia Portela de Medeiros Brunale**, matrícula nº **15/0102607**, intitulada ***“Identificação molecular dos micro-organismos cultiváveis contaminantes de Diesel A e Diesel B S500”***, apresentada no (a) Auditório Lauro Morhy do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 23 de fevereiro de 2017.

Prof.^a Dra. Betania Ferraz Quirino
Presidente de Banca (Embrapa Agroenergia)

Prof.^a Dra. Itania Pinheiro Soares
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Prof.^a Dra. Cristine Chaves Barreto
Membro Suplente (UCB)

Em 23 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que me deram forças e incentivos e meu marido Thiago Delmonte de Baere que esteve presente durante toda a minha pós-graduação me dando todo apoio e suporte.

À minha orientadora Betania Ferraz Quirino que me deu essa grande oportunidade de atuar em laboratório e que me ajudou sempre que possível.

À analista Bétulia Souto que me ensinou quase tudo durante o período em que estive em laboratório, e que me ajudou muito nessa caminhada.

Aos meus parceiros e parceiras de bancada Felipe, Isis, Ohana, Carolina, Valquíria e Bruno.

Aos meus avaliadores Itania, Cristine Chaves Barreto e João Ricardo de Almeida que foram decisivos na construção deste trabalho.

À Itania Pinheiro Soares, coordenadora do projeto no qual estive trabalhando durante o período deste trabalho.

À Léia Cecília de Lima Fávaro que também me auxiliou e orientou nos momentos de dúvida no laboratório.

Aos meus colegas de trabalho da ANP que me ajudaram e apoiaram.

As instituições que estão envolvidas na pesquisa: Agencia Nacional do Petróleo, EMBRAPA Agroenergia e CNPq.

E a todas as pessoas que me apoiaram e me incentivaram antes e durante a pós-graduação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. ÓLEO DIESEL	7
1.2. BIODIESEL	7
1.3. MISTURA BIODIESEL/DIESEL	9
1.4. DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO BIODIESEL	10
1.5. DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO DIESEL	11
1.6. ANÁLISE QUÍMICA	14
1.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	14
1.7.1. PCR- POLYMERASE CHAIN REACTION	15
1.7.2. 16S rDNA	15
1.7.3. ITS1 e ITS4 rDNA	16
2. OBJETIVOS	18
OBJETIVO GERAL	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS	19
3.2. FILTRAGEM DOS COMBUSTÍVEIS	19
3.3. CULTIVO DOS MICRORGANISMOS	21
3.4. PRESERVAÇÃO	21
3.5. CULTIVO DOS MICRORGANISMOS	22
3.5.1. CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO	22
3.5.2. CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO	22
3.6. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	23
3.6.1. BACTÉRIAS	23
3.6.2. FUNGOS	23
3.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	24

3.7.1. DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS	24
3.7.2. DNA GENÔMICO DE FUNGOS	24
3.7.3. ANÁLISE DOS DADOS UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	25
3.8. ANÁLISE QUÍMICA.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. BACTÉRIAS.....	28
4.2. FUNGOS.....	36
4.3. ANALISE QUÍMICA.....	39
5. DISCUSSÃO.....	42
5.1. BACTÉRIAS.....	43
5.2. FUNGOS.....	47
5.3. BIORREMEDIAÇÃO	51
5.4. CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS DOS CONTAMINANTES NOS COMBUSTÍVEIS.....	52
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	56
Anexo 1	64
Anexo 2	65
Anexo 3	67
Anexo 4	68
Anexo 5	69
Anexo 6	70
Anexo 7	71
Anexo 8	72
Anexo 9	79
Anexo 10	83

Anexo 11	84
Anexo 12	88
Anexo 13	92
Anexo 14	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. ÓLEO DIESEL

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo composto por átomos de carbono, hidrogênio, enxofre, nitrogênio e oxigênio. É um hidrocarboneto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico (PETRÓLEO BRASILEIRO S. A. PETROBRAS, 2015).

A resolução ANP nº 50 (2013) estabelece duas classificações de óleo diesel para uso rodoviário: o óleo diesel A é o combustível produzido por refinarias, nas centrais de matérias-primas petroquímicas e nos formuladores sendo destinado a veículos dotados de motores do ciclo Diesel, de uso rodoviário, sem adição de biodiesel; e o óleo diesel B é o óleo diesel A adicionado de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente.

Os óleos dieiseis A e B apresentam as seguintes nomenclaturas conforme o teor de enxofre: S10 - combustíveis com teor de enxofre, máximo, de 10 mg/kg e S500- combustíveis com teor de enxofre, máximo, de 500 mg/kg. Para diferenciar estes combustíveis, no S500 é adicionado corante vermelho, de acordo com a resolução ANP nº 50 (2013).

A obtenção do óleo diesel acontece por meio do refino do petróleo através da destilação fracionada. Neste processo, devido aos diferentes pontos de ebulição das substâncias que compõem o petróleo é possível separá-las e convertê-las nos produtos finais. As parcelas de cada produto obtido no refino dependem de uma série de variáveis: da qualidade do petróleo que está sendo processado e da estrutura da refinaria - sua complexidade, unidades e mercado em que atua (ROCHA, 2009).

1.2. BIODIESEL

Combustíveis alternativos têm atraído atenção do mercado, devido ao agravamento dos problemas de poluição atmosférica. Em 1900, óleos vegetais já haviam sido utilizados diretamente em motores à diesel. No entanto, a utilização do óleo vegetal gera depósitos de carbono e o espessamento do óleo lubrificante do motor, isso ocorre devido a sua viscosidade e volatilidade elevadas e baixos níveis

de ácidos graxos poliinsaturados, bem como a formação de goma por causa de sua oxidação e polimerização. Isto prejudica a operação normal do motor e reduz sua vida útil (LEUNG *et al*, 2006).

O biodiesel é um derivado de óleo vegetal que foi desenvolvido há mais de seis décadas, pode substituir a utilização direta do óleo vegetal de cadeia longa. Tornou-se mais amplamente usado durante a crise energética em 1970. Três processos principais: pirólise, micro-emulsificação e transesterificação, foram adaptados para produzir biodiesel visando abastecer os motores a diesel. Entre estes três métodos, a transesterificação (ou alcoólise) é o mais usado. Este processo transfere o éster de um álcool de cadeia para outro por meio de refluxo com um excesso do segundo álcool, na presença de um catalisador. Na produção de biodiesel, a gordura de óleo de vegetal ou animal (triglicerídeos) reage com o álcool (normalmente metanol ou etanol) para formar os ésteres (biodiesel) e o glicerol como um subproduto, conforme Figura 1. O hidróxido de sódio é normalmente utilizado para catalisar a seguinte reação principal (LEUNG *et al*, 2006).

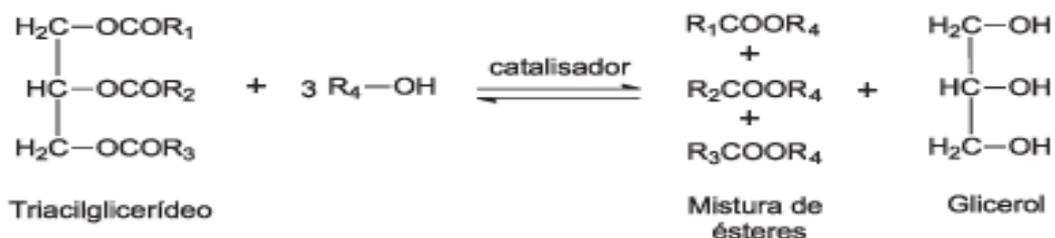


Figura 1- Reação de transesterificação para a produção de biodiesel (modificado a partir de CHISTI, 2007).

O Biodiesel é um combustível consolidado. Sua tecnologia de produção e utilização é conhecida há mais de 50 anos (CHISTI, 2007).

A introdução do biodiesel no Brasil se deu a partir do lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), em 2004. No ano seguinte, foi autorizada a mistura de 2% (v/v) de biodiesel no diesel de petróleo, passando a ser obrigatória a partir de 2008. Esse percentual vem sendo aumentado de forma gradativa, sendo que desde 2014 a obrigatoriedade da mistura é de 7% (v/v) de acordo com a Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014. Em março de 2016, foi aprovada a Lei nº 13.263 que determina que a porcentagem de biodiesel a

ser misturado no óleo diesel seja incrementada em 1% a cada ano, chegando a 10% em 2019.

De acordo com a resolução ANP nº 30 (2016), biodiesel é o combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de materiais graxos, de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 3/2014, parte integrante da Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014, ou outra que venha substituí-la.

O Brasil possui um grande potencial agrícola para a produção de biodiesel contando com muitas espécies de plantas nativas e outras que foram introduzidas no país, produtoras de óleo, que podem ser matéria-prima como: soja, pinhão manso, semente de algodão (BERGMANN *et al.*, 2013).

Em 2015, a capacidade nominal para produção de biodiesel no Brasil era de cerca de 7,4 milhões de m³ (20,4 mil m³/ dia). Entretanto, a produção nacional foi de 3,9 milhões de m³, o que correspondeu a 53,3% da capacidade total (ANP, 2016).

A Região Centro-Oeste é a maior produtora de biodiesel, com um volume de cerca de 1,7 milhão de m³, equivalente a 44,4% da produção nacional. Em seguida vem o Sul, com uma produção de 1,5 milhão de m³, 38,4% do total nacional. Por estados, o Rio Grande do Sul é o maior produtor, com um volume de 1.1 milhão de m³, equivalente a 28,3% do total nacional. Em seguida, veio Mato Grosso, com 845,7 mil m³ (21,5% do total, com um aumento de 38,4%) (ANP, 2016.)

1.3. MISTURA BIODIESEL/DIESEL

A partir de novembro de 2014 o percentual de biodiesel adicionado ao óleo diesel subiu de 6 para 7%, de acordo com a Lei nº 13.033 (2014).

Com a criação da lei ordinária nº 13.263/2016, de 23 de março de 2016, o percentual de biodiesel adicionado ao óleo diesel irá aumentar 1% a cada ano até 2019, quando alcança 10%. Além disso, a resolução ANP nº 30 (2016) permite, em caráter autorizativo, que a adição de biodiesel obrigatória pode ser superior a fixada em lei. A mistura composta por óleo diesel A e biodiesel pode ser superior ao teor compulsório estabelecido pela legislação vigente e inferior ou igual a 30%, em volume, que atenda a especificação estabelecida no Regulamento Técnico.

A utilização de 7% de biodiesel, vigente desde novembro de 2014, em todo o diesel terrestre comercializado no Brasil, significa que a emissão de 7,3 milhões de toneladas de CO₂ será evitada por ano. Com a utilização do B20 Metropolitano, cerca de 580 mil toneladas a mais deixariam de ser emitidas na atmosfera, o equivalente à plantação de 3,6 milhões de árvores (EMBRAPA, 2015).

1.4. DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO BODIESEL

Biodiesel é biodegradável, mais de 98% de sua massa é biologicamente degradada em três semanas, enquanto que apenas 50% do óleo diesel é degradado no mesmo período (LEUNG *et al.* apud Williamson *et al.*, 1998). No entanto, existem muito poucos estudos sobre a degradação do biodiesel sob diferentes temperaturas e ambientes de armazenamento, tal como em um ambiente selado ou à temperatura ambiente, e em um ambiente com ou sem a presença de umidade. Mesmo havendo armazenamento adequado pode ocorrer degradação do biodiesel, o que afeta o desempenho do motor e a sua vida útil (LEUNG *et al.*, 2006).

A temperatura e a exposição ao ar são dois fatores importantes que influenciam na degradação do biodiesel. Se o biodiesel é armazenado em um ambiente de elevada temperatura e exposto ao ar, a taxa de degradação será muito maior. A exposição ao ar ou a temperatura por si só, no entanto, tem pouco efeito sobre a degradação do biodiesel. O teor de água no biodiesel irá acelerar a degradação de biodiesel devido à hidrólise, mas o seu efeito é muito menor do que os outros fatores (LEUNG *et al.*, 2006).

Muitas espécies bacterianas são altamente especializadas para a degradação de hidrocarbonetos. Elas são chamadas bactérias hidrocarboneto clásticas (HCB) e desempenham um papel fundamental na remoção de hidrocarbonetos de ambientes poluídos e não poluídos. Bactérias alceno-degradantes constituem uma população funcional importante nos ecossistemas óleo-área poluída (SOUZA *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que há maior degradabilidade do óleo diesel quando o biodiesel é adicionado. O biocombustível provavelmente acelera e promove a degradação do diesel (SOUZA *et al.*, 2016) e, essa degradação pode ser ter sido promovida pelo aumento do crescimento microbiano. Na verdade, essa relação já foi estabelecida por Schleicher *et al.* (2009), que descobriram que o crescimento microbiano foi uma das causas da degradação do biodiesel. Esta

degradação é reforçada porque os microrganismos são capazes de eliminar as barreiras entre o óleo e a água a partir da produção de biossurfactantes (Owsianiak *et al.* apud SOUZA *et al.*, 2016).

Alguns estudos sobre a diversidade de microrganismos nesses combustíveis mostram a presença de bactérias e fungos. Foram encontrados vários gêneros de bactérias no combustível composto de diesel e biodiesel (90% de diesel e 10% de biodiesel-B10), entre eles, *Bacillus* e *Pseudomonas*, mas o gênero com maior proporção foi *Comamonas* (BÜCKER *et al.*, 2014).

Bento e Gaylarde (2001) detectaram a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Hormoconis*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Candida* e *Rhodotorula*, e bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* presentes em óleo diesel puro, no Brasil.

Apesar de todos os problemas causados, como perda de qualidade dos combustíveis e entupimento de bicos injetores e filtros, pouco se sabe sobre quem são estes microrganismos capazes de degradar o biodiesel e o diesel. O isolamento, a identificação e a caracterização destes é o primeiro passo para conhecer a diversidade microbiológica. Este conhecimento poderá ser útil para o desenvolvimento de compostos que possam ser adicionados a estes combustíveis para inibir o crescimento de microrganismos degradantes.

1.5. DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO DIESEL

O óleo diesel é utilizado em todo o mundo. O aumento do seu consumo por carros, geradores e máquinas industriais, combinado com o transporte de grandes quantidades deste óleo por longas distâncias aumenta os riscos de contaminação dos solos, reservatórios de água doce e mares (SAWADOGO *et al.*, 2015).

Os produtos petrolíferos são considerados recalcitrantes à degradação microbiana e persistem nos ecossistemas devido à sua natureza hidrofóbica e baixa volatilidade, representando assim uma ameaça significativa para o meio ambiente (SAWADOGO *et al.*, 2015).

Apesar disso, já foram encontradas bactérias como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas do próprio Diesel, que são capazes de degradar esse combustível. A degradação ocorre quando estes microrganismos aumentam

sua atividade produtiva de biossurfactantes utilizando óleos vegetais, querosene, petróleo e diesel como principais fontes de carbono (PRIYA *et al.*, 2009). Além disso, a produção de biossurfactantes auxilia na emulsificação dos hidrocarbonetos diminuindo a sua recalcitrância.

A maioria dos microrganismos potenciais degradadores de combustíveis são produtores de biossurfactantes. Estes, na presença de óleo, exibem atividades emulsificantes produzindo biossurfactantes, o que auxilia na utilização dos hidrocarbonetos como fontes de substratos convertendo-os em produtos inofensivos ou mineralizando-os (PRIYA *et al.*, 2009).

Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos na presença de hidrocarbonetos provenientes de vazamentos e por isso são eficazes na recuperação destes ecossistemas uma vez que aceleram a biodegradação destes compostos. Além disso, alguns biossurfactantes apresentam capacidades antifúngicas, antivirais e antibacterianas (SCHULTZ, 2010).

Outras espécies de bactéria como a *Bacillus cereus* e os fungos *Trichoderma harzuanum* e *Trichothercium roseum* também degradam o óleo diesel, mas não com a mesma eficácia que o *Bacillus subtilis*. Este gênero de bactéria é o que promove a melhor degradação do diesel comparado com outros microrganismos isolados do próprio combustível (NWAOGU *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *Bacillus* liberam o endósporo logo que as condições não são favoráveis. O fenômeno de esporulação ao contrário do que acontece pelas espécies do gênero *Clostridium*, não é inibido pelo oxigênio. A esporulação depende de condições adversas do ambiente sendo os esporos muito resistentes (GOMES, 2013).

Um estudo publicado no ano de 1887 por Frankland & Frankland (1887) já relatava a presença de várias espécies de *Bacillus* coletados do ar, entre eles, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. Esse fato é de grande importância, pois essas espécies podem ser contaminantes de vários ambientes e proliferarem-se facilmente, ou formam esporos caso as condições sejam adversas. Estas foram as espécies mais encontradas nas amostras analisadas. O diesel apresenta substâncias tóxicas e recalcitrantes como: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (CRUZ *et al.*, 2012), o que tornaria o combustível um ambiente adverso.

O gênero *Bacillus* abrange mais de 250 espécies e 7 subespécies já catalogadas, sendo que nos últimos anos tem se descoberto muitas outras espécies. Há grande heterogeneidade no gênero, genética e fenotípica, o que levou os especialistas a desmembrarem o gênero em outros como: *Paenibacillus* e *Brevibacillus* (GOMES, 2013).

As espécies do gênero *Bacillus* são classificadas em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio. O grupo I, que é o mais importante neste estudo, pois a ele pertencem as espécies de bactérias encontradas nas amostras de diesel, é formado por bacilos Gram positivos, apresentam esporo central ou terminal; esféricos ou ovóides; não deformam a célula. Esse é subdividido em outros dois subgrupos (GOMES, 2013): grupo Ia e Ib.

O grupo Ia é constituído de bacilos de diâmetro superior a 1 μm , e que produzem o polímero poli- β -hidroxibutirato (PHB): *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* (GOMES, 2013) e *B. toyonensis* (JIMENEZ, 2013).

O grupo Ib constituído de bacilos com diâmetro inferior a 1 μm e não são capazes de produzir poli- β -hidroxibutirato (PHB): *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens* (GOMES, 2013).

O polihidroxibutirato é armazenado no interior celular, e pode servir como reserva de carbono, bem como fonte de energia, podendo representar até 90% de seu peso seco (AGUIAR, 2012).

Algumas espécies como *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. subtilis*, além de serem aeróbios facultativos, tem a propriedade de formar capsulas de polímeros de ácido glutâmico (GOMES, 2013). A cápsula contém água, o que protege a bactéria da desidratação, protege contra os ataques de bacteriófagos e da maioria dos materiais hidrofóbicos: como detergentes, e ajuda na aderência das bactérias (INGRAHAM *et al.*, 2011)

Certas espécies do gênero *Bacillus* produzem esporos que são hidrófobicos, como o *Bacillus cereus*, o que facilita a sua aderência em diversos materiais e favorece a resistência aos procedimentos de limpeza (GOMES, 2013).

Além disso, a presença de nutrientes como nitrogênio e fósforo é importante no processo de degradação, pois as bactérias os utilizam nas atividades biodegradativas (SAWADOGO *et al.*, 2015).

1.6. ANÁLISE QUÍMICA

Existem poucos trabalhos na literatura científica sobre o processo de degradação química, durante o armazenamento, do diesel, biodiesel e suas misturas. Nesse sentido, este projeto também tinha como objetivo monitorar a degradação dos principais constituintes da mistura diesel+biodiesel utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC). Esta parte do projeto foi realizada pela Analista Patrícia Kalil da Embrapa Agroenergia.

1.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

O estudo da diversidade microbiana do diesel e biodiesel trará um grande ganho para qualidade desses dois combustíveis tão importantes no transporte brasileiro. Várias técnicas estão disponíveis para análise da diversidade microbiana de um determinado ambiente ou amostra. O cultivo direto é um método clássico utilizado na microbiologia. Embora ele tenha a limitação de não acessar os microrganismos não cultiváveis, ele tem a vantagem de permitir que os cultiváveis sejam amplamente estudados, principalmente quando se trata de vias metabólicas. A via metabólica é constituída de uma série de reações catalisadas enzimaticamente, onde um precursor é convertido em outro produto (LEHNINGER, 2014). No estudo de degradação do biodiesel e diesel isso se torna particularmente importante, devido à conexão que deve ser feita entre diversidade de microrganismos, degradação e alterações da composição química destes combustíveis.

Para a identificação molecular desses microrganismos cultiváveis faz-se a utilização de regiões de genes codificadores de rRNA. Estes genes apresentam áreas variáveis e conservadas de uma bactéria para outra, portanto podem ser utilizadas para identificação de microrganismos. Esta disposição do DNA permite que estas sequências sejam amplificadas pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR- vide próxima seção) e depois, sequenciados. As sequências escolhidas para identificação podem ser funcionais, que codificam proteínas, mas as

regiões mais usadas para análises são as que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA para populações de bactérias e 18S rRNA e regiões espaçadoras internas (ITS – internal transcribed spacer) para fungos. A escolha dessas regiões são ideais por serem conservadas entre todas as bactérias ou fungos, facilitando o alinhamento das sequências durante a etapa de comparação (PROSSER, 2002). Estas sequências são analisadas com softwares para fazer alinhamentos com bancos de dados e árvores filogenéticas, identificado-se assim o microrganismo.

1.7.1. PCR- POLYMERASE CHAIN REACTION

A partir da década de 80, as técnicas moleculares começaram a ser utilizadas como uma alternativa aos métodos fenotípicos, tradicionalmente, utilizados na microbiologia celular clássica. Esta substituição foi acelerada com a descoberta da reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction – PCR) (GANDRA *et al.*, 2008).

A PCR é uma técnica altamente sensível, onde são obtidas milhões de cópias de sequências de ácidos nucleicos, por meio de uma reação enzimática, partir de diminutas quantidades de sequências de DNA. Esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (GANDRA *et al.*, 2008).

1.7.2. 16S rDNA

A análise da estrutura de procariotos utilizando as informações do gene que codifica a subunidade do ribossomo 16S(16S rDNA) tem se sido cada vez mais utilizada. Primeiramente por que sua estrutura com regiões altamente conservadas intercaladas com regiões variáveis o que permite o desenvolvimento de *primers*, assim como a disponibilidade de grande quantidade de sequências desse gene em

bancos de dados, possibilitando a comparação de clones com sequências de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis (GARCIA-MARTINEZ *et al*, 1999).

Com o uso generalizado de PCR e sequenciamento de DNA na última década foi possível identificar de forma precisa isolados bacterianos e auxiliou na descoberta de novas bactérias em laboratórios de microbiologia. A amplificação da sequência 16S rDNA na PCR tem desempenhado um papel fundamental nesse processo, uma vez que permite a identificação de bactérias, a descoberta de novos gêneros de bactérias e espécies e a detecção de bactérias incultiváveis (WOO *et al.*, 2008).

Porém a identificação pode chegar apenas a uma provável espécie. Avanços nessa área têm mostrado a importância do estudo de outros genes para confirmação dos resultados.

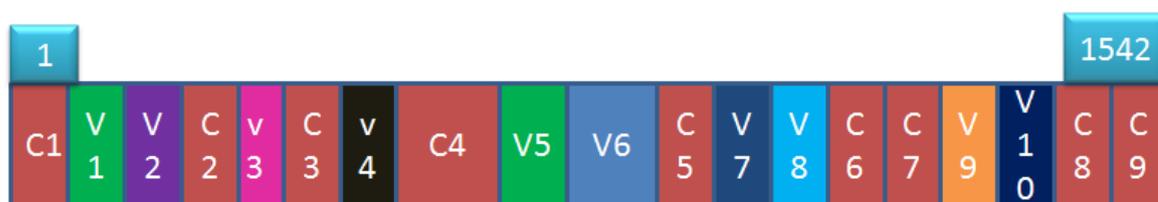


Figura 2: Representação esquemática do gene que codifica para RNA ribossômico 16S. As áreas em lilás (C1 a C9) representam domínios conservados e as outras áreas (V1 a V9) representam regiões variáveis. Figura adaptada de (PETROSINO *et al.*, 2009).

1.7.3. ITS1 e ITS4 rDNA

A identificação taxonômica de fungos pode ser baseada em sequências de DNA da subunidade menor do ribosso eucarioto, o 18S. O espaçador interno transcrito, ITS, que separa o gene que codifica a subunidade 18S do gene que codifica a subunidade 28S do RNA ribossômico pode ser utilizado para identificar fungos em nível de gênero ou espécie (O'BRIEN *et al.*, 2005)

Segundo Gardes e Bruns (1993), algumas características tornam o ITS uma região conveniente para a identificação molecular de fungos. A região possui entre 600 a 800 pares de base, podendo ser rapidamente amplificada com *primers* universais e o gene que codifica o RNA ribossomal possui diversas cópias, de maneira que pode ser amplificada a partir de amostras com poucas quantidades de DNA.

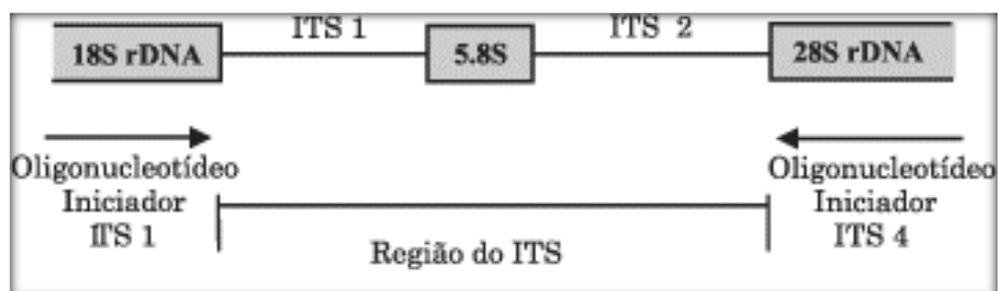


Figura 3: Representação esquemática das regiões do RNA ribossômico utilizadas para identificação dos fungos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para estudo da região do ITS (LUPATINI *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é analisar os potenciais contaminantes das amostras de diesel S500 e de diesel S500 + B7 (7% de biodiesel) em condições que mimetizam o armazenamento em diferentes tempos de estocagem (0 e 60 dias).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de bactérias e fungos contaminantes de biodiesel e diesel, utilizando técnicas de cultivo de microbiologia clássica.
- Estabelecer uma coleção de bactérias e fungos contaminantes do diesel/biodiesel;
- Utilizar sequência do gene 16S rRNA para identificar o grupo filogenético que as bactérias isoladas pertencem.
- Utilizar sequência do gene ITS4 rRNA para identificar o grupo filogenético a que os fungos isolados pertencem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS

Os combustíveis armazenados foram o óleo diesel A S500, coletado em uma distribuidora localizada em Brasília (DF), 19/08/2015, e o óleo B S500, coletado em posto revendedor de combustível, 20/08/2015. As amostras do óleo diesel foram subdivididas em 2 tipos: amostras do óleo diesel sem armazenamento, ou seja, tempo 0 dias, e amostras do óleo diesel armazenado por 60 dias em tanques que simulam os tanques de armazenamento, conforme figura 4. Os tanques são feitos a partir de aço liga e possuem uma válvula de alívio e vácuo. Esses tanques, nas distribuidoras são atmosféricos e nos postos de combustíveis ficam enterrados.



Figura 4: Foto do armazenamento do óleo Diesel S500 A e B nos tanques.

3.2. FILTRAGEM DOS COMBUSTÍVEIS

O método de filtração para obtenção dos microrganismos foi o mesmo para todos os combustíveis (Standard Practice for Enumeration of Viable Bacteria and Fungi in Liquid Fuels - Filtration and Culture Procedures. American Society for Testing and Materials, ASTM D6974 – 09, 2012). Três volumes foram filtrados (2 mL, 20 mL e 200 mL) utilizando-se filtro de 0,22 μm , da Millipore® (Figura 5). Todas as filtrações foram feitas em triplicata, assim como os cultivos nas placas com o meio padrão.

Com o sistema montado (Figura 6) e a bomba vácuo acoplada e ligada ao sistema de filtração (Nalgene), colocou-se as amostras de diesel A e B na parte superior, nos volumes relatados acima, esperou-se todo o óleo passar pelo filtro e em seguida adicionou-se 10 mL de solução Tween 80 0,1% (v/v). Adicionou-se 30 mL de solução Ringer a 25% (v/v), 2,25 g/L de NaCl, 0,105 g/L de KCl, 0,12 g/L de CaCl₂, 0,05 g/L de NaHCO₃ e água destilada suficiente para completar 1 L).

Com uma pinça estéril, o filtro foi colocado em placas de Petri com meio de cultivo TSA (composto por tripitona e peptona de soja) utilizado para o cultivo de bactérias, e com meio de cultivo MEA (composto por maltose, dextina, glicerol e peptona) utilizado para o cultivo dos fungos. O lado do filtro que estava exposto ao combustível foi colocado em contato com o meio de cultura.

Alguns cuidados foram tomados no momento da filtração para manter a esterilidade do processo, a segurança das pessoas e a integridade do local, tendo em vista o trabalho com combustíveis inflamáveis altamente voláteis. Todo o processo foi realizado dentro do fluxo laminar. Máscaras foram usadas para não se respirar o combustível, luvas e jaleco adequados (EPI, equipamento de proteção individual), a manipulação dos combustíveis foi realizada em local ventilado e afastado de outros prédios, nenhum equipamento ou acessório que provocasse faísca foi manuseado durante o experimento.



Figura 5 - Execução da filtração de 200 mL do combustível diesel S500 com o auxílio do sistema de filtração (Nalgene).



Figura 6- Manipulação do filtro de 0,22 µm de 47mm.

3.3. CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

De acordo com a recomendação da American Society for Testing and Materials (ASTM), os microrganismos foram cultivados em meio de cultura: Tryptone Soy Agar (TSA) [triptona 15 g/L, soja enzimaticamente digerida 5 g/L, NaCl 5 g/L e ágar 15 g/L] para o isolamento das bactérias e Malt Extract Agar (MEA) [extrato de malte 20 g/L, peptona 1 g/L, ágar 15 g/L e dextrose 20 g/L] para o isolamento dos fungos. Os meios de cultura foram autoclavados a 120°C, 1 atm. de pressão, por 20 minutos, com o objetivo de obter-se um material estéril. Ao meio TSA foi adicionado o fungicida Benlate (200 µg/mL) para evitar o crescimento de fungos e facilitar o isolamento da comunidade de bactérias. Ao meio MEA foi adicionado o antibiótico tetraciclina (100 µg/mL) para evitar o crescimento de bactérias e facilitar o isolamento de fungos.

Os microrganismos inoculados no meio de cultura TSA foram incubados a 28°C em estufa de crescimento e os inoculados no meio de cultura MEA foram incubados a 25°C em estufa de crescimento.

O número de microrganismos isolados é o número total que se conseguiu cultivar nos meios padrões após a filtragem e não o total de microrganismos presentes nos filtros.

3.4. PRESERVAÇÃO

As bactérias inoculadas no meio de cultura TSA foram incubadas a 28°C em estufa de crescimento. Depois de crescidas, foram isoladas e incubadas *overnight* por cerca de 16h, as bactérias foram armazenadas em criotubos em freezer à temperatura de -80°C com glicerol 30%.

A solução de glicerol 30% em água destilada e distribuída entre 600-700µL com uma micropipeta nos microtubos de 2 mL. A solução foi esterilizada previamente em autoclave à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm. e distribuída nos recipientes já estéreis. No fluxo laminar as amostras de bactérias foram raspadas da placa com a ajuda de um palito e colocadas nos tubos.

Os fungos inoculados no meio de cultura MEA foram incubados a 25°C em estufa de crescimento. Depois de crescidos, foram isolados e incubados *overnight* por cerca de 16h, depois foram armazenados usando-se o método de Castellani.

Em fluxo laminar (exaustor desligado e lamparina acesa), o micélio foi cortado com a extremidade larga das ponteiros P1000, conforme a figura 7. Com o auxílio de palitos de madeira, os discos com uma pequena porção do meio de cultura (aproximadamente 5 mm x 10 mm) foram transferidos para os tubos contendo água destilada esterilizada. O volume final atingido pela água e os discos de micélio não ultrapassou 70% da capacidade do tubo (CASTELLANI, 1939).

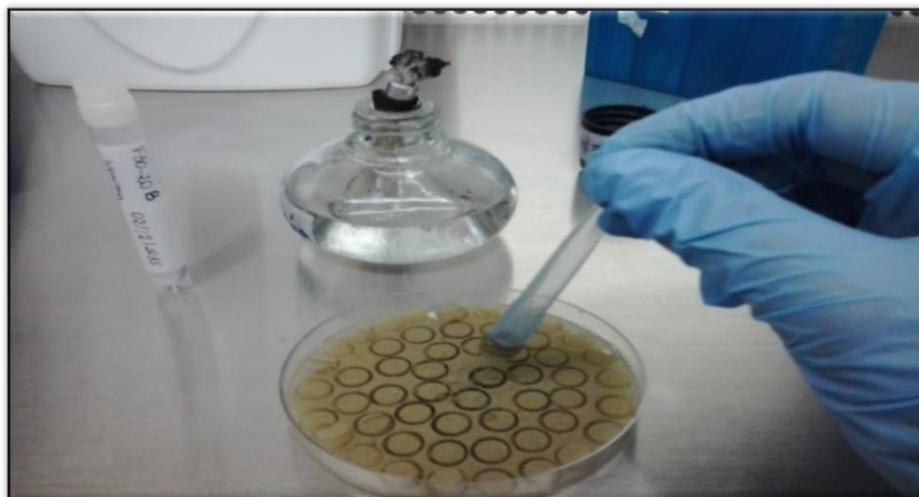


Figura 7- Corte de meio de cultura com micélio em discos para estoque em água.

3.5. CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

3.5.1. CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO

As amostras que estavam preservadas foram cultivadas em placas de Petri, com o mesmo meio utilizado inicialmente. O cultivo foi feito para constatar o isolamento, ou seja, o aparecimento de apenas um tipo de colônia na placa. Aqueles microrganismos isolados foram então crescidos em meio líquido. Fotos das bactérias e fungos nas placas de Petri podem ser vistas nos anexos: 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

3.5.2. CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO

Utilizando as amostras obtidas na etapa de crescimento em meio sólido, a fim de se obter biomassa suficiente para extração do DNA, foi feito o cultivo em meio líquido. As bactérias armazenadas no freezer a -80°C e os fungos armazenados em água destilada foram inoculadas em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio TSB (Tryptone Soy) e MEB (Malt Extract Broth Base), respectivamente. As

bactérias foram incubadas durante 16h em temperatura de 28°C e rotação de 200 RPM e os fungos forma incubados por uma semana a 25°C e rotação de 180 RPM.

3.6. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

3.6.1. BACTÉRIAS

As bactérias que cresceram em meio líquido foram centrifugadas a 3000 g e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido 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® “an Illumina Company”, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram tratadas com 1 µl de RNase [10 µg/µl] e incubadas na estufa por 1 h a 37°C.

3.6.2. FUNGOS

Os fungos, que cresceram em meio líquido, foram pressionados na parede do tubo Falcon com ajuda de uma espátula para o descarte do sobrenadante. Depois adicionou-se água destilada estéril para a lavagem dos fungos e retirada do excesso de meio. Após a retirada da água, o pellet foi pressionado contra a parede do tubo novamente para conseguir retirar o máximo de água. Os fungos foram colocados em envelopes de papel alumínio, identificados e posteriormente congelados a -20°C. Depois de alguns dias no freezer, os fungos foram retirados e macerados para facilitar a extração do DNA.

O micélio congelado em nitrogênio líquido foi triturado com almofariz de porcelana esterilizado. Isso foi feito com o almofariz dentro de um isopor com nitrogênio, para que o almofariz ficasse bem gelado. O macerado foi transferido com auxílio de espátula estéril para microtubos de 2 mL esterilizados contendo 1 mL do tampão de extração do Kit *MasterPure™*. O microtubo foi incubado no gelo, em caixa de isopor. O mesmo procedimento foi feito para cada linhagem. Foi colocado 100 mg de micélio triturado para cada 1 mL do tampão de extração. Os macerados foram guardados com tampão no ultrafreezer -80°C para extração em outro dia. Foi feita duplicata de cada linhagem (dois tubos de cada fungo).

Para a extração do DNA foi utilizado o mesmo Kit *MasterPure™ DNA Purification Kit* (Epicentre® “an Illumina Company”, Madison, WI, EUA) da extração de DNA das bactérias e seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram tratadas com 1 µl de RNase [10 µg/ µl] e incubadas na estufa por 1 h a 37°C.

3.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.7.1. DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS

O DNA genômico das bactérias foi utilizado para a amplificação do gene 16S do rRNA por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A PCR permite amplificar o mesmo fragmento de DNA milhares de vezes. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes parâmetros no equipamento termociclador, que varia as temperaturas de acordo com cada etapa: desnaturação do DNA (95 °C por 3 min e 30 ciclos de 94 °C por 30 s), Anelamento (52 °C por 30 s), Extensão (72 °C por 1 min e 40 s), e um ciclo para Extensão final de 72 °C por 7 min. Cada reação de 50 µL continha: 1 a 20 ng de DNA total, 0,3 µM de cada *primer* 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) e o 1492R (CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT) (GARCIA-MARTINEZ *et al*, 1999), 0,3 µM de dNTP(BIORON), 1,5U da enzima Taq Polimerase (Phoneutra), 1X tampão.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit* (Thermo-Scientific). Em seguida, estes fragmentos de DNA foram sequenciados pela empresa Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda. (Indaiatuba, SP), em um sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) que utiliza o método Sanger.

3.7.2. DNA GENÔMICO DE FUNGOS

O DNA genômico dos fungos foi utilizado para a amplificação dos genes da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rRNA por meio de PCR. A PCR permite amplificar o mesmo fragmento de DNA milhares de vezes. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes parâmetros no termociclador, que varia as temperaturas de acordo com cada etapa: desnaturação do DNA (95 °C por 4 min e

35 ciclos de 94 °C por 30 s), anelamento (55 °C por 30 s), extensão (72 °C por 1 min e 30 s), e um ciclo para Extensão final de 72 °C por 10 min. Cada reação de 50 µL continha: 1 a 20 ng de DNA total, 0,8 µM de cada *primer* (ITS1F e ITS4R), 0,2 µM de dNTPs [25 mM], 0,3 µl (1,5U) GoTaq Hot Start Polimerase (Promega), GoTaq Flexi Buffer (Promega) 1X , 3,7 mM MgCl₂ (Promega) e 0,4 ng/µl de BSA (Bovine Serum Albumin).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit* (Thermo-Scientific). Em seguida, estes fragmentos de DNA foram sequenciados pela empresa Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda. (INDAIATUBA/SP), em um sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) que utiliza o método Sanger.

3.7.3. ANÁLISE DOS DADOS UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Os dados de sequenciamento gerados pela empresa Eurofins foram trabalhados no programa Geneious versão (9.1.3) (<https://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). As sequências foram analisadas uma por uma para descarte dos nucleotídeos das extremidades com baixa qualidade. Logo depois, essas foram pareadas para formação dos contigs. Os contigs formados foram utilizados para fazer o alinhamento no Geneious, utilizando a ferramenta Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation, MUSCLE (Edgar, C., 2004).

O arquivo gerado pelo alinhamento foi importado para o programa MEGA 5 versão (5.10). As análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando este programa a partir do método *General time reversible mode* com 1000 *Bootstrap* e o modelo de árvore filogenética Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) (Tamura *et al.*, 2011).

Para a identificação dos isolados, os contigs foram utilizados para buscar microrganismos semelhantes nos bancos de sequências. O banco de dados utilizado para identificação das bactérias foi o Ribosomal Database Project, RDP (Cole, *et al.*, 2014). Já para identificar fungos, foram utilizados quatro bancos: nucleotide collection nr/nt, do National Center for Biotechnology Information, NCBI Blast (Zhang, Z. *et al.*, 2000; Morgulis, A. *et al.*, 2008), SILVA rRNA database project

(Quast, C. *et al*, 2013), Mycobank (Robert, V. *et al*, 2005) e o RDP (Cole, *et al.*, 2014).

3.8. ANÁLISE QUÍMICA

Para o monitoramento da estabilidade química do diesel A e diesel B S500, foram realizadas análises na amostra recém-coletada (ponto 0) e ao longo da estocagem (30, 60 e 90 dias).

A amostra foi diluída em *vial* de 1,5 mL, na proporção de 25 µL dos combustíveis para 975 µL de solução de nonadecanoato de metila (padrão interno) a 400 µg/mL em heptano.

Análises cromatográficas: as análises cromatográficas foram realizadas nos seguintes equipamentos: CG-MS QP 2010 (Shimadzu) e CG-DIC 7890A (Agilent). Utilizou-se a coluna Rtx-5 (30 m x 0,25 mm x 0.25 µm). As condições analíticas do CG-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. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização de impacto de elétrons (EI) a 70 eV.

As condições analíticas utilizadas no CG-DIC foram similares ao CG-MS, exceto pela temperatura final da rampa do forno, que foi ajustada em 320 °C, mesma temperatura empregada no detector DIC. O nonadecanoato de metila foi utilizado para padronização interna das áreas dos picos referentes aos compostos de interesse identificados na amostra.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4. RESULTADOS

As amostras dos combustíveis estudados receberam os nomes de LGB 25 e LGB 34 para o controle e armazenamento destas dentro do laboratório. Esse número é sequencial, conforme as amostras são geradas dentro de um ano. O combustível diesel A S500 (LGB 25) e o diesel B S500 (LGB 34). Neste trabalho cada bactéria e fungo isolados receberam um número sequencial com B1 ou F1, respectivamente, seguido do volume de filtragem.

Foram isolados da amostra de diesel A (LGB25) sem armazenamento 10 bactérias e 22 fungos, e com 60 dias de armazenamento foram isolados 40 bactérias e 13 fungos. Da amostra de diesel B (LGB 34) sem armazenamento foram isolados 25 bactérias e 4 fungos, e com 60 dias de armazenamento foram isolados 20 bactérias e 9 fungos, conforme figura 8 abaixo.

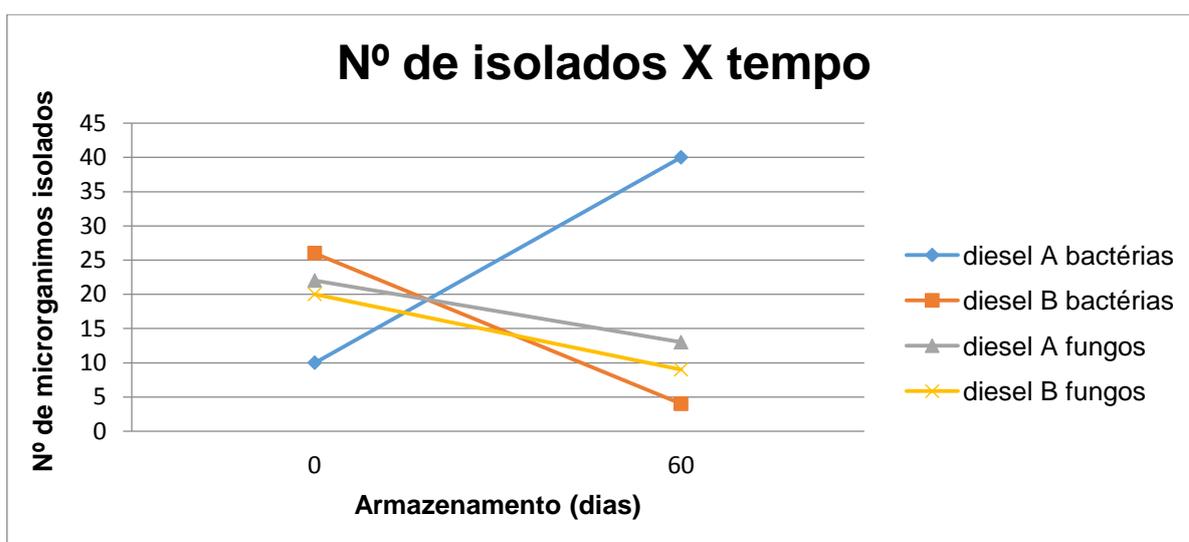


Figura 8: Gráfico contendo o número de bactérias e fungos isolados dos dieséis A e B nos tempos 0 e 60 dias de armazenamento.

O número de microrganismos isolados é o número total que se conseguiu cultivar nos meios padrões após a filtragem e não o total de microrganismos presentes nos filtros.

Os microrganismos foram isolados a partir de todos os volumes filtrados, mas a proporção do nº de isolados não correspondeu ao aumento do volume de filtragem. O nº de isolados deveria ter subido aproximadamente 10X de um volume para o outro. E na amostra de diesel B com 60 dias de armazenamento não houve microrganismos isolados no volume de filtragem de 2 mL, conforme figura 9 abaixo.

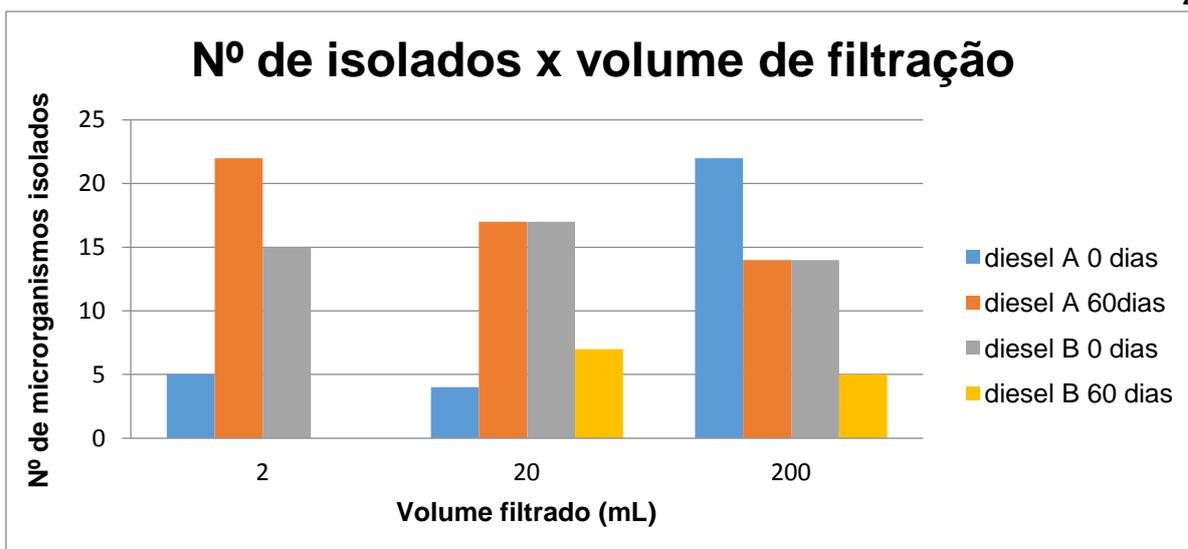


Figura 9: Gráfico contendo o total de microrganismos isolados dos diesel A e B nos tempos 0 e 60 dias de armazenamento de acordo com o volume de filtração.

4.1. BACTÉRIAS

Nas amostras de diesel A S500 0 dias e 60 dias de armazenamento (LGB 25) foram isoladas 10 e 40 bactérias, respectivamente. Do Diesel A sem armazenamento (0 dias) foi possível sequenciar e identificar 5 bactérias e do diesel A com 60 dias de armazenamento foram sequenciadas e identificadas 36 bactérias, conforme anexos 7 e 8. Algumas microrganismos não conseguiu-se isolar e outros não cresceram após a preservação.

Nas amostras de diesel B S500 0 dias e 60 dias de armazenamento (LGB 34) foram isoladas 25 e 4 bactérias, respectivamente. Do diesel B sem armazenamento (0 dias) conseguiu-se sequenciar e identificar 18 bactérias e no diesel com 60 dias de armazenamento foram sequenciadas e identificadas 3 bactérias, conforme anexos 9 e 10.

O sequenciamento dos fragmentos de DNA das bactérias do diesel A e diesel B S500 ficaram com boa qualidade sendo possível obter a sequência quase que completa do gene usando-se os primers *Forward* e *Reverse* formando uma contig para todas as amostras. Entre as 6 sequências do diesel A não armazenado (LGB 25 0 dias), uma amostra apresentou baixa qualidade no sequenciamento e por isso não foi possível obter o contig. Para obter o contig as duas fitas têm que ter no mínimo 750 pares de base, então, quando a sequência apresenta um número menor

de nucleotídeos, não é possível montá-lo. O mesmo aconteceu com a amostra LGB 34 60 dias B4-200.

Foi possível identificar duas famílias de bactérias na amostra LGB 25 0 dias, Paenibacillaceae e Bacillaceae e dois gêneros, *Paenibacillus* e *Bacillus*, conforme árvore filogenética na Figura 10 abaixo e anexo 7.

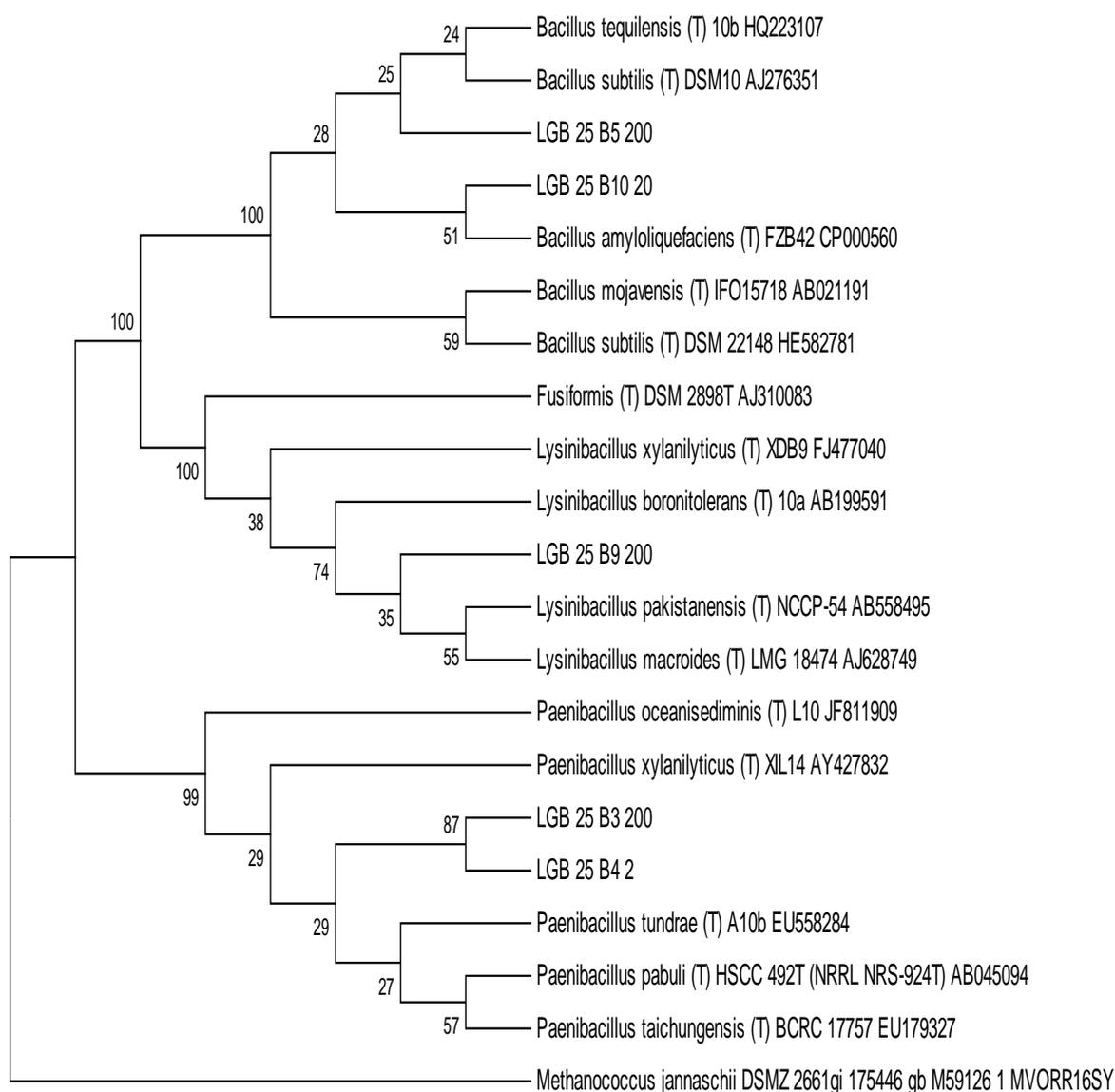


Figura 10- Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias isoladas da amostra de diesel A sem armazenamento (LGB 25) e dados do banco de dados RDP, conforme anexo 7. Como *outgroup* foi utilizada a arqueia *Methanococcus jannaschii*.

Da amostra LGB 25 60 dias foram identificadas dois filos diferentes Firmicutes e Actinobacteria, e dois gêneros: *Janibacter* e *Bacillus* e não foram identificadas bactérias da família Paenibacillaceae após o armazenamento, conforme Figura 11 abaixo e anexo 8.

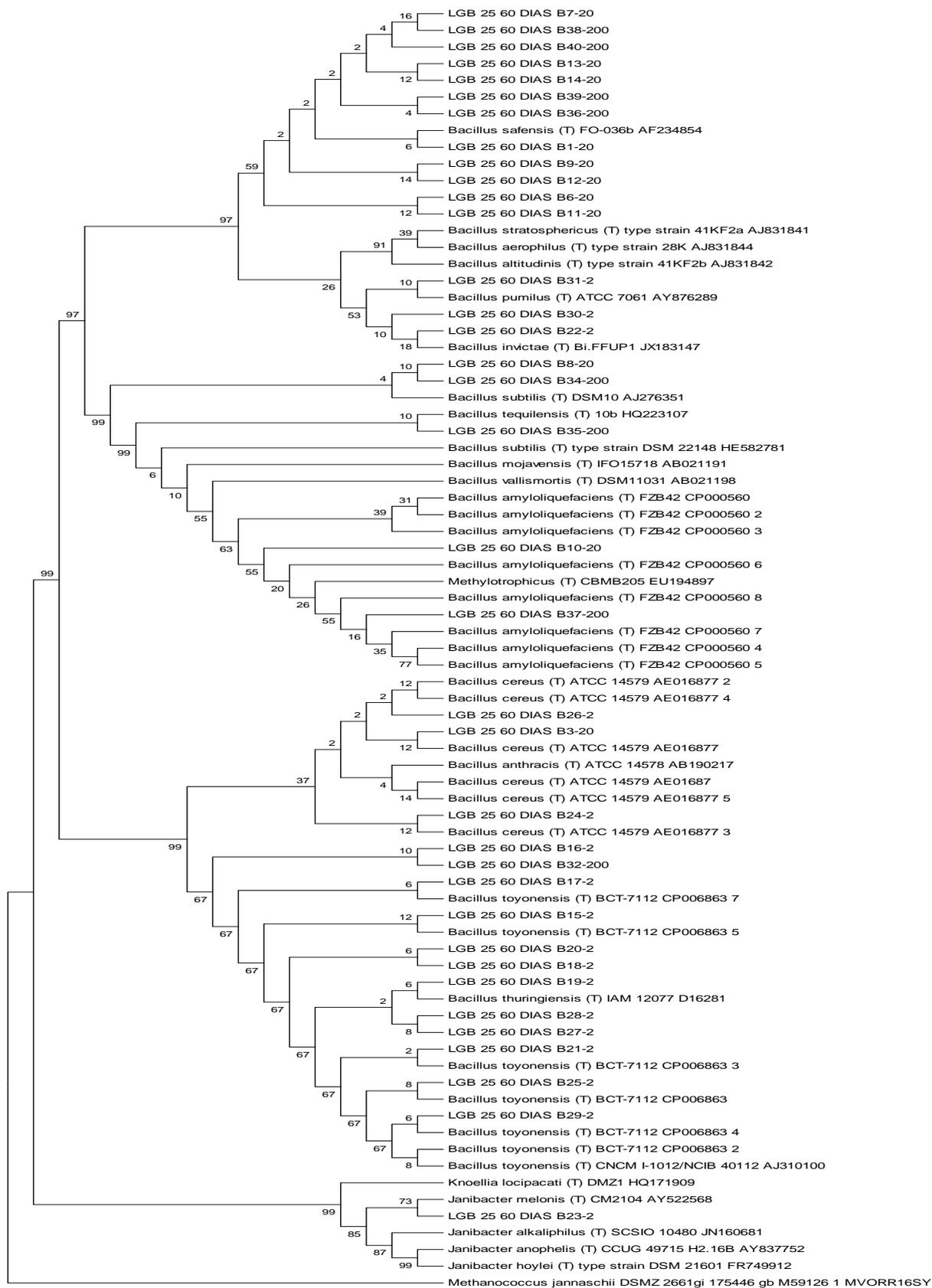


Figura 11- Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias isoladas da amostra de diesel A 60 dias de armazenamento (LGB 25) dados do banco de dados RDP, conforme anexo 8. Como *outgroup* foi utilizada a arqueia *Methanococcus jannaschii*.

A amostra LGB 34 0 dias apresentou apenas a família Bacillaceae e o gênero *Bacillus*, conforme Figura 12 abaixo e anexo 9.

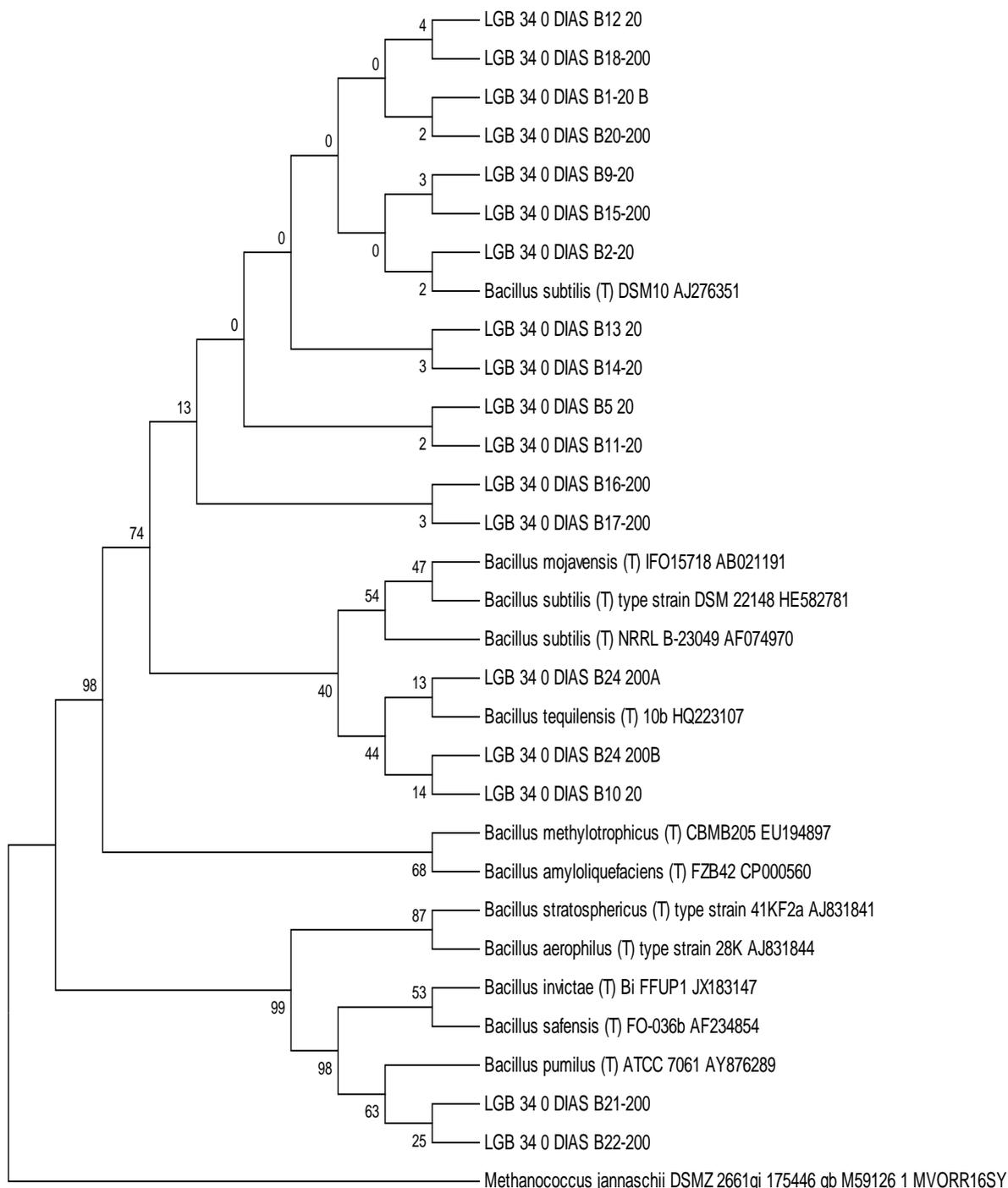


Figura 12- Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias isoladas da amostra de diesel B sem armazenamento (LGB 34) e dados do banco de dados RDP, conforme anexo 9. Como *outgroup* foi utilizada a arqueia *Methanococcus jannaschii*.

A amostra LGB 34 armazenada por 60 dias foi possível isolar apenas uma família Bacillaceae e um gênero *Bacillus*, conforme figura 13 abaixo e anexo 10.

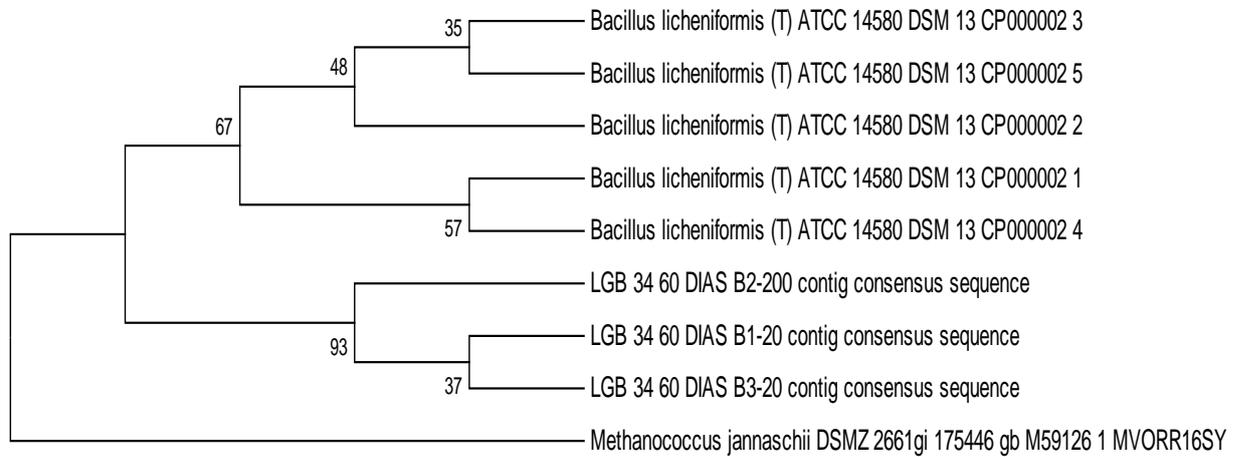
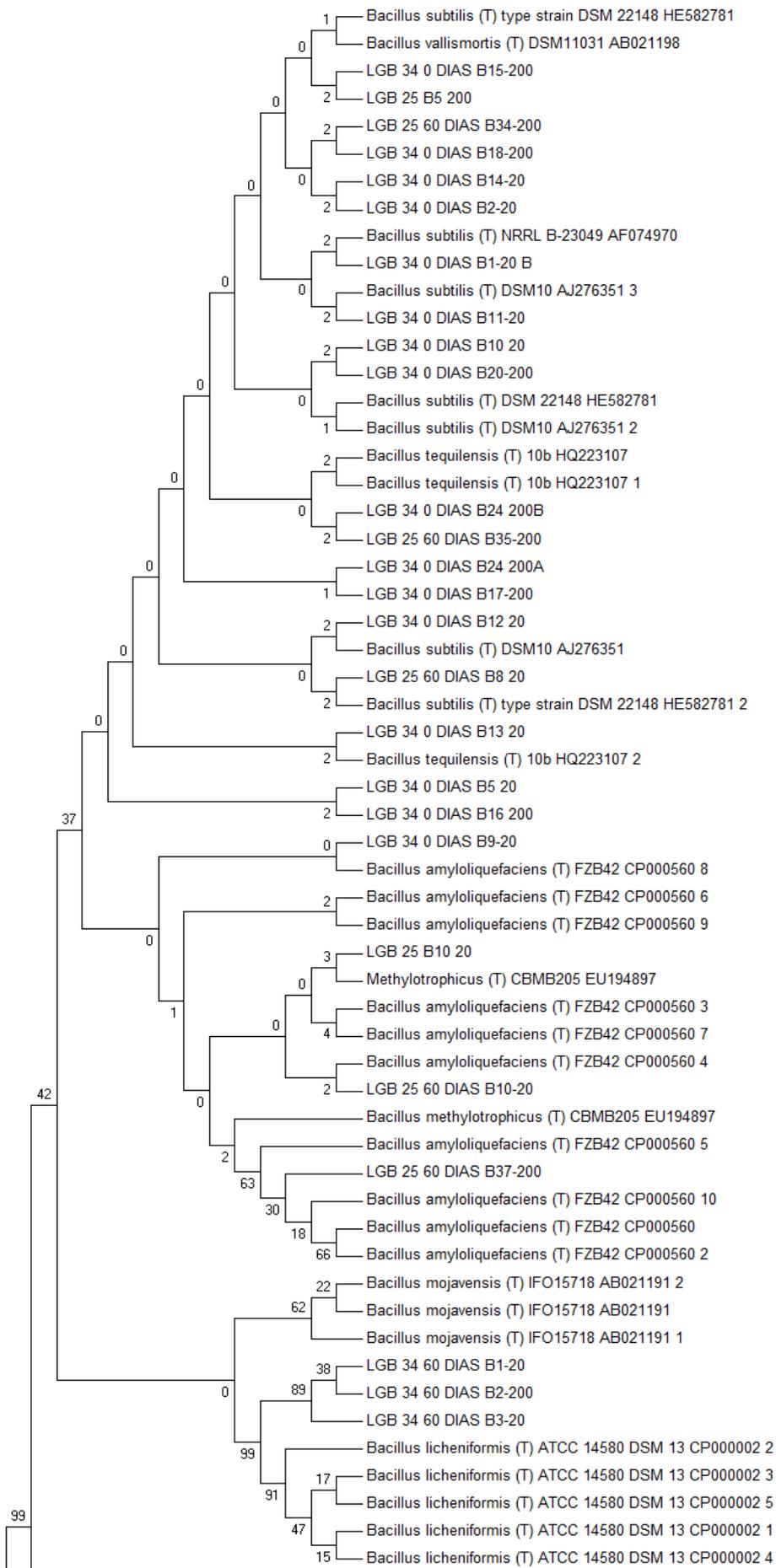


Figura 13- Árvore filogenética obtida a partir das sequências do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias isoladas da amostra de diesel B com 60 dias de armazenamento (LGB 34) e dados do banco de dados RDP, conforme anexo 10. Como *outgroup* foi utilizada a arqueia *Methanococcus jannaschii*.

Para comparação das bactérias isoladas nas duas amostras de diesel A e B S500 com 0 e 60 dias de armazenamento, estas foram relacionadas na mesma árvore filogenética Figura 14 abaixo.



Entre as amostras isoladas do diesel A (LGB 25) e diesel B (LGB 34) S500, antes da armazenagem e após os 60 dias, a maioria dos indivíduos são *Bacillus sp*, conforme tabelas 1 e 2 abaixo:

Bactérias isoladas do diesel A de acordo com banco de genes RDP:	
0 dias	60 dias
2 <i>Paenibacillus taichungensis</i> (T)	12 <i>Bacillus safensis</i>
1 <i>Lysinibacillus macroides</i> (T)	11 <i>Bacillus toyonensis</i> (T)
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> (T)
	1 <i>Bacillus anthracis</i> (T)
	1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)

Tabela 1: relação das bactérias isoladas da amostra de diesel A S500 0 e 60 dias de armazenagem em nível de gênero suas possíveis espécies.

Bactérias isoladas do diesel B de acordo com o banco de genes RDP	
0 dias	60 dias
13 <i>Bacillus subtilis</i>	3 <i>Bacillus licheniformis</i> (T)
3 <i>Bacillus tequilensis</i> (T)	
2 <i>Bacillus pumilus</i> (T)	

Tabela 2: relação das bactérias isoladas da amostra de diesel B S500 0 e 60 dias de armazenagem em nível de gênero suas possíveis espécies.

Na amostra de diesel A (LGB 25), que apresentou possível degradação, houve o aumento do número de isolados ao longo do tempo de armazenagem, enquanto que na amostra de diesel B S500 (LGB 34) diminuiu o número de isolados e não houve degradação, conforme os dados da análise química.

Em relação aos volumes filtrados dos combustíveis, no diesel A (LGB 25) 0 dias, o gênero *Paenibacillus* apareceu no volume de 2 mL e 200 mL, o *Lysinibacillus* apareceu no de 2mL, e o *Bacillus* nos volumes 20 e 200mL. Na mesma amostra com 60 dias de armazenagem apareceu o gênero *Janibacter* no volume de 2mL e o *Bacillus* em todos os volumes. Na amostra de diesel B (LGB 34), 0 e 60 dias, no

volume de 2 mL não apareceu nenhuma bactéria enquanto que nos volumes de 20 e 200mL foi identificado apenas o gênero *Bacillus*.

A comunidade bacteriana foi semelhante nas amostras analisadas em nível de gênero, e possivelmente diferentes em nível de espécies. Em algumas amostras apareceram bactérias que não apareceram nas outras amostras. A *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* foram encontradas nas amostras de diesel A e B e o *B. subtilis* só não aparece na de diesel B (LGB 34) com 60 dias de armazenamento. A *B. pumilus* foi identificada nas amostras de diesel A (LGB 25) 60 dias e no diesel B (LGB 34) 0 dias. Os gêneros *Paenibacillus* e *Lysinibacillus* só apareceram na amostra de diesel A (LGB 25) 0 dias.

4.2. FUNGOS

Nas amostras de diesel A S500 sem armazenamento e 60 dias de armazenamento foram isolados 22 e 13 fungos, respectivamente, conforme anexo 5. Do diesel A sem armazenamento (0 dias) conseguiu-se sequenciar e identificar 19 isolados e no diesel A com 60 dias de armazenamento não foram sequenciadas e identificadas, pois não houve tempo hábil, mas estão armazenadas pelo método Castelanni. Algumas microrganismos não conseguiu-se isolar e outros não cresceram após a preservação.

Nas amostras de Diesel B S500 sem armazenamento e 60 dias de armazenamento foram isolados 20 e 9 fungos, respectivamente, conforme anexo 6. Do Diesel B sem armazenamento conseguiu-se sequenciar e identificar 5 fungos e do diesel com 60 dias de armazenamento não foram sequenciadas e identificadas, pois não houve tempo hábil.

O sequenciamento dos fragmentos DNA dos fungos do Diesel S 500 A e B ficaram com boa qualidade sendo possível obter a sequência quase que completa da região intergenica usando-se os *primers* ITS1 e ITS 4 formando uma única sequência, o contig, de todas as amostras. Das 22 amostras do diesel A não armazenado (LGB 25 0 dias), de 3 não conseguiu-se extrair o DNA e uma amostra, LGB 25 0 dias F8-2, apresentou baixa qualidade no sequenciamento não sendo possível obter o contig e por isso foi utilizado só uma das fitas (ITS4) para a possível

identificação taxonômica. E, dentre as 20 amostras do Diesel B (LGB 34 0 dias), não se conseguiu amplificar o DNA de 15 amostras.

Para análise das sequências foram utilizados os bancos NCBI, Mycobank e SILVA- High quality ribosomal RNA databases, que são bancos de sequencias de DNA. Assim, foi possível inferir a provável identidade das amostras sequenciadas.

Com o software utilizado para comparação com o banco SILVA, a maior identidade das sequências de DNA ribossomal foi de 47,75% e por isso não foi possível chegar a uma identificação precisa dos fungos utilizando este banco.

Na amostra LGB 25 0 dias foram isolados, a partir da comparação dos resultados dos bancos de genes Mycobank e NBCI os prováveis gêneros e espécies de fungos, conforme Tabela 3.

Gêneros de Fungos isolados de acordo com os bancos de genes Mycobank e NBCI	
Diesel A S500 0 dias	Diesel B S500 0 dias
15 <i>Paecilomyces</i> / <i>Byssochlamys</i>	3 <i>Paecilomyces</i> / <i>Byssochlamys</i>
3 <i>Aspergillus fumigatus</i>	1 <i>Aspergillus fumigatus</i>
1 <i>Aspergillus tamaris</i>	1 <i>Aspergillus tamaris</i>

Tabela 3: relação dos fungos isoladas das amostras de diesel A e B S500 0 dias de armazenamento em nível de gênero suas possíveis espécies.

As amostras de diesel A e B S 500 (LGB 25) e (LGB 34) sem armazenamento apresentaram 3 gêneros de fungos prováveis: *Paecilomyces*, *Byssochlamys* e *Aspergillus*, conforme Figuras 15 e 16 e anexos 11 e 12.

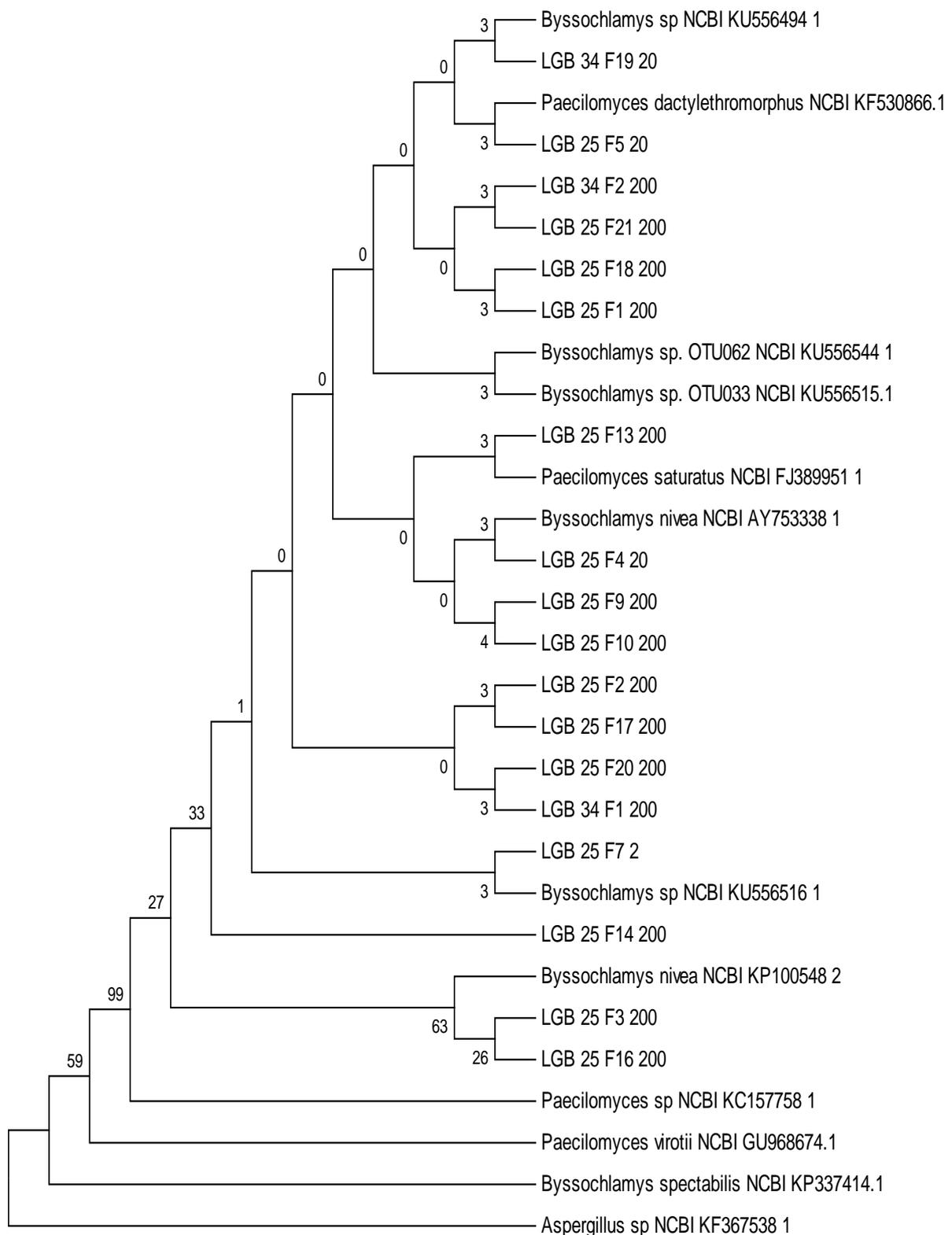


Figura 15- Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região ITS de fungos da amostra de diesel A (LGB 25) e B (LGB 34) sem armazenamento e dados do banco de dados NCBI e Mycobank, conforme anexos 11 e 12. Como *outgroup* foi utilizada o fungo *Aspergillus* sp.

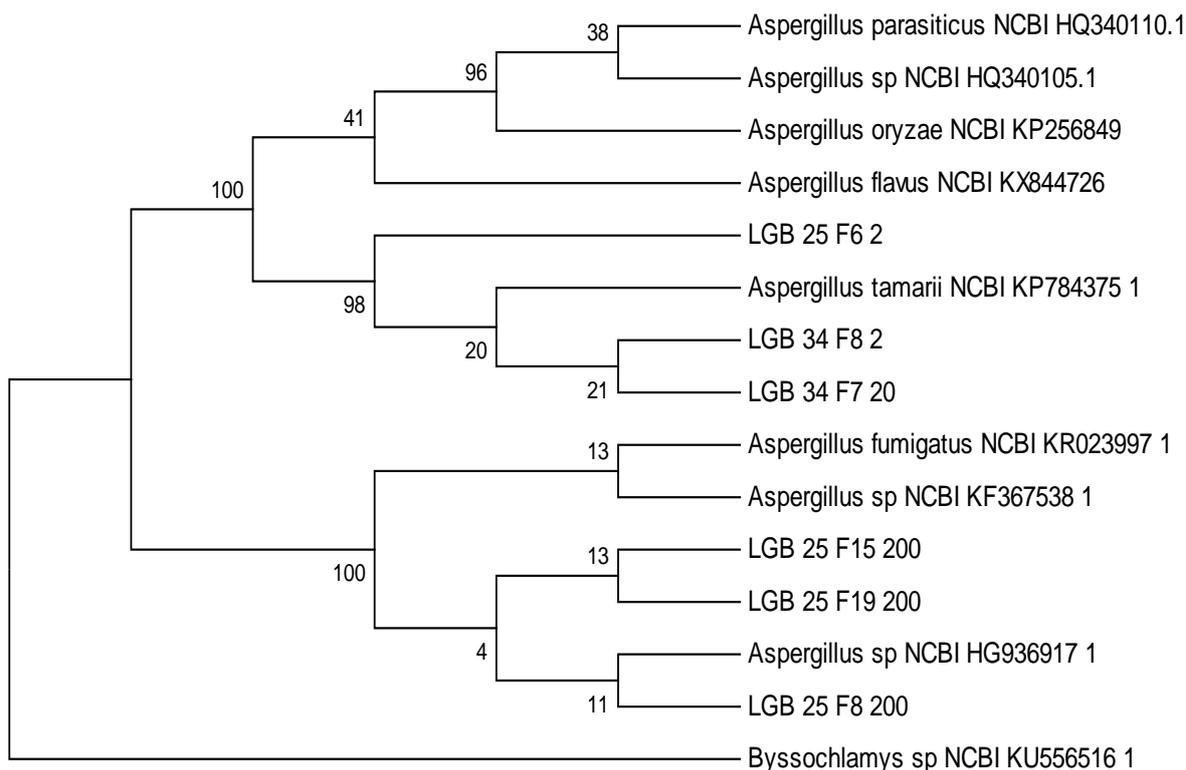


Figura 16- Árvore filogenética obtida a partir das sequências da região ITS de fungos da amostra de diesel A (LGB 25) e B (LGB 34) sem armazenamento dados do banco de dados NCBI e Mycobank, conforme anexos 11 e 12. Como *outgroup* foi utilizada o fungo *Byssochlamys sp.*

Em relação aos volumes filtrados dos combustíveis, na LGB 25 0 dias, os gêneros *Paecilomyces* / *Byssochlamys* apareceram nos volumes de 2 mL, 20 e 200 mL, o *Aspergillus* apareceu nos volumes de 2 e 200mL. Na amostra LGB 34 0 dias os supostos gêneros *Paecilomyces* / *Byssochlamys* apareceram nos volumes de 20 e 200mL e o suposto gênero *Aspergillus* apareceu nos volumes de 2 e 20mL.

A comunidade fungica foi similar nas amostras analisadas. Os gêneros prováveis foram iguais nas duas amostras: *Paecilomyces* / *Byssochlamys* e *Aspergillus*. As espécies prováveis encontradas do genero *Aspergillus* na amostra LGB 25 são o *A. fumigatus* e *A. tamarii* e na LGB 34 é só o *A. tamarii*.

4.3. ANÁLISE QUÍMICA

Para verificar se houve ou não uma possível degradação do combustível diesel A e B S500 (amostra LGB 25 e LGB 34) foi feita análise química, ao longo do tempo de armazenamento, no LQB (Laboratório de Química de Biomassas, Embrapa Agroenergia) como parte do projeto que este estudo faz parte) pela analista Patrícia

Kalil, conforme as Figuras 17 e 18 abaixo. Os dados foram gentilmente cedidos para enriquecimento da discussão. Na análise foram comparadas as substâncias presentes no óleo de com cadeias carbônicas de C15 a C27, pois são as principais em sua composição. Na figura 17 não tivemos o ponto 0 dias por problemas técnicos (a amostra foi toda consumida pelo equipamento).

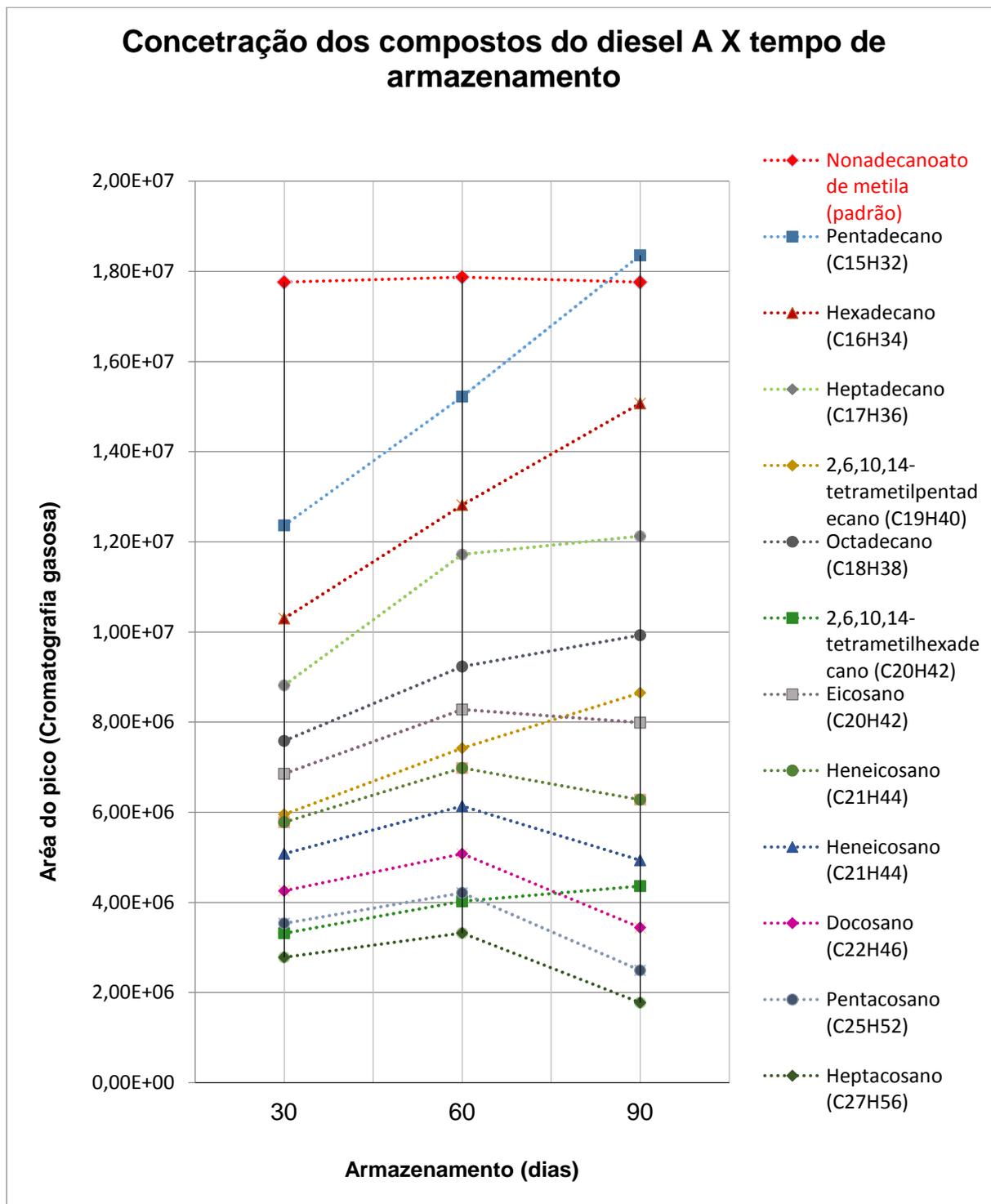


Figura 17: Gráfico com a composição do diesel A S500 com 30, 60 e 90 dias de armazenamento. O composto Nonadecano (em vermelho) foi utilizado como referência.

Comparando os pontos 30, 60 e 90 dias, concluiu-se que o diesel A S500 só apresentou uma possível degradação após 60 dias de estocagem. Os compostos que apresentaram possível degradação são os hidrocarbonetos de cadeia maiores: heneicosano ($C_{21}H_{44}$), docosano ($C_{22}H_{46}$), pentacosano ($C_{25}H_{52}$), heptacosano ($C_{27}H_{56}$).

No diesel B S500 as concentrações dos compostos ficaram praticamente constantes. O aumento da concentração de alguns hidrocarbonetos observados nas Figuras 17 e 18, provavelmente aconteceu por conta da evaporação de compostos de menores cadeias e mais voláteis elevando a concentração dos outros compostos.

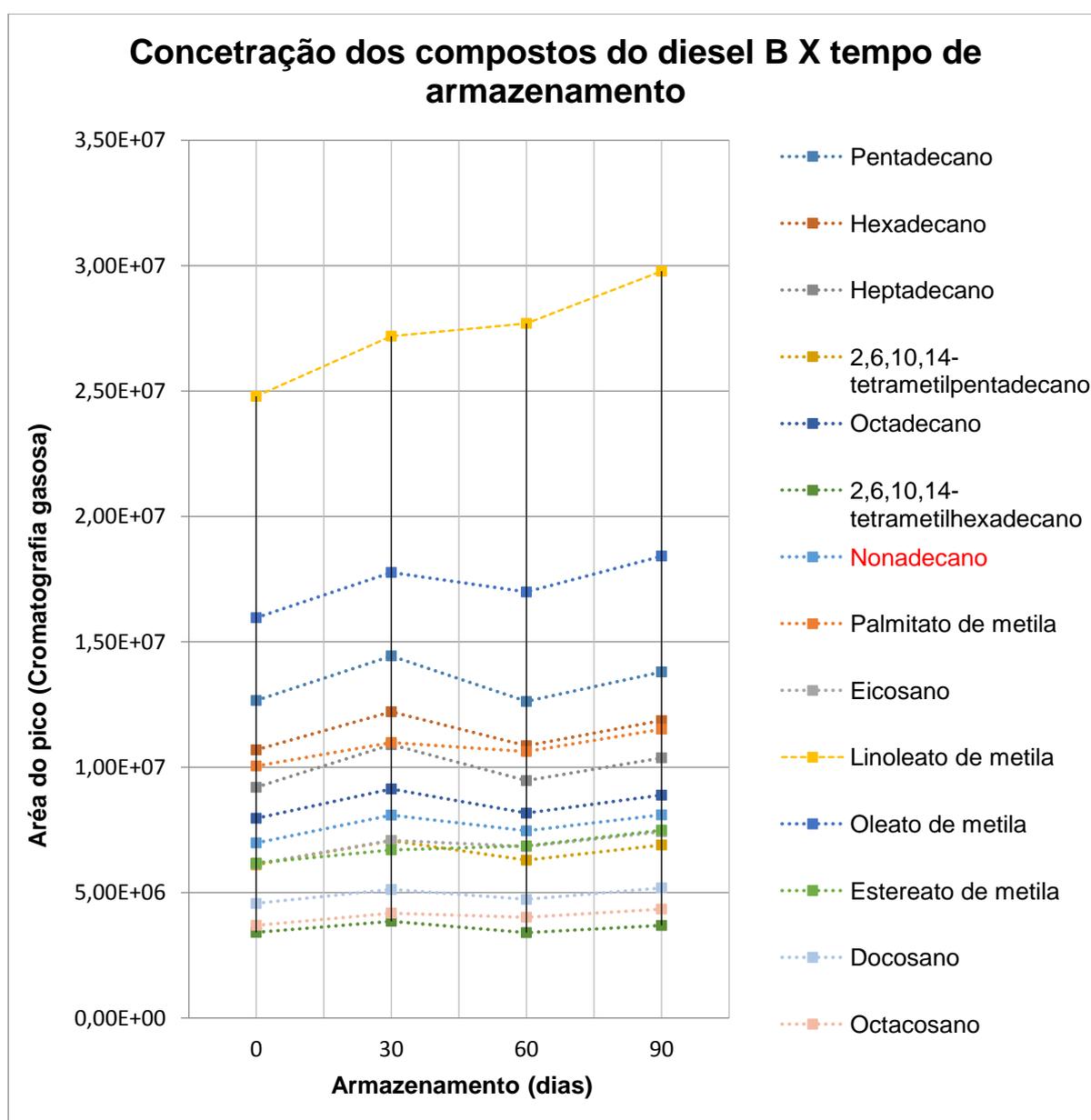


Figura 18: Gráfico com a composição do diesel B S500 com 30, 60 e 90 dias de armazenamento. O composto Nonadecano (em vermelho) foi utilizado como referência.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi a identificação e comparação de microrganismos presentes nos combustíveis e tanques de armazenamento, tanto diesel A quanto no diesel B. Este estudo também correlacionou processos de deterioração dos combustíveis com a presença de bactérias e fungos. Futuramente estes microrganismos isolados poderão ser utilizados na busca de agentes inibidores que sejam baratos e que sejam compatíveis com o uso dos combustíveis em veículos e maquinário.

Os microrganismos foram obtidos a partir da filtração dos combustíveis de acordo com a norma ASTM D6974 – 09 de 2012. Três volumes foram filtrados (2 mL, 20 mL e 200 mL) utilizando-se filtro de 0,22 μm , da Millipore[®]. Após a filtração foram utilizadas as soluções de Tween que por ser emulsificante auxiliou na lavagem da membrana para retirar o excesso de combustível e a solução de Ringer que serviu para lavar a membrana e auxiliar o crescimento dos microrganismos.

As filtrações dos dieséis A e B foi realizada em diferentes volumes para se obter o maior número de microrganismos isolados sem precisar diluir a amostra, pois o crescimento de um aglomerado dificultaria o isolamento e o combustível estudado é hidrofóbico o que o torna imiscível a água.

Após os 60 dias de estocagem a amostra de diesel B não apresentou degradação. E isso pode ter ocorrido, uma vez que a quantidade de microrganismos isolados diminuiu. E, no mesmo intervalo de tempo para o diesel A observou-se que houve degradação, e isso provavelmente aconteceu por que houve aumento dos microrganismos isolados, conforme figuras 15 e 16.

A degradação no diesel A não era esperada, já que este não apresenta adição de biodiesel. A instabilidade do combustível está associada a adição de biodiesel que seria um biocombustível mais fácil de degradar pelos microrganismos. Mas, neste estudo, o combustível que apresentou degradação foi o diesel A, que é o diesel puro. De acordo com os estudos de Bento & Cavalcante (2012) o crescimento dos microrganismos está vinculado a presença de água e não a presença do biodiesel. Os microrganismos estão presentes nos combustíveis independente da manipulação, mas só são capazes de crescer e se reproduzir na presença de água.

Zobell (1946) observou em seu trabalho que mais de 100 espécies representando 30 gêneros microbianos são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fontes de carbono. Desde então, vários trabalhadores como Bartha e Atlas (1973); Amund e Akangbou (1993); Cooney *et al.* (1998) e Hughes Amd Mekenzie (1998) listaram e mostraram 22 gêneros de bactérias, 1 gênero de algas e 14 gêneros de fungos isolados do solo e do ambiente aquático são capazes de biodegradar hidrocarbonetos de petróleo (ZOBELL, BARTHA E ATLAS, AMUND E AKANGBOU, COONEY *et al.*, HUGHES AMD MEKENZIE apud ADEKUNLE *et al.*, 2005).

5.1. BACTÉRIAS

Nas amostras que tiveram sequências com qualidade suficiente para análise, foram encontrados os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* e *Janibacter*.

Os gêneros de bactérias encontrados predominantemente são do grupo Firmicutes. Esse grupo apresenta um pequeno número de bactérias que produzem endósporo que é uma estrutura dormente e não reprodutiva.

O *B. cereus*, que foi encontrada neste estudo, é um agente oportunista, amplamente distribuído na natureza e responsável por intoxicações alimentares. O esporo do *B. cereus* é um problema nas indústrias, pois são resistentes ao calor e possuem a capacidade de se aderir fortemente às superfícies, incluindo aço inoxidável, graças a sua característica hidrofóbica. Por isso, os esporos são difíceis de remover das mangueiras, tubulações e tanques. Os métodos convencionais de limpeza são capazes de remover apenas 40% dos esporos (GOMES, 2013).

Estudos anteriores isolaram o *Bacillus cereus* a partir de produtos de corrosão do gásóleo. E provaram que este é capaz de biodegradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e corroer o aço do gásóleo, pois é capaz de transformar o ferro e o manganês em óxidos. O trabalho de Rajasekar *et al* (2007) é o primeiro a relacionar a oxidação do manganês pelo *B. cereus* com a biodegradação do óleo diesel e sua influência na corrosão em um oleoduto de países tropicais (RAJASEKAR *et al.*, 2007).

Estipes das bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus Pumilus*, *Acinetobacter junii* e *Pseudomonas sp.* foram isoladas de amostras de solos contaminados com óleo diesel, em Long Beach, California, por Bento *et al.*, (2004). Essas bactérias foram inoculadas em consórcio no solo contaminado e

verificou-se que a maior porcentagem de degradação ocorreu uma semana após o inóculo, levando-se em consideração que parte da perda pode ser atribuída a volatilização do combustível. A taxa de degradação foi de 63-84% na fração leve do combustível (C₁₂-C₂₃). A ação deste consórcio de bactérias com a adição de nutrientes também foi eficaz levando a uma degradação de 72% do combustível, após 6 semanas de incubação (BENTO *et al.*, 2005).

Entre as diferentes estirpes pró-bióticas formadoras de esporos, *B. cereus var. Toyoi* (estirpe BCT-7112T) está em uso desde 1975, quando foi oficialmente aprovado pelo Ministério da Agricultura e Silvicultura do Japão para a preparação comercial TOYOCERIN®. Os esporos de BCT-7112T foram utilizados na nutrição animal para suínos, aves, gado, coelhos e aquicultura há mais de trinta anos em uma ampla gama de países ao redor do mundo. O TOYOCERIN® foi autorizado pela primeira vez pela Comissão da União Europeia em 1994 para utilização em suínos, tornando-se o primeiro microrganismo autorizado como aditivo na alimentação e, posteriormente, foi autorizada também para utilização em aves de capoeira, gado e coelhos (JIMENEZ, 2013).

Durante os anos de produção, a estirpe tem sido submetida a numerosos estudos a fim de provar a sua natureza não tóxica, bem como abordagens de identificação molecular para diferenciar BCT-7112T de cepas responsáveis por intoxicação alimentar. Os resultados destes estudos mostram que as hibridações DNA-DNA indicaram que esta estirpe pode não pertencer à espécie *B. cereus*, mas sim uma espécie diferente dentro do mesmo grupo. A estirpe BCT-7112T representa uma nova espécie para a qual foi proposto um novo nome: *B. toyonensis sp. Nov* (JIMENEZ, 2013).

Obuekwe *et al.* (2009) identificaram o *Bacillus sp.* e o *Paenibacillus sp.*, que foram os generos mais abundantes deste estudo, como os generos mais proeminentes na degradação do petróleo bruto no ambiente do deserto do Kuwait. O técnica de isolamento para estas bactérias gram-positivas foi baseada na sua capacidade de sobreviver a altas temperaturas do solo (40 - 50 ° C) e em rejeitos contaminados com petróleo (OBUEKWE *et al.*, apud GANESH, 2009).

O petróleo e seus derivados são formados, em sua maior parte, por compostos apolares, este fato dificulta a interação com microrganismos, água e solo (USMAN *et al.*, 2016). O óleo diesel e o biodiesel são substâncias higroscópicas. A consequência

da absorção de água é a formação de uma bicamada nos tanques que auxilia na formação de um biofilme microbiano levando a degradação e conseqüentemente um comprometimento da qualidade dos combustíveis (FOLLIS apud VAZ, 2010). A degradação microbiana destes é acelerada na presença dos biossurfactantes, pois estes aumentam a interação interfacial água-óleo e, assim, promovem a biorremediação de áreas afetadas (USMAN *et al.*, 2016).

Espécies do gênero *Bacillus* produzem biossurfactantes que podem atuar como antibióticos, como os lipopeptídeos Iturina A (BUGAY, 2009) e a surfactina, que pode ser produzida por *Bacillus subtilis* (KLUGE *et al.*, 1988).

Surfactina é um biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus subtilis* na presença de hidrocarbonetos. Nos vários estudos de suas propriedades, verificou-se que apresenta atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas. A *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva, móvel, formadora de esporos (PRIYA *et al.*, 2009). Os esporos são capazes de sobreviver ao calor extremo (INGRAHAM *et al.*, 2011).

Em estudos utilizando a técnica de espalhamento de óleo em quatro óleos diferentes: óleo vegetal, querosene, petróleo e diesel foi detectada atividade biossurfactante desta bactéria. Nos resultados concluíram que a *Bacillus subtilis* utiliza o diesel como a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactantes em relação aos óleos citados acima (PRIYA *et al.*, 2009).

Liu e colaboradores (2016) isolaram estirpes da bactéria *Bacillus licheniformis* capazes de degradar petróleo e produzir biossurfactantes. O seu biossurfactante apresentou grandes propriedades emulsificantes para diferentes formas de óleo, especialmente o petróleo bruto (Liu *et al.* apud USMAN *et al.*, 2016). Esta bactéria também foi isolada neste trabalho.

Apesar de sua ampla ocorrência, o *Bacillus safensis* tem sido objeto de poucos estudos biotecnológicos. Esta espécie cresce em uma variedade de ambientes que incluem solo em massa, solo de rizosfera, sedimentos, plantas hospedeiras e salas de montagem ultra limpas para espaçonaves. Os seus esporos apresentam mecanismos de extrema resistência a uma gama de fatores e isso tem sido o foco da maioria dos estudos. O seu sistema de produção de surfactantes permanece em grande parte inexplorado (DOMINGOS *et al.*, 2015). Este *Bacillus* foi isolado da amostra de diesel, que também é um ambiente extremo.

O *B. safensis* é semelhante a outras espécies de *Bacillus*. Porém algumas diferenças na incorporação de aminoácidos foram observadas, e as análises químicas corroboraram os resultados genéticos. Este *Bacillus* produziu uma mistura de pelo menos quatro lipopéptidos com sete aminoácidos incorporados e uma cadeia de ácido graxo com 14 carbonos, o que torna esta molécula semelhante ao biossurfactante produzido pela espécie *Bacillus pumilus*: a pumilacidina (DOMINGOS *et al.*, 2015).

O gênero *Janibacter* foi proposto pela primeira vez e descrito por Martin e seus colegas em 1997, pouco depois estes identificaram duas estirpes de actinobactérias que tinham sido isoladas a partir de amostras de lamas recolhidas de uma estação de tratamento de águas residuais na Alemanha (MARTIN *et al.*, apud ELSAYED *et al.*, 2005). O *Janibacter melonis* é um membro recentemente descrito do gênero, que foi isolado a partir da parte interna de um melão oriental (*Cucumis melo* anormalmente estragado) recolhido de um campo de cultivo na Coreia, este ainda não foi isolado a partir de outras fontes. Células de *J. melonis* são obrigatoriamente aeróbicas, gram-positivas, não são resistentes a ácidos, sem motilidade e não formam esporos cocos (0,8 a 1,0 um de diâmetro), possuem organização filamentosa e muitas vezes ramificadas (YOON *et al.*, apud ELSAYED *et al.*, 2005).

Observa-se que algumas das bactérias identificadas neste trabalho foram descritas em outros trabalhos de isolamento de microrganismos presentes no Diesel A e no Diesel B. Nos experimentos realizados por Souza (2010), onde foram analisadas amostras de Diesel puro e a mistura diesel/biodiesel, foram identificadas as seguintes bactérias: *Bacillus valismortis*, *B. licheniformis*; *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefacien*; *B. fusiformis*, *B. subtilis*; *Lysinibacillus sphaericus*; *Staphylococcus sp.*; *S. capitis*; *Kocuria palustris*; *Citrobacter amalonaticus*; *Stenotrophomonas maltophilia*. Nos estudos realizados por (Gaylarde *et al.*; Rauch *et al.* apud SOUZA, 2010) foram encontrados diferentes espécies contaminando tanques de armazenamento de diferentes tipos de combustíveis, como: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus capitis* e *Kocuria sp.*

O *Bacillus subtilis*, *licheniformis*, *safensis* e *toyonensis* foram as bactérias mais isoladas neste trabalho.

Fava *et al.* (1995) e Loh e Wang (1998) demonstraram que os minerais e substratos aumentam a taxa de biodegradação dos microrganismos. A adição de nutrientes estimula a capacidade degradativa permitindo que os microrganismos

quebrem mais rápido os poluentes orgânicos (Ausma *et al.*, 2002) (FAVA *et al.*, LOH e WANG, AUSMA *et al.*, apud GANESH, 2009).

A principal via metabólica de degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular. Os alcanos geralmente são convertidos em ácidos carboxílicos que posteriormente são biodegradados pelo processo de β -oxidação. A biodegradação de compostos aromáticos requer uma reação de dihidroxilação com formação de dióis, seguida da clivagem do anel e posterior formação de catecol que é degradado em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ATLAS apud PIROLLO, 2006).

As bactérias isoladas das amostras são capazes de formar endósporos e de produzir biossurfactantes. Os endósporos são capazes de sobreviver em ambientes extremos e os surfactantes auxiliam na degradação do combustível, pois ajudam na emulsificação do combustível com a água, o que acelera ação microbiana.

5.2. FUNGOS

Nas as amostras de fungos que tiveram suas sequências com qualidade suficiente para análise, foram encontrados os prováveis gêneros: *Paecilomyces*, *Byssochlamys* e *Aspergillus*. Sendo as espécies *A. fumigatus* e *A. tamarii* na amostra de diesel A (LGB 25) sem armazenamento e o *A. tamarii* na amostra de deiesel B (LGB 34) sem armazenamento.

Os três gêneros prováveis encontrados pertencem ao mesmo filo Ascomycota. A maioria dos ascomicotas é multicelular. Esta é a maior divisão de fungos, com cerca de 30.000 espécies. Os ascomycotas reproduzem-se assexuadamente por meio de esporos muito finos conhecidos como conídios. As hifas dos ascomycotas são divididas em compartimentos por meio de septos. Cada compartimento contém seu próprio núcleo, mas os poros presentes nos septos permitem a migração das estruturas celulares de um compartimento para outro (EDWARDS, 2000)

O filo ascomycota é chamado assim, porque durante parte do seu ciclo de vida as células reprodutivas são envolvidas em um pequeno saco ou ascus (EDWARDS, 2000).

O gênero *Aspergillus*, além de ser um fungo encontrado em águas marinhas, apresenta potencial para ser utilizado em tratamento de regiões marinhas após contaminação por derivados de petróleo (LIRA, 2014).

O *A. fumigatus* na presença de hidrocarbonetos é um potencial produtor de biossurfactes (CASTIGLIONI *et al.*, 2009).

Os fungos frequentemente encontrados e que são considerados agentes biodegradantes do diesel são: *Hormoconis resiniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium sp.*, *Rhodotorula glutinis* e *Candida silvicola* (BENTO e GAYLARDE, 2001) (BENTO *et al.* 2005) (GASSEN *et al.*, 2015).

O fungo filamentoso *A. fumigatus*, também isolado neste estudo, foi isolado previamente por Bento *et al.*, (2001) a partir da filtração de óleo diesel de tanques armazenadores. Os fungos *Paecilomyces sp.* e *Rhodotorula sp.* foram isolados após a filtração de amostras de biodiesel produzido a partir da (BENTO *et al.*, 2001).

Bücker *et al.* (2011) relataram que o *Paecilomyces sp.* produziu a maior biomassa nas misturas de diesel/biodiesel, enquanto *A. fumigatus* apresentou o melhor crescimento em biodiesel puro.

De acordo com Buker (2009), na comparação da degradação do Biodiesel entre os fungos filamentosos, o *Aspergillus fumigatus* apresentou maior atividade do que o *Paecilomyces sp.* ambos degradaram preferencialmente as cadeias C16 (ácido palmítico) e C18 (ácido esteárico).

Várias espécies de fungos são capazes de degradar hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, sendo o gênero *Aspergillus* bastante representativo. Este gênero em comparação a outros fungos como: *Fusarium*, *Mucor* e *Penicillium* tem sido visto como o mais promissor na degradação deste combustível, e também é capaz de degradar: petróleo bruto, óleo diesel, gasóleo, querosene, gasolina e hidrocarbonetos aromáticos como tolueno, p- xileno e etilbenzeno (VELIEV *et al.*, apud LIRA, 2014).

Os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium sp.* apresentaram maior capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos do que bactérias como *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e *Pseudomonas* (CERNIGLIA e PERRY apud ADEKUNLE *et al.*, 2005). Foi demonstrado por Barth e Atlas (1973) que os fungos podem degradar a moléculas de hidrocarbonetos de

petróleo em moléculas menores do que as bactérias (BARTH e ATLAS apud ADEKUNLE *et al.*, 2005).

A taxa de degradação do *A. fumigatus* foi a mais elevada (61,29%) para octano, sugerindo que a população de fungos pode ser utilizada em processos de biorremediação de áreas poluídas por hidrocarbonetos de petróleo e metabólitos recalcitrantes (DHAR *et al.*, LIU *et al.*, apud LIRA, 2014).

O fungo *Aspergillus fumigatus* foi isolado a partir da biomassa interfacial combustível/água em tanques de armazenamento de diesel no Brasil. A sua capacidade de degradação do óleo diesel foi avaliada após o seu crescimento durante 30 e 60 dias. Este fungo degradou preferencialmente hidrocarbonetos alifáticos de cadeias C11 - C13 no diesel, produzindo reduções de 47,7, 37,5 e 51% em C11, C12 e C13, respectivamente (BENTO *et al.*, 2005).

O crescimento do *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces sp.* no diesel e biodiesel puro e suas misturas B5, B10 e B20 foi acompanhado por 60 dias. Os microrganismos que mais se desenvolveram foram o *A. fumigatus*, com formação de biomassa quase três 3 vezes maior no B100 do que no B0 e a *Rhodotorula sp.* (BUKER, 2009). Os microrganismos *A. fumigatus* e *Paecilomyces* também foram isolados neste estudo.

O *Aspergillus tamaritii* tanto isolado como em consórcio com *Penicillium griseofulvum* e *Cunninghamella elegans*, apresentou potencial na degradação de lubrificantes automotivos, utilizados em motores a óleo diesel e gasolina, limpos e após a queima (MACIEL *et al.*, 2010). Além disso, o *A. tamaritii* mostrou resultados promissores no tratamento de ambiente marinho poluído por óleo diesel (LIRA, 2014).

Maciel *et al.* (2010) constatou que o *A. tamaritii* realizou a oxidação biológica indicativa de degradação, após apenas duas horas de contato com o óleo lubrificante. Souza *et al.* (2005) também realizou os ensaios de degradação por fungos em derivados de petróleo, estes foram capazes de degradar em até 24 horas os combustíveis (Souza *et al.*, apud MACIEL *et al.*, 2010).

O consórcio dos microrganismos *Bacillus sp.* e *Aspergillus tamaritii* foi utilizado para verificação de biodegradação dos compostos do óleo diesel. A degradação do combustível foi superior a 20% (ARRUDA *et al.*, 2015).

No filo Ascomycetos, família Trichocomaceae, os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces* são anamorfos (BAINIER, MALLOCH *et al.*, PITT *et al.*, apud HOUBRAKEN *et al.*, 2008). A ligação do anamorfismo do genero *Paecilomyces* com o *Byssochlamys* foi proposto pela primeira vez por Stolk e Sansão (STOLK *et al.*, HOUBRAKEN *et al.*, 2008). Um estudo molecular recente sobre o *P. variotii* mostrou que esta especie forma um clado bem definido na familia Trichocomaceae, juntamente com outras especies termofílicas de *Paecilomyces* e teleomorfos de *Byssochlamys* (LUANGSA-ARD *et al.*, apud HOUBRAKEN *et al.*, 2008). A análise morfológica de isolados da *P. variotii* mostrou que este é a fase anamorfa do *Byssochlamys spectabilis* (HOUBRAKEN *et al.*, 2008). Como o *P. variotii*, este gênero também ocorre em produtos tratados termicamente, devido à formação de ascosporos resistentes ao calor (HOUBRAKEN *et al.*, 2007, 2008).

Os fungos do gênero *Byssochlamys sp.* e *Wickerhamomyces anomalus* foram isolados a partir de biofilmes encrustados na superfície metálica de tanques de armazenamento de B20 (diesel com adição de 20% de biodiesel) (ELJURI, 2016).

Os fungos isolados por Eljuri (2016) mostraram que são capazes de se adaptar à temperatura e pH extremos, possuem a capacidade de crescer em ambientes sob alta pressão osmótica e sem a adição de vitaminas (ELJURI, 2016). Essa tolerância à alta pressão osmótica pode promover maior resistência ao ataque de antimicrobianos que foram adicionados ao combustível (PASSMAN, apud ELJURI, 2016).

Após o isolamento, testes foram feitos com meio contendo B20 como única fonte de carbono e verificou-se que o fungo foi capaz de usar componentes do combustível para crescer, já que esporos de germinação apareceram após 4 dias de inoculo e produziu uma camada de biofilme (ELJURI, 2016).

A degradação do combustível foi observada após 30 dias de cultivo, pois houve a degradação do éster metílico do ácido palmítico (ELJURI, 2016).

Os fungos do género *Byssochlamys* são conhecidos por sua capacidade de crescer em lugares com pouca disponibilidade de oxigênio (TANIWAKI, apud ELJURI, 2016).

5.3. BIORREMEDIAÇÃO

O petróleo, por se apresentar sempre como uma mistura de hidrocarbonetos, com relação a sua biodegradação varia conforme sua composição, atividade microbiana e condições ambientais: temperatura, pH, salinidade, quantidade de oxigênio, nutrientes e tempo. Alguns compostos são facilmente biodegradados ou evaporados enquanto outros persistem na natureza, ou podem ser recalcitrantes como: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (CRUZ *et al.*, 2012). Segundo estudos, outros fatores também contribuem na biodegradação e posterior biorremediação de locais contaminados por petróleo, como nutrientes inorgânicos e a espécie dos microrganismos utilizados (VASUDEVAN; RAJARAM apud TAMADA, 2013).

A biodegradação de hidrocarbonetos e conversão para CO₂ envolve reações de oxidação, por isso a maioria dos microrganismos são aeróbios, apesar de aparentemente também ocorrer processos anaeróbicos em menor escala na biodegradação (CRUZ *et al.*, 2012).

A biodegradabilidade do biodiesel deve-se à presença de ésteres de ácidos graxos que são facilmente reconhecidos pelos microrganismos, ou seja, é mais fácil em geral degradar o biodiesel do que o diesel (BENTO & CAVALCANTE, 2012).

Alguns microrganismos presentes naturalmente no solo contaminado com óleo podem produzir biossurfactantes. O ambiente contaminado com óleo contém grande quantidade de compostos químicos com estrutura complexa, isto é, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Estes microrganismos, na presença de óleo, exibem atividades emulsificantes produzindo biossurfactantes e podem utilizar os hidrocarbonetos como substratos convertendo-os em produtos inofensivos ou mineralizando-os (PRIYA *et al.*, 2009).

O petróleo e seus derivados são formados, em sua maior parte, por compostos apolares, este fato dificulta a interação com microrganismos, água e solo (USMAN *et al.*, 2016). O óleo diesel e o biodiesel são substâncias higroscópicas. A consequência da absorção de água é a formação de uma bicamada nos tanques que auxilia na formação de um biofilme microbiano levando a degradação e conseqüentemente um comprometimento da qualidade dos combustíveis (FOLLIS apud VAZ, 2010). A degradação microbiana destes é acelerada na presença dos biossurfactantes, pois estes aumentam a interação interfacial água-óleo e, assim, promovem a biorremediação de áreas afetadas (USMAN *et al.*, 2016).

5.4. CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS DOS CONTAMINANTES NOS COMBUSTÍVEIS.

Como citato anteriormente, esperava-se, neste trabalho, a degradação do diesel B por este ter adição de biodiesel e não do diesel A. A explicação desta degradação pode estar relacionada a presença de água no sistema e não a presença de biodiesel.

Os contaminantes presentes no diesel puro e biodiesel estão nestes combustíveis independentes da manipulação. A população de microrganismos pode variar de acordo com a região e fonte de extração do petróleo bruto e do biodiesel. Mas, estes microrganismos só se desenvolvem se a concentração da água no combustível for superior a 100ppm (SIERGERT, 2009). Assim a relação de instabilidade do diesel puro não está ligada diretamente a adição de biodiesel e sim a presença de água no sistema. O biodiesel por ser higroscópico facilita a entrada de água no combustível, ou seja, é uma relação indireta, mas não é necessariamente pela adição de biodiesel que o combustível degrada.

Na amostra que não possuía mistura de biodiesel (diesel A), a quantidade de bactérias aumentou ao longo do tempo de armazenamento, diferente do que ocorreu na amostra com adição de biodiesel (diesel B). O aumento pode ter ocorrido por que em alguma etapa do manuseio do combustível este pode ter entrado contato com a água, o que favoreceu o crescimento dos microrganismos e a consequente degradação da amostra.

Os postos, distribuidoras e TRR's (Transportador Revendedor Retalhista) ficaram desamparados quando começaram a ter dificuldades inesperadas por causa da contaminação dos combustíveis por microrganismos, como: a formação de borras, entupimentos em seus tanques e filtros causados (BENTO & CAVALCANTE, 2012), redução da estabilidade química e o aumento da corrosividade do combustível, que geralmente ocorrem juntas (HILL & HILL, apud ZIMMER, 2014).

A biodegradabilidade do biodiesel deve-se à presença de ésteres de ácidos graxos, que são facilmente reconhecidos pelos microrganismos, ou seja, é mais fácil em geral degradar o biodiesel do que o diesel (BENTO & CAVALCANTE, 2012).

Devido à natureza higroscópica do biodiesel e do diesel, a água se acumula nestes combustíveis quando armazenados por longos períodos. Altos níveis de água

dissolvida levam a formação de gotículas, que podem produzir uma segunda fase de água livre no fundo do tanque, condição essencial para a proliferação de microrganismos (ZIMMER, 2014).

A possibilidade de encontrar água na mistura biodiesel/diesel aumenta com a presença do biocombustível. Como consequência direta e visível, a maior quantidade de biomassa é formada na interface óleo-água e dependendo da manipulação do combustível armazenado, parte desta biomassa se solta e se mistura ao combustível como um todo. Além disso, o poder de solvência do biodiesel colabora com o desprendimento de material biológico aderido a paredes dos tanques e tubulações (biofilme), muitas vezes formados ao longo de anos, acarretando no aumento de sólidos suspensos no combustível (BENTO & CAVALCANTE, 2012).

A presença de água no sistema, assim como a presença do biodiesel, propicia condições ideais para o crescimento de populações microbianas. A entrada de água pode ocorrer de diferentes maneiras: carregada pelos combustíveis (higroscópicos), pela condensação de ar nas paredes dos tanques e tubulações, pelo metabolismo microbiano, entrada pelos respiros e durante a lavagem dos tanques ou ainda pode ser colocada intencionalmente, como lastro. Nesta água, são carregados sais inorgânicos, que funcionam como suporte de micronutrientes. Apesar de esporos de fungos e bactérias permanecerem viáveis no combustível, eles apenas crescem e se reproduzem na presença de água (BENTO & CAVALCANTE, 2012). De acordo com Siergert (2009), apenas 100 ppm de água são suficientes para a proliferação de microrganismos enquanto 5 a 80 ppm de água são suficientes para a sobrevivência dos esporos (SIEGERT, 2009).

Uma constatação imediata deste evento é percebida por uma saturação prematura, seja de elementos filtrantes do sistema prensa ou nos próprios veículos e em nível preocupante, como o entupimento e desgastes de bicos injetores (BENTO & CAVALCANTE, 2012).

Os combustíveis podem ser preservados pela adição de biocidas que inibem ou controlam o crescimento microbiano (PASSMAN, apud ZIMMER, 2014).

A escolha de um biocida deve atender exigências tais como: apresentar amplo espectro de atividade contra fungos e bactérias e ser eficaz contra estes microrganismos tanto na fase planctônica quanto nos biofilmes (ZIMMER, 2014). Os biocidas utilizados na proteção de combustíveis ou são solúveis em água ou em óleo.

Os antimicrobianos solúveis em óleo, com coeficiente de partição (K_p - O coeficiente de partição é simplesmente a razão entre a concentração do material extraído e a concentração do que ficou na água) entre 0,5 e 80, são os mais recomendados, pois permitem uma melhor distribuição do ingrediente ativo entre a fase aquosa e o óleo combustível (WILLIAMS *et al.*, CHESNEAU *et al.*, apud ZIMMER, 2014).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O óleo diesel é o principal derivado de petróleo comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas (MKOMA *et al.*, 2014). Por isso é importante o estudo detalhado sobre seus principais microrganismos contaminantes e degradantes.

Neste trabalho foram encontradas uma ampla gama de bactérias do gênero *Bacillus*, alguns *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* e *Janibacter*, bem como fungos dos gêneros *Aspergillus sp.*, *Paecilomyces sp.* e *Byssochlamys*. A maioria das cepas encontradas já tinha sido mencionada em outros estudos sobre degradações dos combustíveis diesel e biodiesel.

O diesel A apresentou possivelmente uma degradação leve durante o armazenamento. Isso pode ter ocorrido pelo aumento do número de bactérias isoladas do gênero *Bacillus*. E este pode ter sido o responsável pela possível degradação, já que as bactérias do gênero *Penebacillus* não foram isoladas após o armazenamento.

O objetivo deste trabalho era fazer o mapeamento de todos os microrganismos cultiváveis presentes no diesel A e diesel B, pois este estudo detalhado ainda não havia sido feito. E pode ser usado para o desenvolvimento de novos parâmetros de qualidade para estes combustíveis: como a quantidade de água máxima permitida em cada um, assim como basear estudos futuros para o desenvolvimento de aditivos capazes de controlar a ação destes microrganismos e, assim, evitar a degradação.

Os trabalhos anteriores isolavam apenas alguns microrganismos para testar a ação degradante destes nos combustíveis. Com o auxílio destes estudos foi possível

comparar que alguns dos microrganismos encontrados já haviam sido citados como contaminantes e degradantes do diesel e biodiesel e alguns ainda não.

A diferença dos microrganismos encontrados neste trabalho comparando trabalhos anteriores pode ter ocorrido pela origem das amostras estudadas, uma vez que a matéria prima para obtenção do biodiesel pode ser diferente, dependendo do país de produção, assim como o petróleo utilizado para produção do diesel, que pode ser retirado de várias regiões diferentes do mundo.

As pesquisas sobre esse assunto precisam continuar usando-se outras variáveis: como o mapeamento dos microrganismos não cultiváveis, para se ter um bom espectro da microbiota bacteriana e fungica presente no biodiesel e no óleo diesel puro e verificar quais os compostos destes combustíveis que sofrem mais com a contaminação. Outro ponto a ser estudado é a rota que o combustível percorre, pois durante a sua manipulação e transporte pode ocorrer o contato direto com a água. Esta pode estar nos tanques e tubulações da distribuidora, no tanque do caminhão que transporta (TRR's) e nos tanques dos postos de gasolina e pontos de abastecimento. E, de acordo com estudos, a água é a principal responsável pelo crescimento e proliferação microbiana e conseqüentemente está diretamente relacionada à degradação dos combustíveis.

Com estes estudos, as indústrias, pontos e postos de abastecimentos, distribuidoras, TRR's e instituições de pesquisa poderão planejar estratégias de combate a esses contaminantes e garantir a qualidade dos combustíveis estudados.

7. REFERÊNCIAS

ADEKUNLE, A. A.; OLUYODE, T. F. **Biodegradation of crude petroleum and petroleum products by fungi isolated from two oil seeds (melon and soybean).** Journal of Environmental Biology. India, v. 26(1), p. 37-42, 2005.

AGUIAR, R. S. **Produção de poli-beta-hidroxitirato através de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.** Rio de Janeiro.2012. f. 22-24. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) Centro Universitário Estadual da Zona oeste, Rio de Janeiro, 2012.

ALVES, A. *et al.* **Tipagem genética de microrganismos.** Aveiro. 2003. 27 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.

ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2016,** Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Rio de Janeiro, 265 f, 2016.

ARRUDA, F. V. F. *et al.* **Biorremediação de biodiesel em escala de laboratório por consórcios indígena de *Bacillus sp.*, *Aspergillus tamaritii* e levedura.** Recife. 2015. 99 f. Artigo 3, p. 88-95. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2015.

ASH, C. *et al.* Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology, v. 13, p. 202-206, 1991.

ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. **Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test.** Antonie van Leeuwenhoek, v. 64, p. 253-260, 1993.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL 2015. Ano Base 2014: **Relatório Síntese. Empresa de Pesquisa Energética,** Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioSintese.aspx?anoColeta=2015&anoFimColeta=2014>>. Acesso em: 11 out. 2016.

BANAT, I. M. **Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal state of the art.** Acta Biotechnologica, v. 15, ed. 3, p. 251-267,1995.

BEATTIE, A. J. *et al.* **New products and industries from biodiversity. In: LAIRD, S. (Ed.). Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends: Findings of the Condition and Trends Working Group.** p. 271-295. 2005.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas e seus Óleos: Vantagens e Desvantagens para Produção de Biodiesel.** Campina Grande, Embrapa Algodão, p. 1-30, 2008.

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

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

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

BENTO, F. M & CAVALCANTI, E. H. S. Implicações da adição de 5% de biodiesel na qualidade do óleo diesel. 2012. Disponível em: <http://www.cntdespoluir.org.br/Paginas/Artigos.aspx?n=7>. Acesso em 22 jan. 2017.

BERGMANN, J. C. *et al.* **Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 21, p. 411-420, 2013.

BUCKER, F. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas.** Porto Alegre. 2009. 147 f. (Dissertação de Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009.

BUCKER, 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, p. 346-355, 2014.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O. C.; BENTO, F. M. **Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 65, n. 01, p. 172-178, 2011.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização.** Curitiba. 2009. 82 f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.

BRASIL. **Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997.** Dispõe sobre a política energética nacional, as atividades relativas ao monopólio do petróleo, institui o Conselho Nacional de Política Energética e a Agência Nacional do Petróleo e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 de ago, 2015.

BRASIL. **Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014.** Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 8 de jul, 2016.

BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016.** Alteração da Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm>. Acesso em: 11 jul. 2016.

BRASIL. **Resolução ANP nº 50,** de 23 de dezembro de 2013. Altera a legislação tributária federal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 dez. 2013.

BRASIL. **Resolução ANP nº 30,** de 23 de junho de 2016. dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final e diretrizes para comercialização e uso de biodiesel, em caráter autorizativo, em

quantidade superior ao percentual de adição obrigatória fixado em lei específica. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 jun. 2016.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R. **Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo.** STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 23, p. 6-9, 2005.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. **Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato.** *Química Nova*, 32(2), 292-295, 2009.

CHISTI, Y. **Biodiesel de microalga.** ELSEVIER, v 25, p. 294-306. 2007.

COLE, J. R.; Q. WANG.; FISH, B.; CHAI, D. M.; MCGARRELL, Y.; SUN, C. T.; BROWN, A.; PORRAS-ALFARO, C. R.; KUSKE, TIEDJE, J. M.; Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res.* 42(Database issue):D633-D642; doi: 10.1093/nar/gkt1244 [PMID: 24288368]. 2014.

COSTA, O. Y. A. *et al.* Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture - independent method. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 73-84, 2015.

CRUZ, G. F.; MARSAIOLI, A. J. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. *Química Nova*. v. 35, n. 8, São Paulo, 2012.

DOMINGOS, D. F.; FARIA, A. F.; GALAVERNA, R. S.; EBERLIN, M. N.; GREENFIELD, P.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; NAIN TRAN-DINH; MIDGLEY, D.; OLIVEIRA, V. M. **Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560.** *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, Issue 7, p 3155-3167, 2015.

EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004) *Nucleic acids research* 32 (5) :1792-7. PMID: 15034147

EDWARDS, G. I. **Biology the easy way.** Brooklyn, NY. Barron's, ed. 3, p.125, 2000.

ELJURI, O. A. **Characterization of fungal contaminants in b20 biodiesel storage tanks and their effect on fuel composition.** Norman. 2016. 97 f. Dissertação (Degree of MASTER OF SCIENCE) – University of Oklahoma, Norman, 2016.

ELSAYED, S.; ZHANG, K. **Bacteremia Caused by *Janibacter melonis*.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43(7), p. 3537-3539, 2005.

EMBRAPA. **Biodiesel reduz em 70% a emissão de Gases do Efeito Estufa.** Brasília, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2723697/biodiesel-reduz-em-70-a-emissao-de-gases-do-efeito-estufa>. Acesso em: dez, 2016.

ERTHAL, R. H. **Modelagem e simulação dinâmica de um conversor de craqueamento catalítico.** Curitiba. 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Curitiba, 2003.

FOX, G. E. *et al.* **Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, p. 4537-4541, 1977.

FOX, G. E. *et al.* The Phylogeny of Prokaryotes. **Science**, v. 209, p. 457-463, 1980.

FRANKLAND, G. C.: FRANKLAND, P. F. **Studies on Some New Micro-Organisms Obtained from Air**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, v. 178, p. 257-287, 1887.

GANDRA, A. E.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. **Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos**. Acta Sci. Technol. Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

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

GARCIA-MARTINEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTON, A. I *et al.* Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. Journal of Microbiological Methods, v.36, n1, p. 55-64, 1999.

GARDES, M.; BRUNS T.D. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rust**. Mol. Ecol., 2:113- 118, 1993.

GASSEN, J.; BENTO, F. M.; FRAZZON, A. P. G. FERRAO, 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, 2015.

GILVAN-JÚNIOR. **Processamento Primário de Petróleo/Noções de Processo e Refino**. Apostila de Curso, UFS e UNIT [SI], 2011.

GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus* spp. **Disciplina de microbiologia clínica veterinária – FAVET-UFRGS**. Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/bacillus200902.pdf>. Acesso em: maio, 2016.

GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus* spp. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária – FAVET-UFRGS**. Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>. Acesso em: dez, 2016.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal dna: molecular evolution and phylogenetic inference. **The quarterly review of biology**, v. 66, p. 411-453, 1991.

HOUBRAKEN, J. VARGA, J. RICO-MUNOZ, E. JOHNSON, S. SAMSON, R. A. **Sexual Reproduction as the Cause of Heat Resistance in the Food Spoilage Fungus *Byssosclamyces spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*)**. Applied and environmental microbiology. V. 74, n. 5, p. 1613–1619, 2008.

INGRAHAM, J. L., INGRAHAM, C. A. **Introdução à Microbiologia: Uma Abordagem Baseada Em Estudos De Casos**. v 1. São Paulo, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON L. D.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Artmed, Ed. 6., 2014.

LUPATINI, M.; MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I. **Caracterização do dna ribossômico do isolado de Scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- maiden**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 32, 2008.

JIMENEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LOPEZ-LOPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØF, A. B.; RAMÓNG, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODONER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. **Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations.** Systematic and Applied Microbiology. V. 36, p. 383–391, 2013.

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., MENTJIES, P., DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649, 2012.

KLUGE, B. *et al.* **Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332.** FEBS Letters, v. 231, p. 107-110, 1988.

KNOTHE, G. **History of vegetable oil-based diesel fuels.** In: KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. V. (Orgs.). *The biodiesel handbook.* Estados Unidos da América, Illinois: AOCS Press, p. 5-20, 2010.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil.** *Novos estudos-CEBRAP*, n. 78, p. 15-21, 2007.

LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO, Y. **Degradation of biodiesel under different storage conditions.** *Bioresource Technology*. v.97, p. 250–256, 2006.

LIMA, J. R. O. *et al.* **Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica.** *Química Nova*, v. 30, p. 600-603, 2007.

LIRA, D. D. **Caracterização de *Aspergillus* sp. Quanto a capacidade de degradação de óleo diesel.** Recife. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos)- Universidade Federal de Pernambuco - Recife, 2014.

LUZ-JÚNIOR, L. F. L. *et al.* **Bioetanol, biodiesel e biocombustíveis: perspectivas para o futuro.** *Regional, urbano e ambiental*, v. 3, p. 53-57, 2009.

MACHADO, C. M. M., PIGHINELLI, A. L. M. T., QUIRINO, B. F., SOUTO, B. S., POLETTO, C. M., FARINAS, C. S., BARRETO, C. C., RODRIGUES, D. S., PINTO, G. A. S., BERGMANN, J. C., ALMEIDA, J. R. M., DIAS, J. M. C. S., SOUSA, K. A., FAVARO, L. C. L., PARACHIN, N. S., DAMASO, M. C., COSTA, O. Y. A., FRANCO, P. F., GONÇALVES, S. B., MENDES, T. D., SALUM, T. F. C., PACHECO, T. F. **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos.** Brasília, DF: Embrapa. p. 319, 2013.

MACIEL, C. C. S., TAKAKI, G. M. C., GUSMÃO, N. B. **Potencialidade de Fungos Filamentosos em Degradar Óleos Lubrificantes.** *Revista Eletrônica de Biologia (REB)*. v. 3(1). p. 58-64. 2010.

MENEZES, R. S.; FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA, J. A. N. **Biodiesel de microalgas: avanços e desafios.** Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013000300015&script=sci_arttext >. Acesso em: 19 set. 2016.

MKOMA, S. L.; DA ROCHA, G. O.; REGIS, A. C. D.; DOMINGOS, J. S. S.; SANTOS, J. V. S.; DE ANDRADE, S. J.; CARVALHO, L. S.; DE ANDRADE J. B. **Major ions in PM_{2.5} and PM₁₀ released from buses: The use of diesel/biodiesel fuels under real conditions.** *Fuel*, v. 115, p. 109-117, 2014.

MOREIRA, F. S. **Alternativas tecnológicas para a maximização da produção de olefinas leves a partir de petróleos pesados**. Rio de Janeiro. 2006. 126 f. Monografia (Engenharia Química) - Escola de Química/Agência Nacional do Petróleo – Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria de Petróleo e Gás Natural, Rio de Janeiro, 2006.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A. A. **Database Indexing for Production MegaBLAST Searches**, *Bioinformatics* 24:1757-1764. 2008

NWAOGU, L. A.; ONYEZE, G. O. C.; NWABUEZE, R. N. **Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis***. *African Journal of Biotechnology*, v. 7 (12), p. 1939-1943, 2008

OLIVEIRA, Z. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-se-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional**. São Paulo. 2009. 164 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PETRÓLEO BRASILEIRO S. A. PETROBRAS. **Óleo diesel**. 2015. Disponível em:

<[http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/paraindustriasetermetricas/oleodiesel/!ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQwsLQ_2CbEdFAHrtAYU!/> Acesso em: 23 set. 2016.](http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/paraindustriasetermetricas/oleodiesel/!ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQwsLQ_2CbEdFAHrtAYU!/)

PETROSINO, J. F. *et al.* **Metagenomic pyrosequencing and microbial identification**. *Clinical Chemistry*, v. 55, p. 856-866, 2009.

PIROLLO, M. P. S. **Estudo da produção de Biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. São Paulo. 2006. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2006.

PLÁ, J. A. **Perspectivas do biodiesel no Brasil**. *Indicadores Econômicos FEE*, v. 30, n. 2, p. 179-190, 2002.

PRIYA, T., USHARANI, G. **Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa***. *Botany Research International*, v.2, p. 284-287, 2009.

PROSSER, J. I. **Molecular and functional diversity in soil micro-organisms**. *Plant and Soil*, v. 244, p. 9-17, 2002.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596, 2013.

RAJASEKAR, A.; BABU, G.; PANDIAN, S. K.; MARUTHAMUTHU, S.; PALANISWAMY, N.; RAJENDRAN, A. **Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus* ACE4 in diesel transporting pipeline**. *Corrosion Science*. v. 49, Issue 6, p. 2694-2710. 2007.

RAMOS, L. P. *et al.* **Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 31, p. 28-37, 2003.

RANZAN, L. **Estudo da viabilidade do uso de espectroscopia por fluorescência 2D para quantificar teor de enxofre em óleo diesel**. Porto Alegre. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

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

ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. The MycoBank engine and related databases. <http://www.mycobank.org>. 2005.

ROCHA, L. B. **Projeto de uma unidade de fracionamento atmosférico de petróleo utilizando HYSYS**. Fortaleza. 2009. 15 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso)- UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC, Fortaleza, 2009.

SANTANA, I. **Emissão de gases poluentes por descarga de veículos do ciclo diesel provocadores de deterioramento do meio ambiente: busca de soluções para amenizar ou controlar o problema**. Belo Horizonte. 2012. 76 f. Monografia (Especialista em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SAWADOGO, A., OTOIDOBIGA, H. C., KABORÉ, A., SAWADOGO, J. B., TRAORÉ, S. A., DIANOU, D. **Optimization of Hydrocarbons Biodegradation by Bacterial Strains Isolated from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: Case Study of Diesel and Used Lubricating Oils**. Current Research in Microbiology and Biotechnology. v.3, p. 652-657, 2015.

SCHULTZ, F. M. Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel. Porto Alegre. 2010. 137 f. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SHIDA, O. *et al.* **Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology, v. 46, p. 939-946. 1996.

SIEGERT, W. **Microbial contamination in diesel fuel – are new problems arising from biodiesel blends?**. International Conference on Stability, IASH, Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, 2009.

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

SOUZA, M. M.; COLLA, T. S.; BUCKER, F.; FERRÃO, M. F.; TE, C. H.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, M. **Biodegradation potential of *Serratiamarcescens* for diesel/biodiesel blends**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 110, p. 141-146, 2016.

TAMADA, I. S. **Biodegradação e Avaliação Fitotoxicológica do Diesel e Biodiesel**. Rio Claro. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

TAMURA, K. *et al.* **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. Molecular Biology and Evolution, v. 28, p. 2731-2739. 2011.

USMAN, M. M.; DADRASNIA, A.; KANG TZIN LIM, MAHMUD, A. F.; ISMAIL, S. **Application of biosurfactants in environmental biotechnology; remediation of oil and heavy metal.** AIMS Bioengineering, v. 3, p. 289-304. 2016.

VAZ, F. de S. **Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento.** Goiânia. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

VIDAL, F.; ZEENI, N. F. A. **Estudo da viabilidade econômica da produção de biodiesel e glicerina a partir de fontes alternativas.** São Paulo. 2012. 78 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso II) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

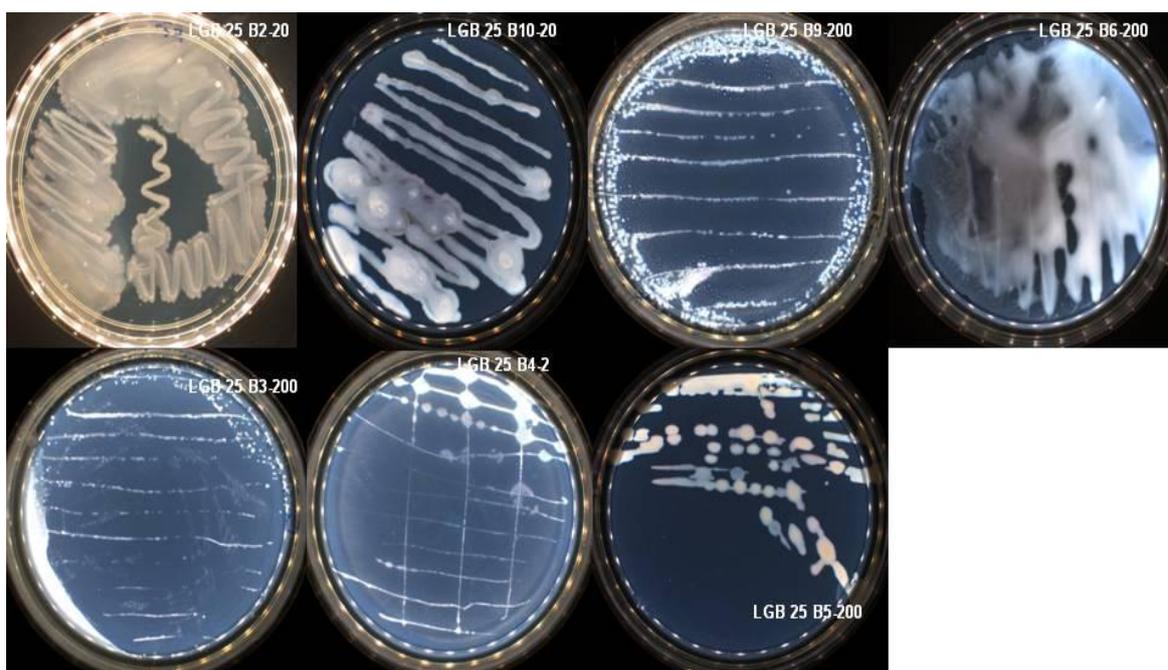
ZEIGLER, D. R. **The Family Paenibacillaceae,** Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, Part 5, Setembro, 2013.

ZHENG ZHANG, SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; Miller, W. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14. 2000.

ZIMMER, A. **Monitoramento e controle da contaminação microbiana durante o armazenamento simulado de misturas Diesel/Biodiesel com o uso de biocida.** Porto Alegre. 2014. 180f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

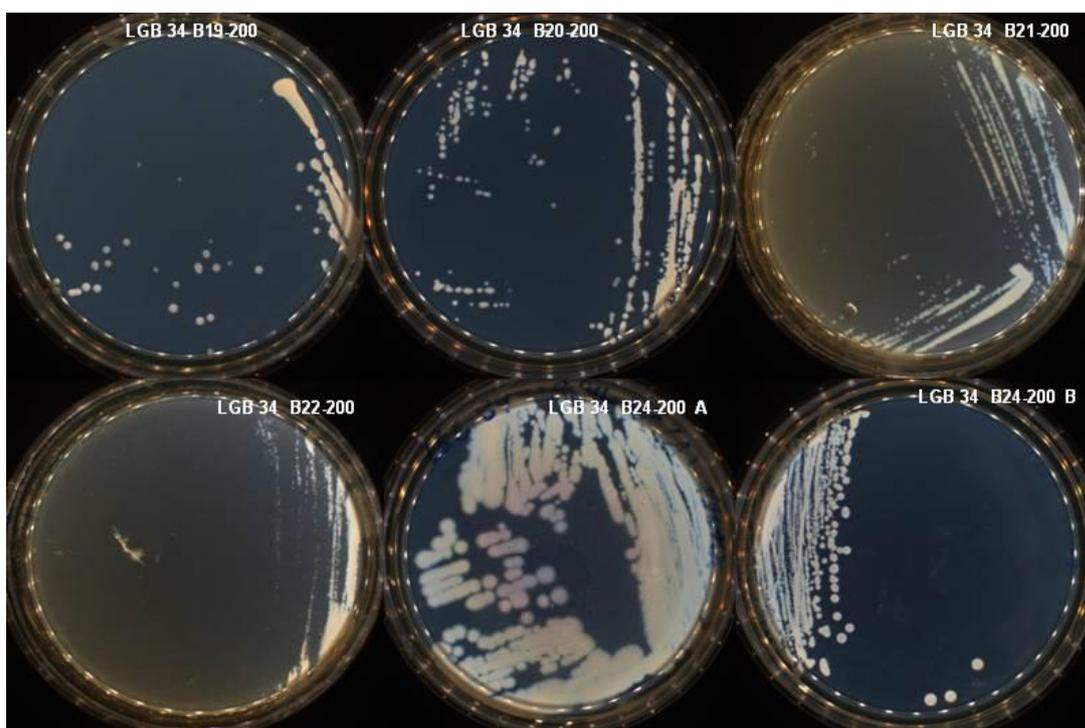
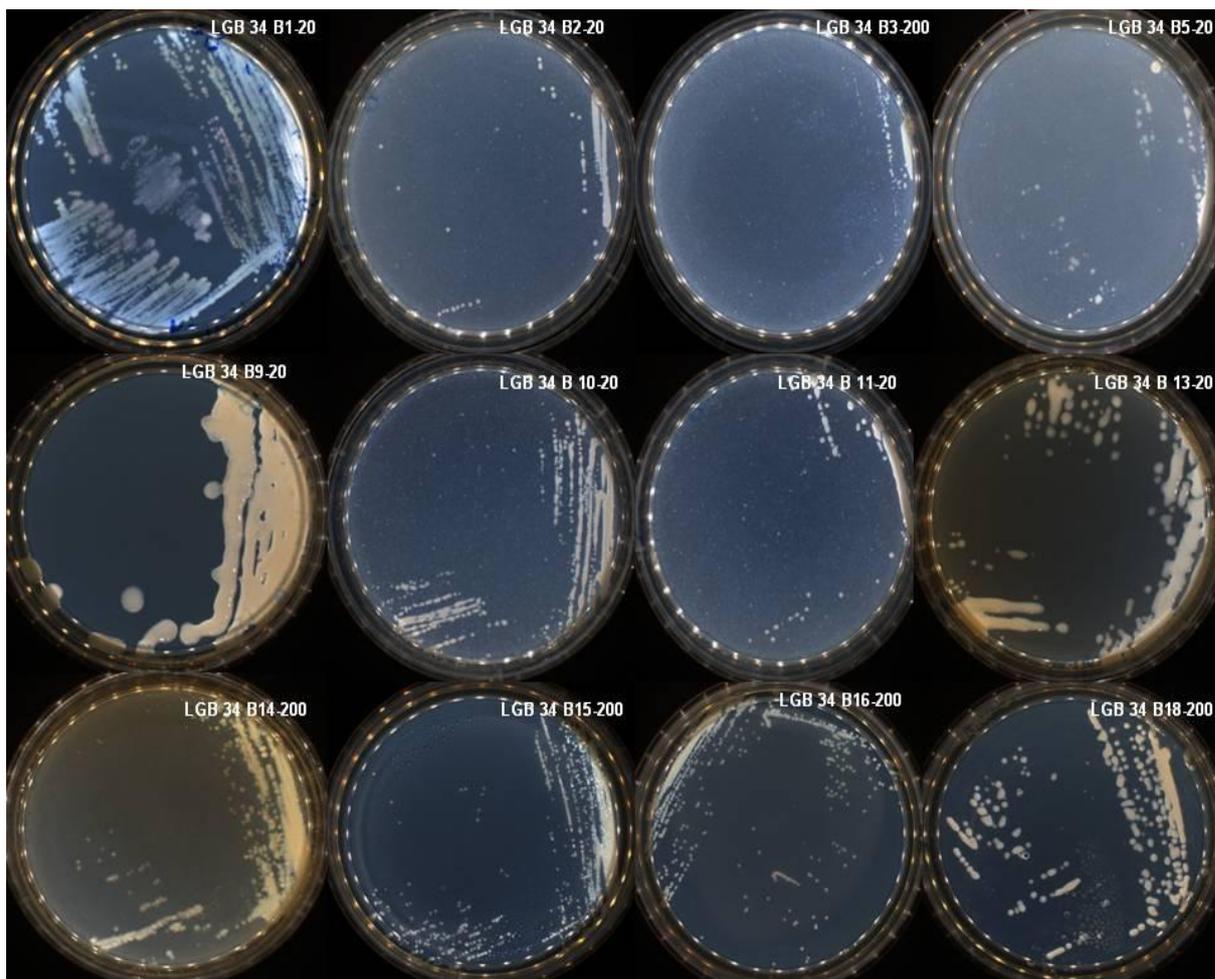
WANG, X. *et al.* Draft Genome Sequence of *Brevibacillus panacihumi* Strain W25, a Halotolerant Hydrocarbon-Degrading Bacterium. **Genome announcements,** v. 2, p. e01215-13, 2014.

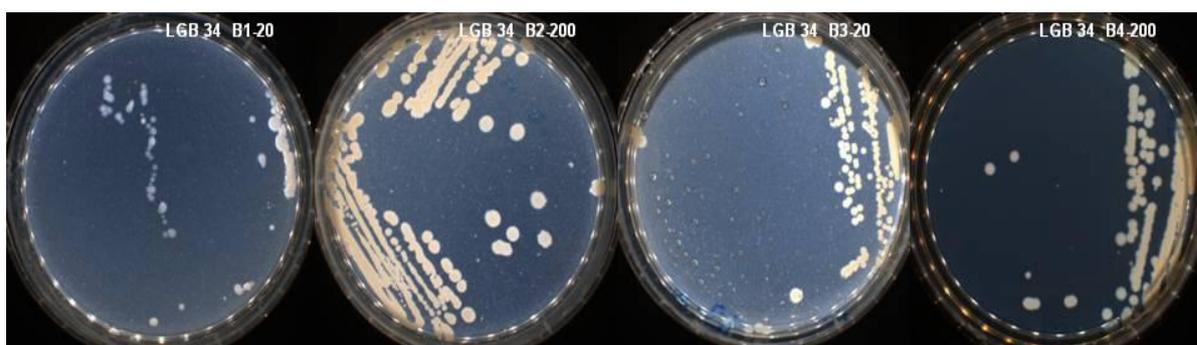
WOO, P. C. Y. ; LAU, S. K. P. ; TENG , J. L. L .; TSE, H.; Yuen, K. Y. **Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories.** Clinical Microbiology and Infection. v. 14, p. 908–934, 2008.

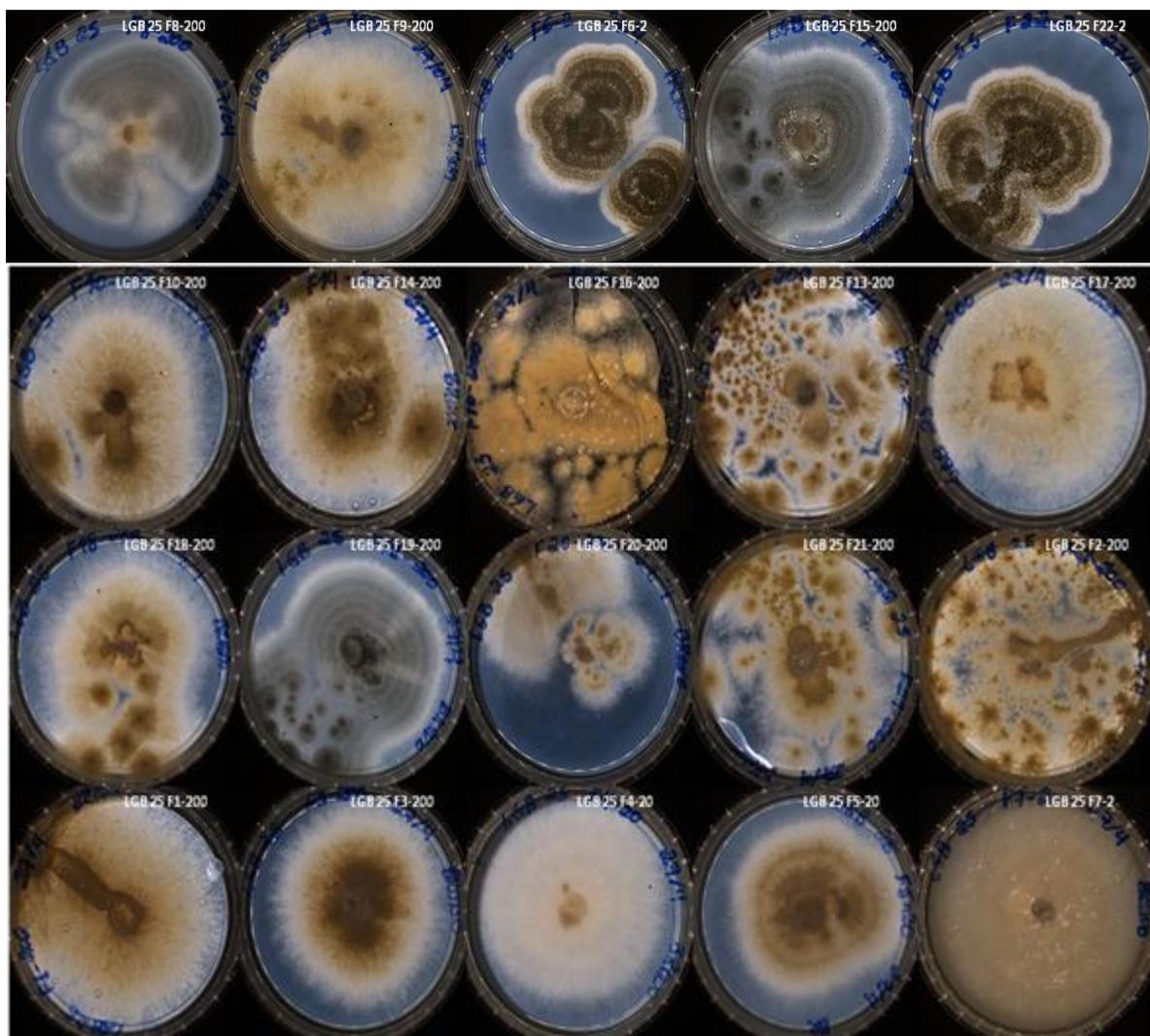
Anexo 1– Fotos das bactérias isoladas do diesel A (LGB 25) sem armazenamento.

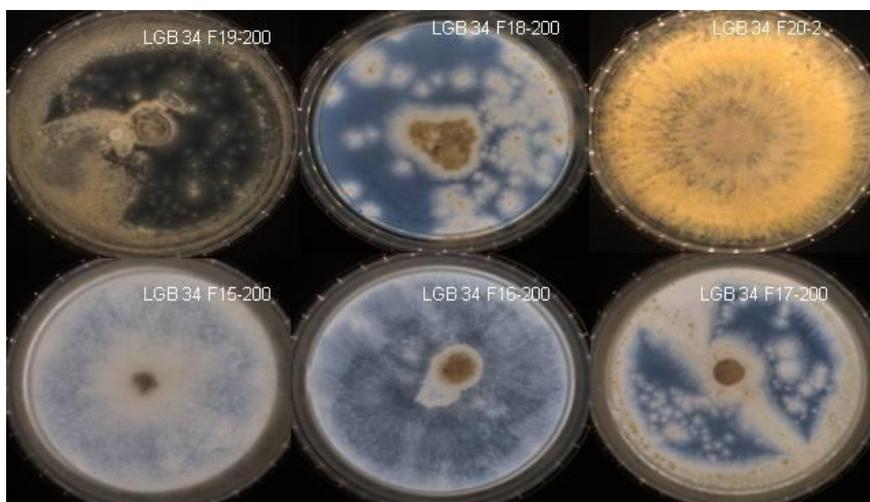
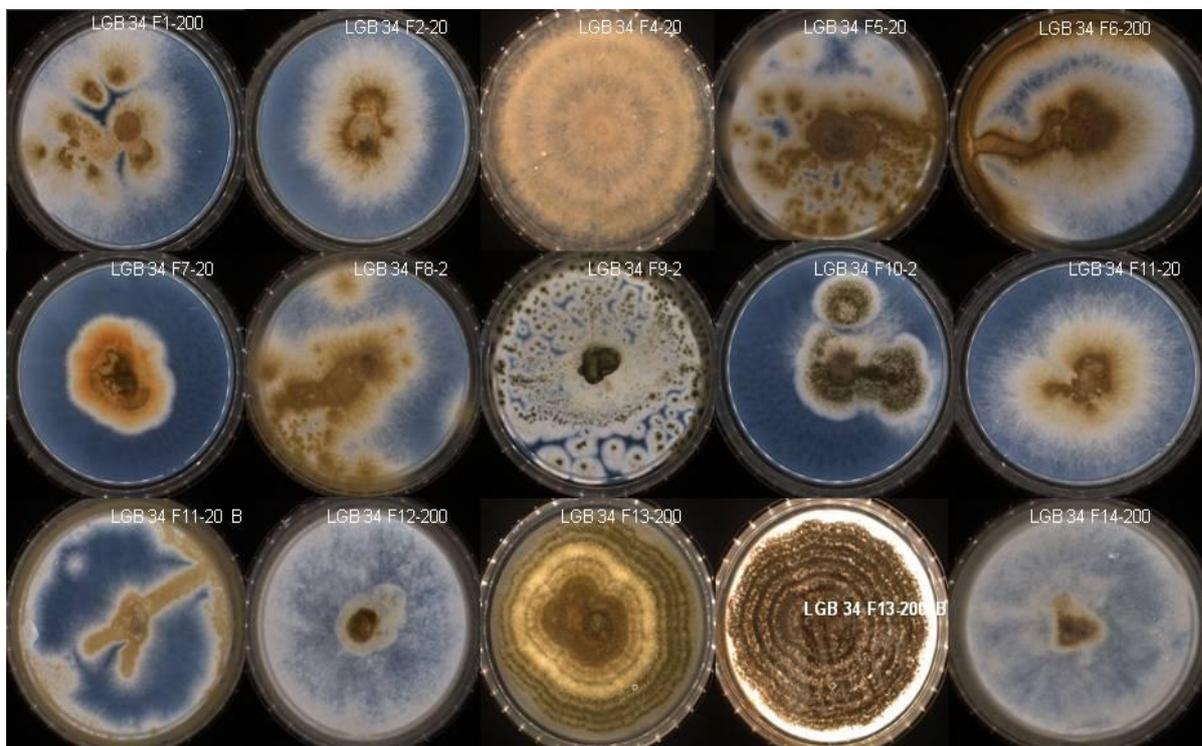
Anexo 2 – Fotos das bactérias isoladas do diesel A (LGB 25) 60 dias de armazenamento.



Anexo 3 – Fotos das bactérias isoladas do diesel B (LGB 34) sem armazenamento.

Anexo 4 - Fotos das bactérias do diesel B (LGB 34) 60 dias de armazenamento.

Anexo 5 – Fotos dos fungos isolados amostra de diesel A (LGB 25) 0 dias.

Anexo 6 - Fotos dos fungos isolados amostra de diesel B (LGB 34) 0 dias.

Anexo 7 - Tabela 4 - Bactérias isoladas do diesel A (LGB 25) não armazenado (0 dias). Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está a chave de acesso fornecida pelo banco de dados RDP, na terceira coluna o score (porcentagem de similaridade entre o DNA da amostra e o DNA do banco de dados) fornecido pelo RDP, na quarta coluna a espécie-tipo referente à sequência, na quinta coluna o código da cepa e na sexta coluna o número de acesso da sequência do RDP.

Amostra	Similaridade	Espécie alinhada	Cepa	Chave de acesso da cepa
LGB_25_B3_200	0.979	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (T)	BCRC 17757	EU179327
	0.944	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> (T)	XIL14	AY427832
	0.959	<i>Paenibacillus pabuli</i> (T)	HSCC 492T (NRRL NRS-924T)	AB045094
	0.940	<i>Paenibacillus tundrae</i> (T)	A10b	EU558284
	0.923	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i> (T)	L10	JF811909
LGB_25_B4_2	0.979	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (T)	BCRC 17757	EU179327
	0.944	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> (T)	XIL14	AY427832
	0.959	<i>Paenibacillus pabuli</i> (T)	HSCC 492T (NRRL NRS-924T)	AB045094
	0.940	<i>Paenibacillus tundrae</i> (T)	A10b	EU558284
	0.923	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i> (T)	L10	JF811909
LGB_25_B5_200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_25_B9_200_2	0.931	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (T)	DSM 2898T	AJ310083
	0.974	<i>Lysinibacillus macroides</i> (T)	LMG 18474	AJ628749
	0.945	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i> (T)	10a	AB199591
	0.956	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (T)	XDB9	FJ477040
	0.974	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> (T)	NCCP-54	AB558495
LGB_25_B10_20	0.947	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781

Anexo 8 – Tabela 5 - Bactérias isoladas do diesel armazenado por 60 dias. Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está a chave de acesso fornecida pelo banco de dados RDP, na terceira coluna o score (porcentagem de similaridade entre o DNA da amostra e o DNA do banco de dados) fornecido pelo RDP, na quarta coluna a espécie-tipo referente à sequência, na quinta coluna o código da cepa e na sexta coluna o número de acesso da sequência do RDP.

Amostra	Similaridade	Espécie alinhada	Cepa	Chave de acesso da cepa
LGB_25_60_DIAS_B1-20 A	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.983	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.979	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (T)	CBMB205	EU194897
	0.992	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.992	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_25_60_DIAS_B1-20 B	0.996	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.987	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.969	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.969	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.985	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B3-20	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
LGB_25_60_DIAS_B6-20	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.974	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.974	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.986	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B7-20	0.984	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.992	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.965	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.965	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844

	0.986	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B8-20	0.998	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.979	<i>Bacillus mojavenensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.980	<i>Bacillus vallismortis</i> (T)	DSM11031	AB021198
	0.997	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.994	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_25_60_DIAS_B9-20	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.972	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.972	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.985	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B10-20	0.998	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.995	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.995	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
LGB_25_60_DIAS_B11-20	0.972	<i>Bacillus altitudinis</i> (T)	41KF2b	AJ831842
	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.972	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.980	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B12-20	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.974	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.974	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.986	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B13-20	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.972	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841

	0.972	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.981	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B14-20	0.972	<i>Bacillus altitudinis</i> (T)	41KF2b	AJ831842
	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.971	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.985	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B15-2	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	1.000	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B16-2	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	1.000	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B18-2	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	1.000	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B19-2	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	1.000	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B20-2	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	1.000	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281

	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B21-2	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	1.000	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B22-2	0.985	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.993	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.967	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.967	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.989	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B23-2	0.982	<i>Janibacter melonis</i> (T)	CM2104	AY522568
	0.934	<i>Janibacter anophelis</i> (T)	CCUG 49715; H2.16B	AY837752
	0.925	<i>Janibacter hoylei</i> (T)	DSM 21601	FR749912
	0.924	<i>Janibacter alkaliphilus</i> (T)	SCSIO 10480	JN160681
	0.924	<i>Knoellia locipacati</i> (T)	DMZ1	HQ171909
LGB_25_60_DIAS_B24-2	0.995	<i>Bacillus anthracis</i> (T)	ATCC 14578	AB190217
	0.994	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.994	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.994	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.994	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
LGB_25_60_DIAS_B25-2	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	0.995	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B26-2	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877

	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
	0.998	<i>Bacillus cereus</i> (T)	ATCC 14579	AE016877
LGB_25_60_DIAS_B27-2	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	0.995	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B28-2	0.993	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	0.993	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	0.998	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	0.998	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	0.998	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B29-2	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	0.995	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	1.000	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B30-2	0.984	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.992	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.965	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.965	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.986	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B31-2	0.985	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.993	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.968	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.968	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.989	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147

LGB_25_60_DIAS_B32-200	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	CNCM I-1012/NCIB 40112	AJ310100
	0.995	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T)	IAM 12077	D16281
	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
	0.995	<i>Bacillus toyonensis</i> (T)	BCT-7112	CP006863
LGB_25_60_DIAS_B34-200	0.999	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.980	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.980	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.995	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_25_60_DIAS_B35-200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_25_60_DIAS_B36-200	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.975	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.975	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.984	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B37-200	0.994	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (T)	CBMB205	EU194897
	0.995	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.995	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB43	CP000560
	0.995	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB44	CP000560
	1.000	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB45	CP000560
LGB_25_60_DIAS_B38-200	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.974	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.974	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844

	0.986	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B39-200	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.975	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.975	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.984	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_25_60_DIAS_B40-200	1.000	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.990	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.974	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.974	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.986	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147

Anexo 9 - Tabela 6- Bactérias isoladas do diesel B (LGB 34) não armazenado (0 dias). Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está a chave de acesso fornecida pelo banco de dados RDP, na terceira coluna o score (porcentagem de similaridade entre o DNA da amostra e o DNA do banco de dados) fornecido pelo RDP, na quarta coluna a espécie-tipo referente à sequência, na quinta coluna o código da cepa e na sexta coluna o número de acesso da sequência do RDP.

Amostra	Similaridade	Espécie	Cepa	Chave de acesso da cepa
LGB_34_0_DIAS_B1-20	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B2-20	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B5-20	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B9-20	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.983	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.993	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T)	FZB42	CP000560
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B10-20	0.995	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.982	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.986	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	1.000	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.992	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781

LGB_34_0_DIAS_B11-20	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.982	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B12-20	0.995	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.981	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.978	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.991	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.991	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B13-20	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.983	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B14-200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.983	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B15-200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.991	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B16-200	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.983	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.979	<i>Bacillus methylophilus</i> (T)	CBMB205	EU194897
	0.992	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.992	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781

LGB_34_0_DIAS_B17-200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.991	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B18-200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.982	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B20-200	1.000	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.987	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.991	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.996	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.996	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B21-200	0.995	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.987	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.969	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.969	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.992	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_34_0_DIAS_B22-200	0.995	<i>Bacillus pumilus</i> (T)	ATCC 7061	AY876289
	0.987	<i>Bacillus safensis</i> (T)	FO-036b	AF234854
	0.969	<i>Bacillus stratosphericus</i> (T)	41KF2a	AJ831841
	0.969	<i>Bacillus aerophilus</i> (T)	28K	AJ831844
	0.992	<i>Bacillus invictae</i> (T)	Bi.FFUP1	JX183147
LGB_34_0_DIAS_B24-200 A	1.000	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.982	<i>Bacillus mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.989	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.995	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351

	0.992	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781
LGB_34_0_DIAS_B24-200 B	1.000	<i>Bacillus tequilensis</i> (T)	10b	HQ223107
	0.983	<i>Bacillus Mojavensis</i> (T)	IFO15718	AB021191
	0.987	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	NRRL B-23049	AF074970
	0.995	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM10	AJ276351
	0.992	<i>Bacillus subtilis</i> (T)	DSM22148	HE582781

Anexo 10 – Tabela 7 - Bactérias isoladas do diesel B (LGB 34) armazenado por 60 dias. Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está a chave de acesso fornecida pelo banco de dados RDP, na terceira coluna o score (porcentagem de similaridade entre o DNA da amostra e o DNA do banco de dados) fornecido pelo RDP, na quarta coluna a espécie-tipo referente à sequência, na quinta coluna o código da cepa e na sexta coluna o número de acesso da sequência do RDP.

Amostra	Similaridade	Espécie alinhada	Cepa	Chave de acesso da cepa
LGB_34_60_DIAS_B1-20	0.965	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.965	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.963	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.965	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.965	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
LGB_34_60_DIAS_B2-200	0.964	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.964	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.962	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.964	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.963	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
LGB_34_60_DIAS_B3-20	0.961	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.961	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.959	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.961	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002
	0.960	<i>Bacillus licheniformis</i> (T)	ATCC 14580; DSM 13	CP000002

Anexo 11 - Tabela 8 - Fungos isolados do diesel A sem armazenamento (LGB 25). Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está o genero fornecido pelo banco de dados NCBI BLAST, na terceira coluna o score (O cálculo de score é uma medida da perfeição do alinhamento encontrado) fornecido pelo NCBI BLAST, na quarta coluna e-value (O e-value nos dá a probabilidade de um alinhamento ter sido obtido ao acaso. Neste caso, a probabilidade é nula - e-value=0), e na quinta coluna o número de acesso da sequência do NCBI BLAST.

Amostra	Descrição	Score	E value	Acesso
LGB 25 1-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1122	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1105	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1085	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1085	0.0	KC157758
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1074	0.0	KU556514
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU063 AN-2016 [ascomycetes]	1066	0.0	KU556545
LGB 25 2-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1134	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1099	0.0	KU556515
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1096	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU063 AN-2016 [ascomycetes]	1083	0.0	KU556545
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1081	0.0	KU556514
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1077	0.0	KC157758
LGB 25 3-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	1037	0.0	KU556516
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1037	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys nivea</i> [ascomycetes]	1027	0.0	KP100548
	<i>Byssochlamys nivea</i> strain F60d5c2 18S	1027	0.0	GQ241275
	<i>Byssochlamys nivea</i> strain KUC5008 18S	966	0.0	U18361
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	998	0.0	KC157758
LGB 25 4-20 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1120	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1103	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1085	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1083	0.0	KC157758
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1074	0.0	KU556514
LGB 25 5-200 NCBI	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1151	0.0	KU556494

BLAST	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1123	0.0	KU556544
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1109	0.0	KU556515
	Paecilomyces sp. M1717 [ascomycetes]	1105	0.0	KC157758
	Byssochlamys sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1099	0.0	KU556514
LGB 25 6-2 NCBI BLAST	Aspergillus tamaraii [ascomycetes]	1155	0.0	KP784375
	Aspergillus parasiticus [ascomycetes]	1101	0.0	HQ340110
	Aspergillus transmontanensis [ascomycetes]	1101	0.0	HQ340105
	Aspergillus oryzae [ascomycetes]	1098	0.0	KP256849
	Aspergillus sp. BAB-5666 [ascomycetes]	1092	0.0	KU745410
LGB 25 7-2 NCBI BLAST	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	837	0.0	KU556544
	Byssochlamys sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	837	0.0	KU556516
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	837	0.0	KU556515
	Byssochlamys sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	837	0.0	KU556514
	Paecilomyces dactylethromorphus [ascomycetes]	837	0.0	J389951
LGB 25 8-200 NCBI BLAST	Byssochlamys sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	837	0.0	KU556494
	uncultured Aspergillus [ascomycetes]	1037	0.0	HG936917
	Aspergillus fumigatus [ascomycetes]	1037	0.0	KR023997
	Aspergillus sp. 5 BRO-2013 [ascomycetes]	1037	0.0	KF367538
	Aspergillus sp. 4 BRO-2013 [ascomycetes]	1037	0.0	KF367537
	Aspergillus sp. 2 BRO-2013 [ascomycetes]	1037	0.0	KF367498
LGB 25 9-200 NCBI BLAST	Byssochlamys sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1168	0.0	KU556494
	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1133	0.0	KU556544
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1125	0.0	KU556515
	Byssochlamys sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1114	0.0	KU556514
	Paecilomyces sp. M1717 [ascomycetes]	1112	0.0	KC157758
LGB 25 10-200 NCBI BLAST	Byssochlamys sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1147	0.0	KU556494
	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1125	0.0	KU556544
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1110	0.0	KU556515
	Paecilomyces sp. M1717 [ascomycetes]	1107	0.0	KC157758
	Byssochlamys sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1099	0.0	KU556514
LGB 25 13-200 NCBI BLAST	Byssochlamys sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	1061	0.0	KU556516
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1061	0.0	KU556494
	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1038	0.0	KU556544

	<i>Byssochlamys nivea</i> [ascomycetes]	1020	0.0	KP100548
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1018	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1014	0.0	KC157758
LGB 25 14-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1164	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1129	0.0	KU556515
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1125	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1110	0.0	KU556514
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU063 AN-2016 [ascomycetes]	1107	0.0	KU556545
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1107	0.0	KC157758
LGB 25 15-200 NCBI BLAST	uncultured <i>Aspergillus</i> [ascomycetes]	1122	0.0	HG936917
	<i>Aspergillus fumigatus</i> [ascomycetes]	1122	0.0	KR023997
	<i>Aspergillus</i> sp. 5 BRO-2013 [ascomycetes]	1122	0.0	KF367538
	<i>Aspergillus</i> sp. 4 BRO-2013 [ascomycetes]	1122	0.0	KF367537
	<i>Aspergillus</i> sp. 2 BRO-2013 [ascomycetes]	1122	0.0	KF36749
LGB 25 16-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	1050	0.0	KU556516
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1050	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys nivea</i> [ascomycetes]	1033	0.0	KP100548
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1027	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1009	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1003	0.0	KC157758
LGB 25 17-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	1050	0.0	KU556516
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1050	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys nivea</i> [ascomycetes]	1033	0.0	KP100548
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1027	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1009	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1003	0.0	KC157758
LGB 25 18-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1109	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1092	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	1074	0.0	KU556516
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1072	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1072	0.0	KC157758
LGB 25 19-200 NCBI BLAST	uncultured fungus [fungi]	1125	0.0	KT758165
	<i>Aspergillus fumigatus</i> [ascomycetes]	1125	0.0	KT972124
	uncultured <i>Aspergillus</i> [ascomycetes]	1125	0.0	HG936917
	<i>Aspergillus</i> sp. 5 BRO-2013 [ascomycetes]	1125	0.0	KF367538
	<i>Aspergillus</i> sp. 4 BRO-2013 [ascomycetes]	1125	0.0	KF367537
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1147	0.0	KU556494

BLAST	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1125	0.0	KU556544
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1110	0.0	KU556515
	Paecilomyces sp. M1717 [ascomycetes]	1107	0.0	KC157758
LGB 25 21-200 NCBI BLAST	Byssochlamys sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1099	0.0	KU556514
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1131	0.0	KU556494
	Byssochlamys sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1114	0.0	KU556544
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1094	0.0	KU556515
	Paecilomyces sp. M1717 [ascomycetes]	1094	0.0	KC157758
	Byssochlamys sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1083	0.0	KU556514

Anexo 12 – Tabela 9 - Fungos isolados do diesel A (LGB 25) sem armazenamento. Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está a descrição e o código da cepa fornecida pelo banco de dados MYCOBANK, na terceira coluna está o score (O cálculo de score é uma medida da perfeição do alinhamento encontrado), na quarta está a similaridade %, na quinta está a % de Overlap (Porcentagem de sobreposição das sequências).

Amostra	Descrição	Score	Similaridade %	Overlap%
LGB 25 1-200 MYCOBANK	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	927,203	99,674	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	927,203	99,674	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	927,203	99,674	100
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	851,125	99,647	92,182
	CBS 251.55 FJ389951 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	851,125	99,647	92,182
LGB 25 2-200 MYCOBANK	CBS 251.55 FJ389951 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	882,083	99,113	88,959
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	882,083	99,113	88,959
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	882,083	99,113	88,959
	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	988,377	99,052	99,842
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	988,377	99,052	99,842
LGB 25 3-200 MYCOBANK	CBS 492.84 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	901,844	100	100
	CBS 990.73A Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	901,844	100	100
	CBS 368.70 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	901,844	100	100
	CBS 323.34 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	901,844	100	100
	Byssochlamys nivea strain F60d...	882,824	100	97,887
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Byssochlamys,Byssochlamys nivea SH015972.06FU GQ241275	882,824	100	97,887
	Byssochlamys nivea strain KUC5...	882,824	100	97,887
LGB 25 4-20 MYCOBANK	Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	944,638	99,836	100
	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	944,638	99,836	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	944,638	99,836	100
	CBS 251.55 FJ389951 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	873,314	99,823	92,623
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	873,314	99,823	92,623
LGB 25 5-20 MYCOBANK	Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	989,017	100	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	989,017	100	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces	989,017	100	100

	dactylethromorphus NLink1309: ITS			
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	895,504	100	90,53
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	895,504	100	90,53
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Byssochlamys,B yssochlamys nivea SH015972.06FU AY753338	868,559	99,818	88,122
LGB 25 6-2 MYCOBANK	Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	992,187	100	98,892
	Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	992,187	100	98,892
	Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	992,187	100	98,892
	Aspergillus tamarii culture-co...	992,187	100	98,892
	Aspergillus tamarii strain 122...	992,187	100	98,892
LGB 25 7-2 MYCOBANK	Byssochlamys sp. OTU033 AN-201...	720,693	99,563	99,349
	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	723,693	99,563	99,349
	Byssochlamys sp. OTU062 AN-201...	723,693	99,563	99,349
	Byssochlamys sp. OTU034 AN-201...	723,693	99,563	99,349
	Byssochlamys sp. OTU032 AN-201...	723,693	99,563	99,349
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-201...	723,693	99,563	99,349
LGB 25 8-200 MYCOBANK	Paecilomyces dactylethromorphus strain IARI-RPF-17	723,693	99,563	99,349
	CBS 126847 Aspergillus fumigatus, N3: rDNA sequences ITS	873,314	99,823	100
	Aspergillus fumigatus ITS Aspergillus fumigatus NLink1309: ITS	873,314	99,823	100
	Aspergillus fumigatus ITS Aspergillus fumigatus NLink1309: ITS	873,314	99,823	100
	Aspergillus fumigatus ITS Aspergillus fumigatus NLink1309: ITS	873,314	99,823	100
LGB 25 9-200 MYCOBANK	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	1003,28	100	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	1002,8	100	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	1003,28	100	100
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	895,504	100	89,241
LGB 25 10-200 MYCOBANK	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	895,504	100	89,241
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-201...	985,847	100	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	985,847	100	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	985,847	100	100
	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	985,847	100	100
	Byssochlamys sp. OTU034 AN-201...	908,184	100	92,11

	CBS 251.55 FJ389951 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	895,504	100	90,821
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-201...	911,353	100	100
	CBS 251.55 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	911,353	100	100
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU034 AN-201...	911,353	100	100
LGB 25 13-200 MYCOBANK	<i>Paecilomyces saturatus</i> ITS <i>Paecilomyces saturatus</i> NLink1309: ITS	911,353	100	100
	<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> ITS <i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> NLink1309: ITS	911,353	100	100
	<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> strain IARI-RPF-17	835,275	100	91,638
	CBS 251.55 FJ389951 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	835,275	100	91,638
	<i>Paecilomyces saturatus</i> ITS <i>Paecilomyces saturatus</i> NLink1309: ITS	1004,87	100	99,842
LGB 25 14-200 MYCOBANK	CBS 251.55 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	100,87	100	99,842
	<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> ITS <i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> NLink1309: ITS	1004,87	100	99,842
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-201...	993,771	100	98,738
	<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> strain IARI-RPF-17	895,504	100	88,959
	PWQ2344 PWQ2344 <i>Aspergillus fumigatus</i> , NLink390: ITS	824,181	100	84,804
LGB 25 15-200 MYCOBANK	<i>Aspergillus fumigatus</i> ITS <i>Aspergillus fumigatus</i> NLink1309: ITS	946,223	99,836	99,837
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ITS <i>Aspergillus fumigatus</i> NLink1309: ITS	946,223	99,836	99,837
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ITS <i>Aspergillus fumigatus</i> NLink1309: ITS	946,223	99,836	99,837
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ITS <i>Aspergillus fumigatus</i> NLink1309: ITS	946,223	99,836	99,837
	CBS 492.84 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	912,938	100	100
LGB 25 16-200 MYCOBANK	CBS 990.73A <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	912,938	100	100
	CBS 368.70 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	912,938	100	100
	CBS 323.34 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	912,938	100	100
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Byssochlamys, <i>Byssochlamys nivea</i> SH015972.06FU GQ241275	887,579	100	97,217
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae, <i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> SH015972.06FU GU968676	871,729	100	85,514
LGB 25 17-200 MYCOBANK	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae, <i>Paecilomyces saturatus</i> SH015972.06FU FJ389951	871,729	100	85,514
	<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> strain IARI-RPF-17	871,729	100	85,514
	CBS 251.55 FJ389951 <i>Paecilomyces saturatus</i> , N3: rDNA sequences ITS	871,729	100	85,514
	Fungal sp. AM2013 strain 154_R...	881,239	99,82	86,76
	SH015972.06FU KC506308 Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,fungal sp AM2013	881,239	99,82	86,76
	<i>Byssochlamys nivea</i> ITS <i>Byssochlamys nivea</i> NLink1309: ITS	1012,79	99,688	100

	Byssochlamys sp. OTU034 AN-201...	900,259	100	94,03
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-201...	954,147	99,834	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	954,147	99,834	100
LGB 25 18-200 MYCOBANK	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	954,147	99,834	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	954,147	99,834	100
	Byssochlamys sp. OTU033 AN-201...	903,429	99,825	94,693
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	890,749	99,822	93,367
	MIT194, Aspergillus fumigatus, n437: ITS sequence	966,827	100	100
	Aspergillus fumigatus ITS Aspergillus fumigatus NLink1309: ITS	966,827	100	100
LGB 25 19-200 MYCOBANK	Aspergillus fumigatus ITS Aspergillus fumigatus NLink1309: ITS	966,827	100	100
	Aspergillus fumigatus ITS Aspergillus fumigatus NLink1309: ITS	966,827	100	100
	Aspergillus fumigatus isolate ...	966,827	100	100
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-201...	985,847	100	100
LGB 25 20-200 MYCOBANK	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	985,847	100	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	985,847	100	100
	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	985,847	100	100
	Byssochlamys sp. OTU034 AN-201...	908,184	100	92,11
	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	971,582	100	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	971,582	100	100
LGB 25 21-200 MYCOBANK	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	971,582	100	100
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	895,504	100	92.157
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,P aecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	895,504	100	92.157

Anexo 13 – Tabela 10 - Fungos isolados do diesel B (LGB 34) sem armazenado. Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está o genero fornecido pelo banco de dados NCBI BLAST, na terceira coluna o score (O cálculo de score é uma medida da perfeição do alinhamento encontrado) fornecido pelo NCBI BLAST, na quarta coluna e-value (O e-value nos dá a probabilidade de um alinhamento ter sido obtido ao acaso. Neste caso, a probabilidade é nula - e-value=0), e na quinta coluna o número de acesso da sequência do NCBI BLAST.

Amostra	Descrição	Score	E value	Acesso
LGB 34 1-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1142	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1118	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1103	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1099	0.0	KC157758
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1094	0.0	KU556514
LGB 34 2-200 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1160	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1131	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1123	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1112	0.0	KC157758
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU032 AN-2016 [ascomycetes]	1109	0.0	KU556514
LGB 34 7-20 NCBI BLAST	<i>Aspergillus</i> <i>tamarii</i> [ascomycetes]	1136	0.0	KP784375
	<i>Aspergillus</i> sp. BAB-5666 [ascomycetes]	1085	0.0	KU745410
	<i>Aspergillus</i> sp. BAB-5551 [ascomycetes]	1085	0.0	KU504323
	<i>Aspergillus</i> sp. 269A [ascomycetes]	1085	0.0	GQ120970
	<i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i> [ascomycetes]	1083	0.0	KF624769
LGB 34 8-2 NCBI BLAST	<i>Aspergillus</i> <i>tamarii</i> [ascomycetes]	1138	0.0	KP784375
	<i>Aspergillus</i> sp. BAB-5666 [ascomycetes]	1092	0.0	KU745410
	<i>Aspergillus</i> sp. BAB-5551 [ascomycetes]	1092	0.0	KU504323
	<i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i> [ascomycetes]	1086	0.0	HQ340110
	<i>Aspergillus</i> <i>transmontanensis</i> [ascomycetes]	1086	0.0	HQ340105
LGB 34 19-20 NCBI BLAST	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU008 AN-2016 [ascomycetes]	1125	0.0	KU556494
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU062 AN-2016 [ascomycetes]	1103	0.0	KU556544
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU033 AN-2016 [ascomycetes]	1088	0.0	KU556515
	<i>Paecilomyces</i> sp. M1717 [ascomycetes]	1085	0.0	KC157758
	<i>Byssochlamys</i> sp. OTU034 AN-2016 [ascomycetes]	1083	0.0	KU556516

Anexo 14 – Tabela 11 - Fungos isolados do diesel B (LGB 34) sem armazenado. Na primeira coluna está o código das amostras, na segunda coluna está a descrição e o código da cepa fornecida pelo banco de dados MYCOBANK, na terceira coluna está o score (O cálculo de score é uma medida da perfeição do alinhamento encontrado), na quarta está a similaridade %, na quinta está a % de Overlap (Porcentagem de sobreposição das sequências).

Amostra	Descrição	Score	Similaridade %	Overlap %
LGB 34 1-200 MYCOBANK	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	981,092	100	100
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	981,092	100	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	981,092	100	100
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	895,504	100	91,262
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	895,504	100	91,262
	CBS 251.55 FJ389951 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	895,504	100	91,262
	Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,fungal sp AM2013 SH015972.06FU KC506308	874,899	99,819	89,482
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Byssochlamys,Byssochlamys nivea SH015972.06FU AY753338	868,559	99,818	88,835
LGB 34 2-200 MYCOBANK	Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	996,941	100	99,683
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	996,941	100	99,683
	Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	996,941	100	99,683
	CBS 251.55 FJ389951 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	895,504	100	89,524
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	895,504	100	89,524
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	895,504	100	89,524
	Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,unclassified Fungi,fungal sp AM2013 SH015972.06FU KC506308	881,239	99,820	88,413
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Byssochlamys,Byssochlamys nivea SH015972.06FU AY753338	868,559	99,818	87,143
LGB 34 7-20 MYCOBANK	Biol 2578 14682616000000054 DTO 145-C3 16236144 14682616000000009 145-C3 Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	976,337	100	100
	Biol 2206 14682616000000054 DTO 131-C2 16235772 14682616000000009 131-C2 Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	976,337	100	100

	Biol 2174 14682616000000054 DTO 130-H6 16235740 14682616000000009 130-H6 Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	976,337	100	100
	Biol 2161 14682616000000054 DTO 130-G2 16235727 14682616000000009 130-G2 Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	976,337	100	100
	Biol 2153 14682616000000054 DTO 130-F3 16235719 14682616000000009 130-F3 Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	976,337	100	100
	Biol 2263 14682616000000054 DTO 133-B1 16235829 14682616000000009 133-B1 Aspergillus tamarii ITS Aspergillus tamarii NLink1309: ITS	976,337	100	100
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Aspergillus,Aspergillus tamarii SH128405.06FU HQ340111	976,337	100	100
LGB 34 8-2 MYCOBANK	CBS 104.13 Aspergillus tamarii, N3: rDNA sequences ITS	957,317	100	97,415
	CBS 590.68 Aspergillus tamarii, N3: rDNA sequences ITS	954,147	100	97,092
	CBS 104.14 Aspergillus tamarii, N3: rDNA sequences ITS	947,808	100	97,092
	CBS 131.48 Aspergillus tamarii, N3: rDNA sequences ITS	947,808	100	96,446
	CBS 591.68 Aspergillus tamarii, N3: rDNA sequences ITS	946,223	100	96,284
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Aspergillus,Aspergillus tamarii SH128405.06FU JX110981	938,298	100	95,477
LGB 34 19-20 MYCOBANK	Biol 1261 14682616000000054 DTO 085-F4 15585461 14682616000000009 DTO 085-F4 Paecilomyces saturatus ITS Paecilomyces saturatus NLink1309: ITS	966,827	100	100
	Byssochlamys sp. OTU008 AN-201...	966,827	100	100
	CBS 251.55 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	966,827	100	100
	Biol 1866 14682616000000054 DTO 122-G2 16235432 14682616000000009 122-G2 Paecilomyces dactylethromorphus ITS Paecilomyces dactylethromorphus NLink1309: ITS	966,827	100	100
	Byssochlamys sp. OTU034 AN-201...	908,184	100	93,924
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces dactylethromorphus SH015972.06FU GU968676	895,504	100	92,611
	Fungi,Ascomycota,Eurotiomycetes,Eurotiales,Trichocomaceae,Paecilomyces,Paecilomyces saturatus SH015972.06FU FJ389951	895,504	100	92,611
CBS 251.55 FJ389951 Paecilomyces saturatus, N3: rDNA sequences ITS	895,504	100	92,611	