

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Mariane Rodrigues Lobato

**ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO BIOQUEROSENE:
ENFOQUE MICROBIOLÓGICO**

Porto Alegre

2022

Mariane Rodrigues Lobato

**ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO BIOQUEROSENE:
ENFOQUE MICROBIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento
Co-orientador: Prof. Dr. Donato Aranda

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Lobato, Mariane Rodrigues

Estabilidade ao armazenamento do bioquerosene:
enfoque microbiológico / Mariane Rodrigues Lobato. --
2022.

171 f.

Orientadora: Fátima Menezes Bento.

Coorientador: Donato Aranda.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Biodegradação. 2. Hormoconis resinae (F089). 3.
Exophiala phaeomuriformis (UFRGS Q4.2). 4.
Biocombustível de aviação. 5. GC-MS. I. Bento, Fátima
Menezes, orient. II. Aranda, Donato, coorient. III.
Título.

Mariane Rodrigues Lobato

**ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO BIOQUEROSENE:
ENFOQUE MICROBIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Donato Aranda

Aprovada em: Porto Alegre, 17 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Amanda D, Gondim

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“Porque se chamavam homens
Também se chamavam sonhos e
Sonhos não envelhecem”

Lô Borges/Márcio Borges/Milton
Nascimento

AGRADECIMENTOS

Aos amados Rita Rodrigues Lobato (*in memoriam*), Oly Lobato e Lucas Lobato Marsiglia, por todos os ensinamentos de vida. Vocês são tudo pra mim!

Ao João Carlos de Assis Brasil Haussen, pelo apoio incondicional.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento, por ter me auxiliado a concretizar esse grande desejo. Igualmente, agradeço pelos ensinamentos e pelo tempo despendido com meu aprendizado.

Ao Comandante Pedro Rodrigo Scorza (Gol Linhas Aéreas e UBRABIO) (*in memoriam*), nosso agradecimento especial pela aquisição junto á empresa Amyres-SP das amostras de bioquerosene utilizada nesse estudo.

À Dr^a Marcia Teresa Soares Lutterbach pelo envio da cepa do fungo *Hormoconis resiniae* (FO89), utilizada nesta tese e participação no Exame de Qualificação.

Ao professor Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho pela parceria em financiar o período de 15 dias em Goiânia, para que fosse realizada a montagem do experimento com os fungos e posterior análises cromatográficas. Aos membros de toda equipe do LAMES da Universidade Federal de Goiás pela calorosa acolhida, e em especial ao Emanuel Bezerra D'Alessandro, por ter realizado a análise cromatográfica e organização dos dados relativos a cromatografia.

À Professora Dr^a Vânia Marcia Duarte Pasa da Universidade Federal de Minas Gerais pelas valiosas contribuições e participação no Exame de Qualificação, momento em que foi disponibilizado a parceria em analisar por cromatografia as fases combustíveis dos ensaios com a levedura *Exophiala phaeomuriformis*. Agradecimento especial a Dr^a. Regiane Debora Fernandes Rios por ter conduzido as análises cromatográficas e pelos ensinamentos.

À professora Tânia Mara Pizolatto e alunas Nicole Lazzari e Ellen Duarte do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela análise das amostras da fase aquosa com a técnica de SPME.

Aos professores, técnicos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA): espero, de coração, ter tratado a cada um de vocês com todo carinho, respeito e honra que merecem.

À Juciana Clarice Cazarolli pela amizade.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão da bolsa.

ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO BIOQUEROSENE: ENFOQUE MICROBIOLÓGICO¹

Autor: Mariane Rodrigues Lobato

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

Co-orientador: Prof. Dr. Donato Aranda

RESUMO

Mundialmente, a aviação civil comercial utiliza o querosene de aviação que recebe tradicionalmente especial atenção durante a estocagem devido à suscetibilidade à contaminação microbiana. Ainda não se conhece o impacto da introdução do bioquerosene (2,6,10 trimetil dodecano-farnesano) com relação a formação de lodo biológico durante o armazenamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade do querosene, do bioquerosene e da mistura com 10% de bioquerosene quanto ao desenvolvimento microbiano durante armazenamento simulado. Foram conduzidos estudos de prospecção e identificação de microrganismos (ASTM D6974) com amostras de querosene e bioquerosene. Após a identificação dos microrganismos (fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias) foram realizados ensaios sobre o potencial de deterioração de combustível, utilizando o indicador redox DCPIP. O fungo *Hormoconis resiniae* (F089) foi utilizado como controle positivo. A levedura *Exophiala phaeomuriformis* (UFRGS Q4.2) foi isolada das amostras de querosene e caracterizada como deteriogênica. Foram realizadas curvas de crescimento em microcosmos (meio mineral BH e QAV, BioQAV e mistura 10% BioQAV) com *H resiniae* (F089) e *E phaeomuriformis* (UFRGS Q4.2) durante 28 dias. A cada tempo amostral (0, 7 14 21 e 28 dias) avaliou-se: formação de biomassa (interface) pH, tensão superficial (fase aquosa) e degradação dos hidrocarbonetos por GC-MS (fase combustível). Os ensaios foram feitos em triplicata. A maior produção de biomassa pelo *Hormoconis resiniae* foi em QAV (19 mg) após 28 dias e pela *Exophiala phaeomuriformis* na mistura BIOQAV-QAV 10% (70 mg) após 21 dias. Foram degradadas preferencialmente as frações de C9-C12 pelo *H. resiniae*, no entanto para a *Exophiala phaeomuriformis* não foi detectada degradação dos hidrocarbonetos avaliados. A condição com o bioquerosene puro (2,6,10 trimetil dodecano) não promoveu o crescimento (biomassa) dos fungos, porém foi constatado a viabilidade dos esporos, durante os 28 dias do ensaio. A presença de bioquerosene em futuras misturas na indústria da aviação, continuará exigindo da comunidade usuária, cuidados rígidos com as rotinas e boas práticas durante o armazenamento dos combustíveis.

Palavras-chave: Biodegradação. *Hormoconis resiniae* (F089). *Exophiala phaeomuriformis* (UFRGS Q4.2). Biocombustível de aviação. GC-MS.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (171 p.) março 2022.

BIOKEROSENE STORAGE STABILITY: MICROBIAL APPROACH²

Author: Mariane Rodrigues Lobato

Advisor: Prof. Dr. Fátima Menezes Bento

Co-Advisor: Prof. Dr. Donato Aranda

ABSTRACT

Worldwide, commercial civil aviation uses aviation jet fuel which traditionally receives special attention during storage due to its susceptibility to microbial contamination. The impact of the introduction of biojet fuel (2,6,10 trimethyl dodecane-Farnesane) on the formation of biological sludge during storage is not yet known. The objective of this work was to evaluate the susceptibility of jet fuel, biojet fuel (farnesane), and 10% farnesane blend to microbial growth during simulated storage. Prospecting and identification studies of microorganisms (ASTM D6974) were conducted with jet fuel and farnesane samples. After the identification of microorganisms (filamentous fungi, yeasts, and bacteria) tests were carried out on the potential for fuel deterioration, using the DCPIP redox indicator. *Hormoconis resiniae* (F089) was used as a positive control. The yeast *Exophiala phaeomuriformis* (UFRGS Q4.2) was isolated from jet fuel samples and characterized as deteriogenic. Growth curves were performed in microcosms (BH mineral medium; jet fuel, farnesane, and 10% farnesane blend) with *H. resiniae* (F089) and *E. phaeomuriformis* (UFRGS Q4.2) for 28 days. The biomass (interface), pH, surface tension (aqueous phase) and degradation of hydrocarbons by GC-MS (fuel phase) were evaluated using triplicates at 0,7,14,21 and 28 days. The highest biomass production by *H. resiniae* was in jet fuel (19 mg) after 28 days and by *E. phaeomuriformis* in the 10% farnesane blend (70 mg) after 21 days. C9-C12 fractions were preferentially degraded by *H. resiniae*, however, for *E. phaeomuriformis*, no degradation of the evaluated hydrocarbons was detected. The treatment using only farnesane (2,6,10 trimethyl dodecane) did not promote the growth (biomass) of the fungi, but the viability of the spores was verified during the 28 days of the test. The presence of bio jet fuel in future blends in the aviation industry will continue to require strict routine care and best practices from the user community during fuel storage.

Keywords: Biodegradation. *Hormoconis resiniae* (F089). *Exophiala phaeomuriformis* (UFRGS Q4.2). Biocombustível de aviação. GC-MS.

² Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (171 p.) March, 2022.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

- Figura 1** – Composição de Jet A. n-alcanos, isoalcanos, cicloalcanos e aromáticos apresentam distribuição aparentemente normal com relação ao número de carbonos28
- Figura 2** – Produção de iso-alcanos por craqueamento e isomerização de moléculas grandes, síntese de moléculas pequenas ou fermentação.37
- Figura 3** – Riscos e conseqüências da contaminação microbiana em combustíveis de aviação55
- Figura 4**– Visão geral dos padrões JIG mapeados e a cadeia de abastecimento de combustíveis de aviação.62

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Principais eventos relacionados a participação microbiana durante a estocagem no mundo e no Brasil com querosene de aviação e bioquerosene.....71
- Figura 2** – Visualização do sistema de armazenamento de distribuição de combustíveis de aviação, da refinaria ao tanque da aeronave.....72
- Figura 3** – Aspecto ilustrativo de um tanque aéreo de estocagem de querosene, em situação inadequada, devido a a presença de água livre (á esquerda), á direita, as condições encontradas para a formação de lodo biológico: presença de água (1°); fungos e bactérias nativos (2°); disponibilidade de nutrientes minerais, temperatura e pH (3°)73
- Figura 4** – Estocagem simulada em microcosmos com Querosene (A) e Bioquerosene (B) com o fungo *Hormoconis resiniae* e com o fungo *Cladosporium halotolerans* em Querosene (C) e Bioquerosene (D) após 28 dias. As setas indicam biomassa fúngica90
- Figura 5** – Aspecto da biomassa retida pela filtração em membrana após 28 dias em Querosene (A) com o fungo *Hormoconis resiniae* e em Bioquerosene (B) com o fungo *Cladosporium halotolerans*.....91
- Figura 6**- Capa do Livro: Coletânea Estudos Ambientais e Agronômicos; resultados para o Brasil / Camila Pinheiro Nobre e Anna Christina Sanazario de Oliveira (Org.). São Luís: Editora Pascal LTDA, 202097

Figura 7 – Autores do capítulo: PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO E BIOQUEROSENE DURANTE ESTOCAGEM. SIMULADA. Coletânea Estudos Ambientais e Agronômicos; resultados para o Brasil / Camila Pinheiro Nobre e Anna Christina Sanazario de Oliveira (Org.). São Luís: Editora Pascal LTDA, 2020.....98

CAPÍTULO 2

Figura 1- Valores de biomassa (mg) formados na interface de um microcosmos com meio mineral e QAV, BIOQAV e com a mistura BIOQAV-QAV 10% após 7, 14, 21 e 28 dias, inoculado com o fungo *Hormoconis resinæ* 116

Figura 2- Aspecto dos microcosmos aos 28 dias (à direita) e com a biomassa recuperada em membranas filtrantes (a esquerda) da interface com QAV, BIOQAV e mistura 10% BIOQAV-QAV com meio BH e o fungo *Hormoconis resinæ*..... 117

Figura 3- Valores de biomassa (mg) formados na interface de um microcosmos com meio mineral e QAV, mistura BIOQAV-QAV 10% e com BIOQAV após 7,14,21 e 28 dias, inoculados com o fungo leveduriforme *Exophiala phaeomuriformis* 121

Figura 4- Aspecto dos microcosmos aos 21 dias (à esquerda) e com a biomassa recuperada em membranas filtrantes (à direita) da interface com QAV, BIOQAV e 10% BIOQAV-QAV em meio BH com o fungo leveduriforme *Exophiala phaeomuriformis*..... 123

Figura 5- Cromatograma com os picos de retenção obtidos para a condição de Querosene **(A)** e Querosene com o fungo *Hormoconis resinæ* **(B)** após 28 dias de incubação com o meio mineral Bushnell-Haas..... 148

Figura 6- Cromatograma com os picos de retenção obtidos para a condição de Bioquerosene **(A)** e Bioquerosene com o fungo *Hormoconis resinæ* **(B)** após 28 dias de incubação com o meio mineral Bushnell-Haas 149

Figura 7- Cromatograma com os picos de retenção obtidos para a condição da Mistura Querosene-Bioquerosene (10%) **(A)** e Mistura Querosene-Bioquerosene (10%) com o fungo *Hormoconis resinæ* **(B)** após 28 dias de incubação com o meio mineral Bushnell-Haas 150

Figura 8- Cromatograma com os picos de retenção obtidos para a condição da Mistura Querosene- **(A)** e Querosene com a levedura *Exophiala phaeomuriformis*

(UFRGS Q4.2) (B) após 28 dias de incubação com o meio mineral Bushnell-Haas 150

Figura 9- Cromatograma com os picos de retenção obtidos para a condição de Bioquerosene **(A)** e Bioquerosene com a levedura ***Exophiala phaeomuriformis*** **(UFRGS Q4.2) (B)** após 28 dias de incubação com o meio mineral Bushnell-Haas 152

Figura 10- Cromatograma com os picos de retenção obtidos para a condição da Mistura Querosene-Bioquerosene (10%) **(A)** e Mistura Querosene-Bioquerosene (10%) com a levedura ***Exophiala phaeomuriformis*** **(UFRGS Q4.2) (B)** após 28 dias de incubação com o meio mineral Bushnell-Haas..... 153

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Tabela 1 – Propriedades Bulk do querosene de aviação.....	29
Tabela 2 – Propriedades Trace do querosene de aviação.....	30
Tabela 3 – Resumo das rotas e ano de certificação pela ASTM	33

CAPÍTULO 1

Tabela 1 –Tipo de combustível, aspecto da colônia em meio de cultura e imagens de estruturas de reprodução (em microscopio ótico com 100X aumento) e identificação dos isolados por sequenciamento de bases da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA, e respectivos códigos de acesso ao Genbank	80
Tabela 2 – Tipo de combustível, aspecto das colônias em meio de cultura pela técnica de esgotamento e identificação dos isolados por Maldi-Tof	82
Tabela 3 – Valores do peso seco da biomassa (mg) formada na interface combustível-água dos fungos filamentosos no querosene, bioquerosene e nas misturas bioquerosene 10% e 20%, após 28 dias em meio mineral Bushnell-Haas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey	88

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Avaliação preliminar da degradabilidade de <i>Hormoconis resiniae</i> (F089) e <i>Exophiala phaeomuriformis</i> (UFRGS Q4.2) na presença de querosene (QAV), bioquerosene (BioQAV) e na mistura 10% bioquerosene em querosene (BioQAV-QAV 10%) com o indicador redox-DCPIP	113
Tabela 2 - Valores médios das medidas de tensão superficial e pH da fase aquosa dos diferentes tratamentos: querosene, bioquerosene e mistura 10% bioquerosene em querosene, com e sem (controles negativos) do fungo leveduriforme <i>Exophiala phaeomuriformis</i> (UFRGS Q4.2) ao final de 21 dias e do fungo <i>Hormoconis resiniae</i> ao final de 28 dias	127
Tabela 3 - Compostos majoritários avaliados no querosene de aviação comercial (QAV), após 28 dias com inóculo do fungo <i>Hormoconis resiniae</i> e controle.....	145
Tabela 4 - Compostos majoritários avaliados no bioquerosene puro (BioQAV) após 28 dias com o fungo <i>Hormoconis resiniae</i> e controle.....	145

Tabela 5- Compostos majoritários avaliados na mistura 10% BioQAV, após 28 dias com o fungo <i>Hormoconis resinæ</i> e controle negativo	145
Tabela 6- Compostos majoritários avaliados no querosene de aviação comercial (QAV) após 28 dias com inóculo do fungo <i>Exophiala phaeomuriformis</i> e controle. Média das porcentagens de área dos picos na condição inicial e final.....	146
Tabela 7- Compostos majoritários avaliados no bioquerosene (BioQAV) após 28 dias com o fungo <i>Exophiala phaeomuriformis</i> e controle. Média das porcentagens de área dos picos na condição inicial e final	147
Tabela 8- Compostos majoritários avaliados na mistura 10% BioQAV após 28 dias com o fungo <i>Exophiala phaeomuriformis</i> e controle. Média das porcentagens de área dos picos na condição inicial e final	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
°F	Graus Fahrenheit
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFQRJS	Requisitos de Qualidade de Combustíveis de Aviação para Sistemas Operados Conjuntamente (<i>Aviation Fuel Quality Requeriment for Jointly Operated Systems</i>)
ANAC	Agência Nacional de Aviação civil
ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APR	Reforma em fase líquida (<i>Aqueous Phase Reforming</i>)
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i> (Sociedade Americana de Testes e Materiais)
Atm	Atmosfera
ATP	Adenosina Trifosfato
B-52	Avião produzido pela Boeing
BEA	Boletim Especial de Aeronavegabilidade
BDA	Ágar Batata Dextrose
BH	Bushnell e Haas meio mineral
BioQAV	Bioquerosene de aviação
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CAAFI	Combustíveis Alternativos para Aviação Comercial (<i>Commercial Aviation Alternative Fuels</i>)
CIM	Corrosão Influenciada por Microrganismos (<i>Microbiologically Influenced Corrosion- MIC</i>)
CoA	Coenzima A

CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de Carbono
CORSIA	Programa da organização aviação civil internacional para a redução e compensação de emissões de CO ₂ (<i>Carbon Offsetting and Reduction Scheme for International Aviation</i>)
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio (<i>Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium</i>)
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
di-EGME	Éter Dietílico de Etileno Glicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O	Densidade Ótica
Drop in	Combustíveis compatíveis e que podem ser misturados em proporção específica ao combustível de aviação convencional
EDXRF	Fluorescência de Raio X por Energia Dispersiva (<i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i>)
EGME	Éter Monometílico de Etileno Glicol
ELISA	Enzimaimunoensaio (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FSII	Inibidor de congelamento em sistema de combustível (<i>Fuel System Icing Inhibitor</i>)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformado de Fourier e Refletância Atenuada Total (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
G	Gramas
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas
GEE	Gases do efeito estufa
h	Hora
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

HPLC-IR	Cromatografia líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) com detector de Índice de Refração
IATA	Associação Internacional de Transportes Aéreos
ICAO	Organização da Aviação Civil Internacional (<i>International Civil Aviation Organization</i>)
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
IP	Instituto do Petróleo
ITS	Separador Transcrito Interno (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Jet A	Combustível de aviação de origem fóssil com ponto de congelamento máximo de 40 ^o C negativos destinado ao consumo em turbinas de aeronaves.
Jet A-1	Combustível de aviação de origem fóssil com ponto de congelamento máximo de 47 ^o C negativos destinado ao consumo em turbinas de aeronaves.
Jet B	Combustível de aviação feito de nafta-querosene mais indicado para utilização em regiões frias.
Jet C	Combustível destinado exclusivamente ao consumo em turbinas de aeronaves, composto de um único tipo de Jet alternativo misturado ao Jet-A ou ao Jet-A1 em proporções definidas.
JFTOT	Aparelho para testagem da oxidação do combustível de aviação (<i>Jet Fuel Thermal Oxidation Tester</i>)
JIG	Grupo Conjunto de Inspeção (<i>Joint Inspection Group</i>)
JP-1	Combustível de origem fóssil sem aditivos
JP-4	Combustível de aviação utilizado em aviões a serviço da Marinha Norte Americana.
JP-5	Combustível de aviação destinado a Aeronaves Militares.
JP-7	Combustível de aviação pouco volátil utilizado somente nos Estados Unidos.
JP-8	Combustível de aviação utilizado pelas forças armadas dos EUA
Kg	Quilograma

L	Litro
MALDI	Ionização e Dessorção a laser assistida por Matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
Mercox	Oxidação de Mercaptanos
mg	Miligrama
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mN m ⁻¹	MiliNewton por metro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (<i>National Center of biotechnology Information</i>)
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (<i>National Institute of Standarts and Technology</i>)
OACI	Organização da Aviação Civil Internacional
PCA	<i>Plate Count Agar</i> (Meio de Cultura para Contagem)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pb	Pares de bases
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
psi	Unidade de Pressão (<i>Pound Force per square inch</i>)
QAV	Querosene de aviação
QAV-1	Querosene de aviação de uso na aviação civil
QAV-5	Querosene de aviação de uso militar
RANP778/2019	Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis que trata das operações com Querosene de aviação.
RNA	Ácido ribonucleico
rDNA	DNA robossômico
SIP	Iso-parafinas Sintetizadas de Açúcares Fermentados e Hidroprocessados
RBQAV	Rede Brasileira de Bioquerosene e Hidrocarbonetos Sustentáveis Para Aviação
RenovaBio	Política Nacional de Biocombustíveis no Brasil

rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
SAF	Combustível de Aviação Sustentável (<i>Sustainable Aviation Fuel</i>)
SPE	Substância Polimérica Extracelular- <i>Extracellular Polymeric Substance</i> (EPS)
SPME	Micro Extração em fase Sólida
Tag	Medidor automático utilizado para medição de ponto de fulgor
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio (<i>Triphenyltetrazolium Chloride</i>)
TOF	Tempo de Vôo (Time of Flight)
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i> (Agar Triptona de Soja)
Ubrabio	União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UTOS	Unidade Taxonômica Operacional (<i>Operational Taxonomic Unit-OTU</i>)
UV	Luz ultra violeta
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1	COMBUSTÍVEIS DE AVIAÇÃO.....	25
3.2	QUEROSENE DE AVIAÇÃO.....	27
3.3	COMBUSTÍVEIS SUSTENTÁVEIS PARA AVIAÇÃO.....	31
3.4	DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DO COMBUSTÍVEL DE AVIAÇÃO.....	38
3.4.1	Temperatura.....	38
3.4.2	Oxidações	39
3.4.3	Umidade	40
3.4.4	Aditivação	42
3.5	DEGRADAÇÃO BIÓTICA DO COMBUSTÍVEL DE AVIAÇÃO	43
3.5.1	Fisiologia da degradação.....	44
3.5.2	Condições que promovem o crescimento microbiano	48
3.5.3	Comunidade microbiana deteriogênica.....	53
3.5.4	Consequências do crescimento microbiano.....	54
3.5.5	Corrosão influenciada por microrganismos (CIM)	56
3.6	MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.....	59
3.7	MÉTODOS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA	64
3.7.1	Métodos físicos de controle	65
3.7.2	Métodos químicos de Controle	65
4	CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO E BIOQUEROSENE DURANTE A ESTOCAGEM SIMULADA.....	69
4.1	RESUMO	69
4.2	INTRODUÇÃO.....	70
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	74
4.3.1	Combustíveis utilizados.....	74
4.3.2	Prospecção microbiana	75
4.3.3	Identificação dos isolados fúngicos por microcultivo	75

4.3.4	Identificação molecular dos isolados fúngicos e leveduras	75
4.3.5	Identificação de isolados bacterianos e fungos leveduriformes por maldi-tof	76
4.3.6	Ensaio de biodegradabilidade preliminar com indicador 2,6 Diclorofenol-Indofenol (DCPIP)	77
4.3.7	Microrganismos utilizados e preparação dos inóculos	77
4.3.8	Crescimento fúngico	79
4.3.9	Análise estatística	79
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.4.1	Prospecção e identificação	80
4.4.2	Testes preliminares com DCPIP	85
4.4.3	Biomassa.....	87
4.5	CONCLUSÃO	91
4.6	AGRADECIMENTOS.....	92
4.7	REFERÊNCIAS	92
5	CAPÍTULO 2: ARMAZENAMENTO SIMULADO DE QUEROSENE (QAV) BIOQUEROSENE (BIOQAV) E MISTURA 10% BIOQAV-QAV COM OS FUNGOS HORMOCONIS RESINAE (F089) EXOPHIALA PHAEOMURIFORMIS (UFRGS Q 4.2)	99
5.1	RESUMO	99
5.2	INTRODUÇÃO.....	101
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	104
5.3.1	Microrganismos utilizados	104
5.3.2	Preparação dos inóculos	106
5.3.3	Combustíveis utilizados.....	106
5.3.4	Condições experimentais	106
5.3.4.1	Ensaio preliminar de biodegradabilidade.....	106
5.3.4.2	Curva de crescimento dos fungos	107
5.3.4.3	Fase combustível.....	108
5.3.4.4	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas GC-MS.....	108
5.3.4.5	Fase aquosa- pH	110
5.3.4.6	Fase aquosa- medidas de tensão superficial	110
5.3.5	Análise estatística	110

5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
5.4.1	HORMOCONIS RESINAE (F089)	111
5.4.2	EXOPHIALA PHAEOMURIFORMIS (UFRGS Q4.2)	111
5.5	ENSAIO COM O INDICADOR REDOX DCPIP (2,6 DICLOROFENOL- INDOFENOL)	112
5.6	CURVA DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS – <i>HORMOCONIS REINAE</i> (F089).....	115
5.7	CURVA DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS – <i>EXOPHIALA</i> <i>PHAEOMURIFORMIS</i> (UFRGS Q4.2)	120
5.8	MEDIDAS DE PH DA FASE AQUOSA.....	123
5.9	MEDIDAS DE TENSÃO SUPERFICIAL DA FASE AQUOSA.....	125
5.10	DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POR GC-MS	128
5.10.1	<i>Hormoconis resiniae</i> (F089)	129
5.10.2	<i>Exophiala phaeomuriformis</i> (UFRGS Q 4.2)	132
5.11	CONCLUSÃO.....	135
5.12	REFERÊNCIAS.....	136
6	CONCLUSÃO DA TESE	154
7	REFERÊNCIAS	156
8	ANEXO A - ESPECIFICAÇÃO DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO JET A, JET A-1 E JET C	167
9	ANEXO B - REQUISITOS ADICIONAIS DA ESPECIFICAÇÃO DO JET C	169
10	ANEXO C - CERTIFICADO DE QUALIDADE BIOQUEROSENE- AMYRIS	170

1 INTRODUÇÃO

A aviação civil comercial brasileira faz uso do querosene de aviação (QAV-A1), um combustível utilizado em aeronaves para o transporte de passageiros, e que tem a necessidade de homologação e atendimento às especificações válidas em qualquer parte do mundo. O querosene de aviação é composto por hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos), sendo um dos combustíveis mais fiscalizados e certificados, com rotinas muito mais rígidas de manutenção em comparação ao diesel, gasolina e etanol. Apesar do setor de aviação contribuir com uma porcentagem pequena na emissão de gases do efeito estufa, existe uma preocupação mundial com relação ao seu consequente impacto ambiental. Dessa forma, os querosenes de aviação alternativos têm sido apresentados como uma opção para os combustíveis derivados do petróleo. Várias rotas para obtenção desses novos combustíveis vêm sendo desenvolvidas, bem como análises técnico econômicas e de ciclo de vida. Alguns combustíveis de aviação alternativos podem ser utilizados puros, ao passo que outros precisam ser misturados ao querosene de origem fóssil.

Os hidrocarbonetos presentes nos combustíveis podem ser utilizados pelos microrganismos como fonte de energia, sendo os impactos do desenvolvimento microbiano conhecidos desde o século passado. O reconhecimento do crescimento microbiano nos combustíveis de aviação e suas consequências datam da década de 50. Em 1958, um acidente com o avião bombardeiro B-52 foi atribuído diretamente ao entupimento de filtros do sistema de combustível por contaminação microbiana. Posteriormente foi determinado que o acúmulo de lodo em tanques usados para armazenar combustíveis do tipo querosene era uma consequência de falhas na manutenção da qualidade final. Os microrganismos podem ser introduzidos nos combustíveis à medida que os produtos esfriam nos tanques das refinarias. Inicialmente, as altas temperaturas de destilação fracionada, fazem com que o combustível seja estéril naquele momento. No entanto, durante a estocagem em tanques, bactérias, fungos e leveduras podem ser transportados juntamente com partículas de poeira e gotículas de água através das aberturas do tanque. A presença de água é essencial para o crescimento e proliferação de microrganismos que podem utilizar os hidrocarbonetos presentes nos

combustíveis como fonte de energia. Como consequência direta do crescimento dos microrganismos nos sistemas com querosene de aviação, destacam-se: a obstrução dos filtros, interferência na separação combustível/água devido à produção de surfactantes microbianos e corrosão dos tanques. Como formas de controle e monitoramento são utilizadas atualmente rotinas rígidas de drenagem nos tanques, biocidas e utilização de kits que estimam a densidade das populações microbianas. Desta forma, nas últimas décadas os problemas no combustível de aviação tornaram-se raros, à medida que os padrões de conscientização e manutenção rígida das condições de estocagem são a garantia para a qualidade final dos combustíveis. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar a formação de lodo biológico durante o armazenamento simulado em querosene fóssil, bioquerosene bem como na mistura 10% bioquerosene em querosene.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da adição de querosene de aviação alternativo (bioquerosene) ao querosene de aviação fóssil durante o armazenamento simulado com relação a formação do lodo biológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a prospecção, isolamento e identificação de microrganismos a partir de amostras de combustíveis (querosene e bioquerosene) como recebidos;
- b) Avaliar o crescimento (produção de biomassa) e medir o pH dos tempos amostrais (7,14,21 e 28 dias);
Medir a tensão superficial e estimar a degradação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) dos compostos do querosene, querosene de aviação alternativo (bioquerosene) e da mistura 10% bioquerosene durante estocagem simulada (28 e 21 dias) dos fungos *Hormoconis resinae* (F089) e *Exophiala phaeomuriformis* (Q4.2 UFRGS).

4 CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO E BIOQUEROSENE DURANTE A ESTOCAGEM SIMULADA

4.1 RESUMO

O RENOVABIO, especial incentivo e apoio governamental aos biocombustíveis, permitirão ao Brasil protagonizar ações que envolvem a redução das emissões de carbono. Atualmente, existe grande esforço na eleição de matérias-primas e definição de melhores rotas para a produção e viabilidade do bioquerosene brasileiro. Como uma estratégia, a previsão da estabilidade ao armazenamento da introdução do bioquerosene ao querosene estão sendo avaliadas. O objetivo desse estudo foi prospectar, identificar e avaliar a capacidade de crescimento de microrganismos em querosene e bioquerosene de aviação em estocagem simulada. A partir de amostras dos combustíveis, realizou-se a prospecção, caracterização e identificação de microrganismos. Avaliações do crescimento utilizando indicador redox-DCPIP e produção de biomassa em microcosmos, constituídos por fase aquosa (meio mineral) e fase combustível: querosene (QAV), bioquerosene (BioQAV) e misturas bioquerosene (10%; 20%), foram realizadas durante 28 dias. Foram identificados pelo método de sequenciamento do DNA, os fungos filamentosos *Penicillium sp*, *Talaromyces diversus*, *Cladosporium halotolerans*, *P. citrinum*, *Fusarium merismoides*, *Curvularia spicifera*, *Cercospora gerberae* e os fungos leveduriformes *Exophiala phaeomuriformis* e *Aureobasidium namibiae*. O fungo filamentoso *Hormoconis resiniae* (F087) foi utilizado como controle positivo nos ensaios, e mostrou a maior produção de biomassa em querosene e a menor em bioquerosene, com menor tempo de viragem do indicador redox-DCPIP (48 horas) no querosene. De acordo com os resultados preliminares, a produção de biomassa foi variável entre os fungos avaliados e está relacionada aos diferentes combustíveis bem como as suas misturas. Desta forma, a presença de bioquerosene continuará exigindo da comunidade usuária de aviação, cuidados rígidos com as rotinas e Boas Práticas durante o armazenamento destes combustíveis.

Palavras chave: Contaminação microbiana. Estocagem; Mistura querosene-bioquerosene.

ABSTRACT

RENOVABIO is a special incentive and governmental support for biofuels, and will allow Brazil to carry out actions that involve the reduction of carbon emissions. Currently, there is a great effort in the choice of feedstock sources and definition of better routes for the production and viability of Brazilian biojet fuel. In this sense, the prediction of storage stability from the introduction of biojet fuel to jet fuel is being evaluated. The objective of this study was to prospect, identify and evaluate the growth capacity of microorganisms in jet fuel and biojet fuel in simulated storage. The prospection, characterization and identification of microorganisms was carried out from fuel samples. Growth assessments were conducted using redox-DCPIP indicator and biomass production in microcosms, one of which, consisting of aqueous phase (mineral medium) and fuel phase: jet fuel (QAV), biojet fuel (BioQAV) and biojet fuel blends (10%; 20%), for 28 days. The filamentous fungi *Penicillium sp*, *Talaromyces diversus*, *Cladosporium halotolerans*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium merismoides*, *Curvularia spicifera*, *Cercospora gerberae* and the yeast fungi *Exophiala phaeomuriformis* and *Aureobasidium namibiae* were identified. The filamentous fungus *Hormoconis resiniae* (F087) was used as a positive control in the tests. According to preliminary results, biomass production was variable among the fungi evaluated regarding the addition of biojet fuel (2,6,10 trimethyldodecane) to commercial jet fuel. In this way, the presence of biojet fuel will continue to demand from the aviation user community and the good housekeeping is essential.

Key words: Microbial contamination. Storage. Jet fuel-biojet fuel blend.

4.2 INTRODUÇÃO

Historicamente, o querosene de aviação sempre recebeu especial atenção durante a estocagem, devido à possibilidade de incorporação de água e suscetibilidade à contaminação microbiana (Gaylarde *et al.*, 1999; Raikos *et al.*, 2012; Passman, 2013; Martin-Sanchez *et al.*, 2018). Os impactos da contaminação microbiana são dependentes do tipo de combustível; tempo de estocagem; adição de aditivos e rotinas adotadas na manutenção. A aviação civil comercial utiliza o

querosene de aviação (QAV-A1 no Brasil), um combustível de uso em aeronaves para o transporte de passageiros, com a necessidade de homologação e atendimento a especificações válidas em qualquer parte do mundo. O querosene de aviação pode receber a adição de aditivos especiais com propriedades anticongelantes; antimicrobianas; antiestáticos e anticorrosivos (Robbins & Levy, 2005). O querosene de aviação é composto por hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) sem aditivos de coloração, que podem ser utilizados pelos microrganismos em seu crescimento em condições consideradas inadequadas de armazenamento (Raikos *et al.*, 2012). O QAV A1 é considerado um dos combustíveis mais fiscalizados e certificados, com rotinas mais rígidas de manutenção em comparação ao diesel, gasolina e etanol. Os problemas e consequências relacionados à contaminação microbiana em tanques de estocagem de querosene de aviação datam do século passado. Os primeiros relatos sobre a natureza microbiana dos resíduos formados no armazenamento em querosene de aviação foi realizado por Bakanaukas (1958) nos Estados Unidos e no Brasil por Gutheil (1966). Na Figura 1 é apresentada uma linha do tempo sobre principais eventos relacionados ao querosene (detecção, monitoramento) e bioquerosene (iniciativas).



Figura 1 – Principais eventos relacionados a participação microbiana durante a estocagem no mundo e no Brasil com querosene de aviação e bioquerosene. Fonte: Cedida por Dra. Fátima Menezes Bento.

Após o processo de refino do petróleo cru, o querosene como um dos produtos da destilação fracionada é isento de qualquer contaminação. Porém, na condição de armazenamento em tanques na refinaria ou nos caminhões tanques que transportarão o combustível ou ainda no terminal das empresas distribuidoras no aeroporto pode ocorrer o início da contaminação com microrganismos (carreados pela poeira, ar e umidade) (Baena-Zambrana *et al.*, 2013; Passman *et al.*, 2013) (Figura 2).



Figura 2 – Visualização do sistema de armazenamento e distribuição de combustíveis de aviação, da refinaria ao tanque da aeronave. Fonte: Adaptada de Wipro, 2022.

A presença de água no tanque de combustível ocorre pela condensação da umidade, formando água na fase livre, no fundo dos tanques, fundamental para o crescimento de microrganismos com capacidade de se desenvolver às expensas do carbono presente nos hidrocarbonetos. Os fungos (filamentosos e leveduriformes) e bactérias (aeróbias e anaeróbias) podem formar consórcios microbianos (diferentes espécies), degradando o combustível ou seus aditivos, removendo o oxigênio, solubilizando compostos (Figura 3).

A principal consequência do crescimento microbiano é a produção de uma biomassa, que se concentra principalmente na interface combustível-fase aquosa, causando a degradação dos hidrocarbonetos e produção de metabólitos (ácidos orgânicos e inorgânicos) que podem provocar a corrosão dos tanques. Neste sentido, a estratégia de monitoramento permitirá informar se o sistema de

estocagem com relação à presença de microrganismos encontra-se em condições aceitáveis ou de alerta, exigindo por exemplo uma ação de remediação. O monitoramento da contaminação microbiana para combustíveis pode ser conduzido com metodologias que estimam o número de microrganismos, tanto na fase combustível ou na fase aquosa seguindo Normas internacionais (IP 385; ASTM D6974 e ASTM D7687). Neste ano, a primeira Norma Brasileira ABNT 16732-19 (**Combustíveis líquidos e sistemas associados - Requisitos para prevenção, monitoramento e controle de contaminação microbiana**) foi homologada.

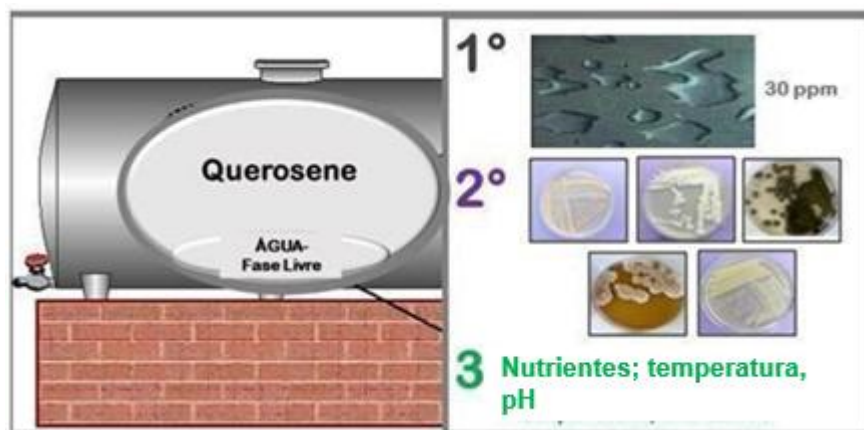


Figura 3 – Aspecto ilustrativo de um tanque aéreo de estocagem de querosene, em situação inadequada, devido a a presença de água livre (à esquerda), à direita, as condições encontradas para a formação de lodo biológico: presença de água (1°); fungos e bactérias nativos (2°); disponibilidade de nutrientes minerais, temperatura e pH (3°). Fonte: Cedida por Dra. Fátima Menezes Bento.

O teste mais moderno de detecção de contaminação microbiana em querosene foi homologado como Norma ASTM D6974-16, a partir de uma patente de 2004 (US 2004/0115748 A1). Trata-se de uma primeira geração do teste, abordando a detecção de composto produzido pelo fungo *Hormoconis resiniae*, durante seu crescimento no querosene. Uma segunda versão do teste, também detecta a presença de outros microrganismos, como fungos e bactérias. Trata-se de um teste com grande acurácia, com resultados rápidos (10 minutos) e que não exige treinamento por parte da equipe nem equipamentos especiais. Como forma de controle e prevenção são indicados procedimentos que envolvem a drenagem regular da água formada (Norma ABNT NBR 15.512;15.216), limpeza dos tanques e o uso de biocidas. A IATA (Associação de Transporte Aéreo Internacional) aprovou moléculas antimicrobianas (mistura de isotiazolonas e mistura de dioxiborinanos)

para uso exclusivo no querosene de aviação, armazenado em tanques dentro das aeronaves. Embora aprovados pelo IATA, o uso destes produtos biocidas comerciais devem ser liberados pelas agências regulatórias de cada país. De acordo com Passman (2019) a American Society of for Testing and Materials (ASTM) vem desenvolvendo orientações para avaliar testes que não utilizem a cultura de microrganismos como método de referência em amostras de combustíveis e de água associada a combustíveis. As orientações (ASTM Practice D6300) baseiam-se em avaliações interlaboratoriais de testes que quantificam o ATP intracelular, método (ASTM D7687) e testes que utilizam a técnica de imunocromatografia de fluxo lateral (ASTM D7080/2016).

Os combustíveis de aviação derivados de biomassas renováveis são considerados uma alternativa promissora em relação aos combustíveis de aviação convencionais. O bioquerosene é um combustível renovável, tendo desempenho testado e aprovado em vôos desde 2012. Ainda não se conhece o impacto da introdução do bioquerosene ao querosene em possíveis misturas, com relação a processos de biodeterioração e biocorrosão em tanques de armazenagem de combustível de aviação. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi prospectar, identificar e avaliar o potencial deteriogênico destes microrganismos na presença de querosene, bioquerosene e misturas com 10 e 20% (querosene-bioquerosene). O impacto da adição do bioquerosene no querosene de aviação quanto à formação de borra biológica em estocagem simulada tem sido avaliado por pesquisadores do LABBIO-UFRGS em parceria com a GOL-Linhas Aéreas, UBRABIO e RBQAV.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Combustíveis utilizados

Foram utilizadas amostras de querosene de aviação comercial (QAV) e amostras do lastro de drenagem coletados de tanques de uma empresa de aviação comercial de Porto Alegre, RS. O volume total recebido foi de 3000 mL. O bioquerosene utilizado foi produzido a partir da fermentação da cana de açúcar (obtido pela rota SIP–Isoparafinas sintetizadas, basicamente farnesano, 2,6,10 trimetildodecano) pela empresa *AMYRIS BIOTECNOLOGIA DO BRASIL*, sediada no

estado de São Paulo. O volume de 3 L de bioquerosene foi transportado até o laboratório e mantido sob refrigeração (4 °C). As misturas com 10 e 20% de bioquerosene ao querosene foram realizadas no laboratório, em condições assépticas.

4.3.2 Prospecção microbiana

A composição da comunidade microbiana foi avaliada com o isolamento dos microrganismos utilizando a Norma ASTM D6974-09 (modificada), onde amostras de 500 mL dos combustíveis foram filtradas, em triplicata, em condições assépticas, a vácuo, utilizando membrana de 0,22 µm marca Millipore. Após a filtragem, as membranas foram depositadas em meio de cultura apropriados para o crescimento bacteriano e fúngico. As placas foram incubadas em estufa, a 30° C, durante 7 dias. Após este período as colônias, com morfotipos diferentes foram isoladas em novos meios de cultura, visando a purificação dos isolados.

4.3.3 Identificação dos isolados fúngicos por microcultivo

Para identificação ao nível de gênero de fungos filamentosos, foram montados microcultivos dos isolados das amostras de querosene e bioquerosene. A identificação por microcultivo permite a observação de estruturas reprodutivas (Molla *et al.*, 2002, Cazarolli *et al.*, 2012). Também foram utilizadas chaves dicotômicas com a mesma finalidade. (Stolk & Samson, 1972; Guarro *et al.*, 1999).

4.3.4 Identificação molecular dos isolados fúngicos e leveduras

Para a identificação molecular foi realizado o sequenciamento Sanger. O DNA utilizado para a identificação foi obtido a partir da biomassa de cada fungo filamentoso e leveduriforme prospectado. A extração de DNA foi realizada através do Método CTAB (Ferreira & Gratapaglia, 1998). O grau de pureza do DNA extraído foi avaliado utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Thermo

Scientific, Wilmington, DE, USA). Foram utilizados os primers: ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') visando a amplificação, por PCR) da região ITS-5.8S- ITS2. Os produtos da reação em cadeia da polimerase foram purificados com o auxílio do Kit PureLink™ PCR Purification da Invitrogen. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as análises dos fragmentos foram processadas através do sequenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA). As sequências geradas foram comparadas pelo sistema automatizado com o banco de dados GenBank⁶ para a identificação da porcentagem de similaridade.

4.3.5 Identificação de isolados bacterianos e fungos leveduriformes por maldi-tof

Para a identificação de bactérias e de duas leveduras obtidas a partir das amostras de querosene e bioquerosene foi utilizada a técnica de espectrometria com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (Maldi- Tof). As análises por Maldi-tof foram realizadas a partir de isolados cultivados nos meios PCA (Plate Count Ágar), BDA (Ágar Batata Dextrose) e TSA (Ágar Triptona de Soja). Uma colônia de cada bactéria e levedura isoladas foi utilizada. Os perfis de massa das proteínas dos microrganismos foram adquiridos com o espectrômetro de massas AUTOFLEX III Smart Beam e os espectros brutos foram processados usando o programa MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Os perfis proteicos foram obtidos em duplicatas, a partir das culturas de microrganismos de acordo com o protocolo de extração com etanol/ ácido fórmico (Singhal *et al.*, 2015).

⁶ Disponível em: <http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/>

4.3.6 Ensaio de biodegradabilidade preliminar com indicador 2,6 Diclorofenol-Indofenol (DCPIP)

A biodegradabilidade dos combustíveis foi avaliada utilizando o indicador 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson *et al.*, 1993). O princípio desta técnica está baseada na oxidação microbiana de uma fonte de carbono onde os elétrons são transferidos para aceptores de elétrons, tais como oxigênio, nitrato e sulfato na cadeia respiratória. A partir da incorporação de um acceptor artificial de elétrons (DCPIP), no meio de cultura é possível determinar a capacidade de um microrganismo em utilizar um substrato na medida que ocorre a mudança de coloração do meio azul (oxidado) para incolor (reduzido). O tempo necessário para que fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias mudassem a coloração do indicador-redox, na presença dos combustíveis e de uma fase aquosa foi avaliada. Após 28 dias, a biomassa formada pelos fungos filamentosos das amostras de querosene (qav), bioquerosene (bioqav) e nas misturas qav-bioqav 10% e 20% foi estimada por peso (mg)

4.3.7 Microrganismos utilizados e preparação dos inóculos

O fungo *H. resinae*, cepa F087, cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia (RJ) foi utilizado como controle positivo de crescimento em querosene. Os microrganismos identificados como: *Penicillium sp*, *Cladosporium halotolorens*, *Talaromyces diversus*, *Penicillium citrinum*, *Exophiala phaeomuriformis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium namibiae* e *Arthrobacter oxydans* foram isolados das amostras de combustíveis avaliados. A preparação dos inóculos dos fungos filamentosos foi realizada a partir de culturas puras com 7 dias, cultivadas em Agar BDA em tubo inclinado, mediante a adição de 2 mL do surfactante Tween 80, na concentração de 0,01%. Alíquotas das suspensões, dos inóculos dos isolados, foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 105 esporos mL⁻¹. Os isolados, na concentração acima citada, foram adicionados individualmente no microcosmo e incubados a 30 °C por 28 dias protegido da luz para evitar a fotoxidação do DCPIP. A preparação dos inóculos da bactéria *Arthrobacter oxydans* e dos fungos leveduriformes *Rhodotorula mucilaginosa*,

Exophiala phaeomuriformis e *Aureobasidium namibiae* foram realizadas a partir de culturas puras de 48 horas. Alíquotas das culturas foram padronizadas pela escala MacFarland em 10^8 UFC/mL⁻¹. Os isolados na concentração acima citada foram adicionados individualmente nos microcosmos e incubados à temperatura ambiente por 28 dias, protegidos da luz para evitar a fotoxidação do DCPIP.

Fungos filamentosos

O experimento com os fungos filamentosos foi realizado em quintuplicata, em frascos de vidro estéreis (20 mL) contendo as fases aquosa e combustível. A fase aquosa foi composta por 10 mL do meio mineral Bushnell-Haas (Bushnell & Haas, 1941) (g L⁻¹: 1.0 KH₂PO₄; 1.0 K₂HPO₄; 1.0 NH₄NO₃; 0,2 MgSO₄; 0,05 FeCl₃; 0.02 CaCl₂; pH 7,2), com o indicador DCPIP (0,25 g/L⁻¹) esterilizados a 121°C por 15 minutos. A fase combustível foi composta por 5 mL de querosene, bioquerosene, estéreis e misturas com 10% e 20% de bioquerosene em querosene comercial em condições estéreis. O tratamento controle negativo recebeu as mesmas condições, sem a adição do inóculo. Como controle positivo foi utilizado caldo BD (Batata Dextrose) para os fungos, visando avaliar a viabilidade dos esporos utilizados no inóculo e para efeito de comparação do crescimento da biomassa fúngica. O experimento foi conduzido durante 28 dias sem agitação. Para avaliar a viabilidade das células foram plaqueados os tratamentos nos tempos: 0 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.

Leveduras e Bactérias

Os testes realizados com fungos leveduriformes e bactérias foram realizados em triplicatas. Em frascos de vidros estéreis (15 mL) foram adicionadas a fase aquosa, composta por 4mL do meio mineral Bushnell- Haas (Bushnell & Haas, 1941) (g L⁻¹: 1.0 KH₂PO₄; 1.0 K₂HPO₄; 1.0 NH₄NO₃; 0,2 MgSO₄; 0,05 FeCl₃; 0.02 CaCl₂; pH 7,2), com o indicador DCPIP (0,25 g/L⁻¹) esterilizados a 121°C por 15 minutos. A fase combustível foi composta por 100 µL de querosene, bioquerosene, e misturas com 10% e 20% de bioquerosene em querosene comercial em condições estéreis. O tratamento controle negativo recebeu as mesmas condições, sem a adição do

inóculo. Como controle positivo foi utilizado caldo BD (Batata Dextrose) para os fungos leveduriformes e caldo nutriente para as bactérias visando avaliar a viabilidade dos microorganismos utilizados como inóculo. O experimento foi conduzido durante 28 dias sem agitação. Para avaliar a viabilidade das células foram plaqueados os tratamentos nos tempos: 0 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.

4.3.8 Crescimento fúngico

A biomassa de 4 fungos filamentosos isolados e do fungo *H. resiniae* formada na interface combustível/água após 28 dias de incubação, foi avaliada por gravimetria (mg). Previamente, as membranas de papel filtro (gramatura 80, porosidade 14 μm) foram colocadas em estufa a 30°C por 48 horas, para remoção de umidade, e mantidas no dessecador por 24 horas para posterior pesagem em balança de precisão. Ao final do experimento, foi realizada a separação da fase oleosa e aquosa em tubos e microtubos estéreis (tubos tipo Falcon e microtubos Eppendorf) com a utilização de pipetas. A biomassa fúngica foi recuperada utilizando filtração à vácuo em condições assépticas. A seguir, as membranas foram colocadas na estufa por 48 horas e em dessecador por 24 horas antes da pesagem. O peso seco da biomassa, expressa em miligramas, de cada quintuplicata foi obtido, a partir da diferença entre o peso final e o peso inicial das membranas.

4.3.9 Análise estatística

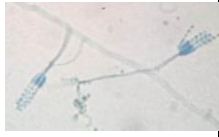

Os experimentos, com fungos filamentosos foram conduzidos em quintuplicata e os valores de biomassa fúngica obtidas nos diferentes tratamentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados foram analisados com auxílio do programa TIBCO Statistica Versão 13.3 (©1984-2017 TIBCO Software Inc).


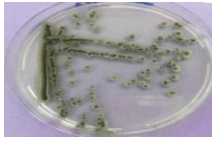


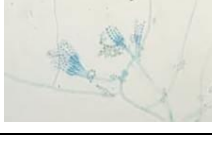


4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Prospecção e identificação

Para realizar o isolamento de microrganismos das amostras de querosene e bioquerosene foi utilizada a Norma ASTM D6974-09 (modificada). Foram identificados, pela técnica de microcultivo, 6 isolados fúngicos. A identificação de *Cercospora gerberae* (fungo isolado de amostra do bioquerosene) foi obtida através da técnica de sequenciamento conforme Tabela 1, não sendo possível identificação por microcultivo. A análise do sequenciamento de bases da região ITS1-5.8S- ITS2 do DNA ribossomal mostrou que os fungos filamentosos isolados das amostras de querosene pertencem a 6 espécies sendo elas: *Penicillium sp*, *Talaromyces diversus*, *Cladosporium halotolerans*, *Curvularia spicifera*, *Fusarium merismoides* e *P. citrinum*. Os isolados UFRGSQ4.2 e UFRGSQ5.3 obtidos da amostra de querosene de aviação, foram identificados através do sequenciamento de bases da região ITS do rDNA como fungos leveduriformes das espécies: *Exophiala phaeomuriformes* e *Aureobasidium namibiae* (Tabela 1). Foram identificados através da técnica por Maldi-tof 6 isolados bacterianos e 2 isolados de fungos leveduriformes.

Tabela 1 –Tipo de combustível, aspecto da colônia em meio de cultura e imagens de estruturas de reprodução (em microscópio ótico com 100X aumento) e identificação dos isolados por sequenciamento de bases da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA, e respectivos códigos de acesso ao Genbank

Isolados	Origem	Imagem	Resultado do Sequenciamento	Código de acesso ao GenBank
UFRGS Q1.7	Querosene de aviação		<i>Penicillium sp</i> Cobertura: 83% Identidade: 100%	MK 577890
UFRGS Q2.4	Querosene de aviação		<i>Fusarium merismoides</i> var. <i>Violaceum</i> strain Cobertura: 100% Identidade 100%	MK 577888

UFRGS Q2.7	Querosene de aviação		<i>Talaromyces diversus</i> Cobertura:100% Identidade: 98%	MK 577889
UFRGS Q4.2	Querosene de aviação		<i>Exophiala phaeomuriformis</i> Cobertura: 100% Identidade: 99.4%	MK 577887
UFRGS Q4.3	Querosene de aviação		<i>Cladosporium halotolorens</i> Cobertura:99% Identidade:99%	MK 577891
UFRGS Q 4.4	Querosene de aviação		<i>Curvularia spicifera</i> Cobertura:100% Identidade:99%	MK 577892
UFRGS Q 6.2	Querosene de aviação		<i>Penicillium citrinum</i> Cobertura:100% Identidade: 99%	MK 577893
UFRGSQ 5.3	Querosene de aviação		<i>Aureobasidium namibiae</i> Cobertura: 100% Identidade: 99.4%	MT 094742
UFRGS BQ 2.2	Bioquerosene de aviação		<i>Cercospora gerberae</i> Cobertura:100% Identidade:100%	MK 577894

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise por espectrometria de massa por MALDI TOF identificou nas amostras de querosene de aviação algumas bactérias pertencentes aos filos *Actinobacteria* e *Firmicutes* e fungos dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Das amostras de bioquerosene foram identificadas uma bactéria do *Filo Actinobacteriae* uma bactéria do *Filo Firmicutes*.

Tabela 2 – Tipo de combustível, aspecto das colônias em meio de cultura pela técnica de esgotamento e identificação dos isolados por Maldi-Tof

Isolados	Origem	Imagem	Identificação e escore no Maldi-Tof-
UFRGSQ 1.1	Querosene de Aviação		<i>Kocuria palustris</i> Actinobacteria Escore: 2.211
UFRGSQ 1.2	Querosene de Aviação		<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> Actinobacteria Escore: 2.198
UFRGSQ 1.5	Querosene de Aviação		<i>Bacillus megaterium</i> Firmicutes Escore: 2.045
UFRGSQ 2.9	Querosene de Aviação		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Basidiomycota Escore: 2.285
UFRGSQ 5.1	Querosene de Aviação		<i>Aureobasidium pullulans</i> Ascomycota Escore: 2.157
UFRGSQ 6.3	Querosene de Aviação		<i>Bacillus pumilus</i> Firmicutes Escore: 1.891
UFRGSBQ1.3	Bioquerosene de aviação		<i>Arthrobacter oxydans</i> Actinobacteria Escore: 2.497
UFRGSBQ 1.4	Bioquerosene de aviação		<i>Bacillus cereus</i> Firmicutes Escore: 2.038

Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos primeiros trabalhos de prospecção de microrganismos em tanques de combustível de aeronaves, foi realizado por Bakanaukas em 1958, com amostras de diferentes bases da força aérea dos Estados Unidos. Hende (1964),

investigou a relação do fungo contaminante do querosene *Cladosporium resinae*, (*H. resinae*) com a corrosão de ligas de alumínio. No Brasil, a primeira referência de investigação da natureza dos sedimentos, foi com o isolamento do fungo *H. resinae* em tanques de querosene (Gutheil, 1966).

Segundo Rauch *et al.*, (2006) a identificação de microrganismos encontrados nos combustíveis de aviação pode prever os processos de biodeterioração e seus potenciais danos além de auxiliar no entendimento das rotas de inoculação e vias metabólicas e determinar métodos de redução, prevenção e eliminação da proliferação microbiana. Segundo Gaylarde *et al.*, (1999) os microrganismos mais frequentemente isolados de combustíveis durante o armazenamento (querosene de aviação; óleo diesel e gasolina) são fungos do gênero *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e a espécie *H. resinae*. O fungo *H. resinae* é bastante conhecido pela capacidade de utilizar uma grande faixa de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos como fontes de carbono, incluindo, alcanos, alcenos, hidrocarbonetos cíclicos, benzenos e alquil benzenos (Martin-Sanchez *et al.*, 2016) e por essa característica, contaminar e degradar vários tipos de combustíveis (Gaylarde *et al.*, 1999, Rosales & Ianuzzi, 2008; Rafin & Veignie, 2019; Martin-Sanchez *et al.*, 2018; Radwan *et al.*, 2018).

O Método ASTM D6974 que utiliza a técnica de filtração do combustível para a recuperação dos microrganismos, tem sido muito utilizada por vários pesquisadores para a prospecção de microrganismos em querosene (Valle, 1991) e outros combustíveis como óleo diesel; biodiesel (Bento & Gaylarde, 2001; Bento, *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005; Bento *et al.*, 2016; Soriano *et al.*, 2015). Denaro *et al.*, (2005), utilizaram a técnica de filtração de amostras de combustível de aviação para identificar microrganismos através de cultivo e sequenciamento do DNA. Nesse estudo, foram identificados 36 gêneros de microrganismos sendo que os gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Kocuria* também foram encontrados por Graeff (2003) em amostras de combustíveis da força aérea dos Estados Unidos e em nosso estudo conforme a Tabela 2. Rauch *et al.*, (2006), coletaram amostras de combustível de aviação, de tanques de estocagem subterrâneos, caminhões de reabastecimento e tanques localizados nas asas das aeronaves para prospectar a contaminação microbiana e avaliar a possibilidade de transferência de microrganismos de diferentes pontos da linha de distribuição de combustível. Os resultados indicaram

que os processos de contaminação podem ser bem mais complexos uma vez que as aberturas de ventilação são possíveis rotas de exposição aos microrganismos ambientais nos 3 tipos de tanques. A identificação dos microrganismos, foi realizada com base em seqüenciamento do 16S rRNA. Os microrganismos *Bacillus sp*, *Aureobasidium pullulans*, bem como bactérias do gênero *Arthrobacter* já haviam sido previamente isolados de combustíveis de aviação e também foram observados em nossa pesquisa conforme a Tabela 2. Em estudo de 2007, Hien *et al.*, avaliaram amostras do combustível de aviação Jet A1 de válvulas dos tanques de estocagem das asas de duas aeronaves Os resultados obtidos mostraram que 19 amostras estavam contaminadas por fungos, bactérias e leveduras. Tendo como base as suas características morfológicas, bioquímicas e o seqüenciamento do 16S RNAr, as espécies encontradas foram: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium* e *Micrococcus*. Foram ainda encontradas leveduras do gênero *Rhodotorula* e *Aureobasidium* e fungos do gênero *Penicillium*. Tanto as bactérias do gênero *Bacillus*, como as leveduras do gênero *Rhodotorula*, *Aureobasidium* e o fungo do gênero *Penicillium*, também foram aqui prospectados (Tabela 2). Itah *et al.*, (2009), isolaram microrganismos a partir de amostras de combustível de aviação Jet-A1 retiradas diretamente do tanque de uma aeronave e de um hidrante de tanque de estocagem na Nigéria. Nesse estudo foram encontradas bactérias como: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* e fungos do gênero *Penicillium*. Dois fungos de gênero *Penicillium* (*Penicillium sp* e *P. citrinum*) foram isolados do forma semelhante no presente estudo, bem como as bactérias *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* (Tabela 2). White *et al.*, (2011) utilizaram a combinação de métodos como: cultivo, análise por DGGE, pirosequenciamento da região variável, V6, do gene 16S rRNA e genotipagem de cepas para avaliar as bactérias envolvidas na contaminação de hidrocarbonetos de combustíveis. Os resultados apontaram que as 152 amostras de contaminantes cultivados aeróbicamente abrangem 3 filos havendo predominância de Proteobacterias . As técnicas de DGGE e pirosequenciamento da região variável, V6, do gene 16S rRNA foram utilizadas em um subgrupo de amostras de combustíveis contaminados. OTUS (unidades taxonômicas operacionais) obtidas pela análise de DGGE de 15 amostras de combustíveis foram comparadas com isolados cultivados e os resultados obtidos revelaram que Proteobacterias e Firmicutes foram identificados por ambos métodos resultados concordantes com o

método de pirosequenciamento. Em contraste com os métodos dependentes de cultivo onde o gênero *Pseudomonas* é o mais frequente, as análises pelos métodos independentes de cultivo indicaram que os gêneros *Marinobacter*, *Burkholderia* e *Halomonas* são táxons dominantes por essa abordagem. *Firmicutes* (*Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* e *Bacillus pulmillus*) foram do mesmo modo isolados no presente trabalho (Tabela 2). Radwan *et al.*, (2018), isolaram um fungo a partir de amostras de combustível de aviação Jet A1 e o identificaram como *Fusarium fujikuroi* FUS01 baseado em suas características morfológicas e alta similaridade (99%) com o gene 18S rRNA de *F. fujikai*. Conforme mostrado na Tabela 1, em nosso estudo foi prospectado *Fusarium* em amostra de querosene de aviação.

4.4.2 Testes preliminares com DCPIP

O fungo *H. resinae* utilizado como controle positivo foi o que apresentou menor tempo de viragem do indicador DCPIP (48 horas) para as seguintes condições avaliadas: querosene puro e misturas bioqav 10% e 20%. No bioquerosene puro, o tempo de viragem do indicador por *H. resinae* foi de 9 dias. Vários estudos foram realizados, utilizando indicadores-redox para avaliar de forma preliminar a degradação de combustíveis e petróleo por microrganismos (Miranda *et al.*, 2007; Junior *et al.*, 2009; Mariano & Tomasella, 2010; Souza *et al.*, 2018; Fosso-Kankeu *et al.*, 2017; Ime *et al.*, 2018). Siporin e Cooney (1976) foram os pioneiros em utilizar o indicador-redox DCPIP como indicativo da capacidade do fungo *Cladosporium* (*H. resinae*) em oxidar hexadecano, através da atividade da enzima succinato desidrogenase. Parberry (1967) isolou uma cepa de *C. resinae*, de postes com creosoto e de amostras de solos na Austrália, e em 1969 a prospecção e distribuição do fungo foram avaliadas na Austrália, Bretanha e Europa (Parberry, 1969). As conclusões obtidas a partir desse estudo apontam que esse fungo é comum em amostras de solo e bastante distribuído na natureza. O fungo *H. resinae* tem sido isolado de ambientes naturais (solo, água fresca e água do mar) e também de produtos manufaturados. Em particular, esse fungo cresce em substratos ricos em hidrocarbonetos, como combustível de aviação, diesel, petróleo e madeira preservada com creosoto, ou alcatrão de carvão. Essa espécie tem sido relatada como uma das mais deteriogênicas de combustíveis (Rafin & Veignie, 2019) e tem

sido isolada de tanques de estocagem, de refinarias, de postos de combustíveis, de óleo diesel, de tanques internos de combustíveis em aeronaves e de sistemas de combustíveis de aeronaves civis e militares (Gaylarde *et al.*, 1999; Araya *et al.*, 2007; Rosales & Ianuzzi, 2008; Itah *et al.*, 2009).

Os resultados com o isolado *P. citrinum*, mostraram que foram necessárias 96 horas, para a viragem de cor com querosene puro, e nas misturas com bioquerosene 10% e 20%. Na amostra de bioquerosene puro, o tempo observado foi de 7 dias. O isolado identificado como *Penicillium sp*, no entanto, mostrou a viragem do indicador redox com todos os combustíveis testados, após 7 dias. A degradação de querosene comercial de aviação foi avaliada preliminarmente, através do indicador-redox DCPIP, por três espécies do gênero *Penicillium* (*P. Griseofulvum*, *P. aurantiogriseum* e *P. Corylophilum*) isolados de solo contaminado com petróleo (Maciel *et al.*, 2013). Os resultados indicaram que *P. griseofulvum* promoveu a oxidação do DCPIP, em menor tempo quando comparada com as outras duas espécies, sendo essa a estirpe selecionada como a com maior potencial de biodegradação de querosene de aviação e indicada para a aplicação na degradação de compostos xenobióticos em processos de remediação *ex situ*. O fungo filamentoso *Cladosporium halotolerans* não apresentou viragem do indicador DCPIP em 28 dias (tempo final do experimento) em nenhum dos tratamentos utilizados: querosene, bioquerosene e bioquerosene 10% e 20%, ainda que fosse observada formação de biomassa no tratamento bioquerosene. Akintokun *et al.*, (2013) avaliaram o potencial preliminar de biodegradação, de diesel e biodiesel, pelos fungos, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium sp*, isolados de solos contaminados na Nigéria, pelo método do DCPIP. Os resultados obtidos apontaram que ocorreu mudança de coloração do meio DCPIP nas amostras dos combustíveis com os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* indicando o potencial de degradação destes fungos o que foi posteriormente confirmado pelo método de espectroscopia de infravermelho (FT-IR). No entanto, o fungo do gênero *Cladosporium*, igualmente testado, não provocou mudança de cor no DCPIP corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho. O fungo filamentoso *Talaromyces diversus*, isolado de amostras de querosene, não apresentou mudança de coloração em 28 dias (tempo final), e tão pouco, apresentou produção de biomassa na interface combustível/fase aquosa, porém apresentou produção de

biomassa no caldo Dextrose Batata (Controle Positivo). Esse resultado demonstra que apesar dos esporos do fungo *T. diversus* serem viáveis em caldo nutriente não conseguiram se desenvolver nas condições avaliadas no presente estudo. Com relação as leveduras, o menor tempo de viragem do indicador-redox DCPIP foi observado para os fungos leveduriformes *E. phaeomuriformis* e *Aureobasidium namibiae*, 7 dias em amostras de querosene, bioquerosene e misturas de bioquerosene 10% e 20%. Outro fungo leveduriforme, isolado de amostra de querosene de aviação, utilizado no teste do DCPIP foi identificado pela técnica de Maldi-Tof como *Rhodotorula mucilaginosa*. Não foi observada mudança de coloração do meio, nem produção de biomassa, por esse microrganismo, indicando que provavelmente essa espécie não consiga se desenvolver nas condições utilizadas. A bactéria *Arthrobacter oxydans*, isolada da amostra de bioquerosene, oxidou o meio DCPIP em 28 dias (tempo final) nos tratamentos bioquerosene e na mistura bioquerosene 10%. Isola *et al.*, (2013) utilizaram o método do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para avaliar fungos com potencial de biodegradar toluenos, na Itália. O crescimento fúngico foi estimado pelo peso seco, sendo que foi evidenciado aumento de biomassa nos mesmos tubos quando comparados com os controles negativos. Os ensaios com o DCPIP indicaram que 35% dos isolados testados apresentaram mudança na coloração dentro de 7 a 10 dias e incubação.

4.4.3 Formação de Biomassa

Em relação a formação de biomassa formada pelos fungos filamentosos na interface óleo/ água foi verificado que, ao final dos 28 dias de ensaio o maior valor de biomassa observado durante crescimento em querosene e o menor em bioquerosene, foi exibido pelo fungo *H. resinae* (Tabela 3). O fungo filamentoso *C. halotolerans*, no entanto, foi o fungo com o maior valor de biomassa produzida em bioquerosene, seguido pelos demais isolados de *Penicillium*. As misturas com 10 e 20% de bioquerosene, apresentaram valores de biomassa variáveis entre os fungos, sendo o maior valor observado para o *H. resinae* e o menor para o *P. citrinium* (Tabela 3). A biomassa do fungo filamentoso *H. resinae* foi cerca de 12 vezes maior no tratamento querosene, do que no tratamento com bioquerosene, e em tornode 1,5 vezes maior nos tratamentos com a mistura bioquerosene 10% e bioquerosene 20%.

O menor crescimento foi observado em bioquerosene. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de biomassa produzidos no querosene e no bioquerosene puro e os demais tratamentos pelo teste de Tukey (Tabela 3). O farnesano, como é conhecido a molécula de bioquerosene utilizada, é uma isoparafina (2,6,10 trimetildodecano). Provavelmente, o farnesano não tenha sido reconhecido com um potencial substrato pela presença de ramificações que pode dificultar a degradação devido aos efeitos conhecidos como estéricos. Em adição e efeitos estéricos, grupos funcionais podem contribuir com efeitos eletrônicos, que podem dificultar a biodegradação afetando a interação entre os contaminantes e as enzimas (Maier, 2009).

Tabela 3 – Valores do peso seco da biomassa (mg) formada na interface combustível-água dos fungos filamentosos no querosene, bioquerosene e nas misturas bioquerosene 10% e 20%, após 28 dias em meio mineral Bushnell-Haas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Microrganismos	QAV	BioQAV	BioQAV 10%	BioQAV 20%
<i>Hormoconis resinae</i> (INT)	7,1±0,06 ^a	0,6±0,40 ^b	5,7±0,50 ^a	5,7±0,70 ^a
<i>Penicillium sp</i>	1,1±0,30 ^a	1,2±0,10 ^a	1,2±0,10 ^a	2,3±0,20 ^b
<i>Cladosporium halotolerans</i>	1,9±0,20 ^{ab}	2,7±0,70 ^a	1,6±0,30 ^b	2,5±0,40 ^a
<i>Penicillium citrinum</i>	1,8±0,20 ^a	1,8±0,40 ^a	1,3±0,70 ^a	1,6±0,60 ^a

Fonte: Elaborada pela autora.

O fungo filamentosso *C. halotolerans*, no entanto, foi o fungo com o maior valor de biomassa produzida em bioquerosene, seguido pelos demais isolados de *Penicillium*. As misturas com 10 e 20% de bioquerosene, apresentaram valores de biomassa variáveis entre os fungos, sendo o maior valor observado para o *H. resinae* e o menor para o *P. citrinium* (Tabela 3). A biomassa do fungo filamentosso *Hormoconis resinae* foi cerca de 12 vezes maior no tratamento querosene, do que no tratamento com bioquerosene, e em torno de 1,5 vezes maior nos tratamentos com a mistura bioquerosene 10% e bioquerosene 20%. O menor crescimento foi observado em bioquerosene. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de biomassa produzidos no querosene e o bioquerosene puro e os demais tratamentos pelo teste de Tukey (Tabela 3). O fungo *H. resinae* apresenta pigmentação escura devido à presença de melanina, um pigmento do alto peso molecular composto de vários tipos de monômeros fenólicos e indólicos. Esse pigmento é altamente vantajoso para o fungo, promovendo sua sobrevivência em ambientes difíceis e conferindo uma vantagem competitiva em condições ambientais extremas como: variações de temperatura, pH e pressão (Rafin & Veignie, 2019). O *H. resinae* é reconhecidamente um dos fungos mais deteriorogênicos de combustíveis, especialmente em querosene de aviação, devido a competência em metabolizar os hidrocarbonetos alifáticos e produzir biomassa (Gaylarde *et al.*, 1999; Edmonds & Cooney, 1967; Raikos *et al.*, 2011, Martin-Sanchez *et al.*, 2018). As consequências do crescimento do micélio de *H. resinae* em sistemas de combustíveis e tanques de estocagem incluem a formação de um revestimento microbiano que pode bloquear os encanamentos, válvulas e filtros (Martin-Sanchez *et al.*, 2016; Rafin & Veignie, 2019). O fungo *C. halotolerans* produziu valores de biomassa no bioquerosene (2,7 mg) um pouco mais elevados que nos tratamentos querosene e mistura bioquerosene 10% e bioquerosene 20% (1,9, 1,6 e 2,5 mg, respectivamente) havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos bioquerosene e mistura de bioquerosene 10% e entre a mistura bioquerosene 10% e 20%. Os resultados da pesagem da biomassa do fungo filamentosso *Penicillium sp* mostraram que esse isolado produziu cerca de duas vezes o valor de biomassa, na mistura bioquerosene 20% (2,3 mg) quando comparado aos tratamentos querosene puro (1,1 mg), bioquerosene puro (1,2 mg) e na mistura com 10% bioquerosene (1,2 mg). bioquerosene (Tabela 3). A biomassa formada pelo fungo *P. citrinum* não

mostrou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos tratamentos (querosene, bioquerosene, mistura de bioquerosene 10% e mistura de bioquerosene 20%). Khan *et al.* (2015), utilizou o fungo *Penicillium janthinellum* SDX7, isolado de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, na Índia, para realizar estudos de otimização de parâmetros de crescimento, como pH, temperatura, agitação e produção de biomassa em diferentes concentrações de querosene (1,3 e 5%). Os resultados mostraram que a produção de biomassa pelo fungo *Penicillium janthinellum* SDX7, diminuiu consideravelmente a partir que a concentração de querosene aumenta (a partir de 3%).

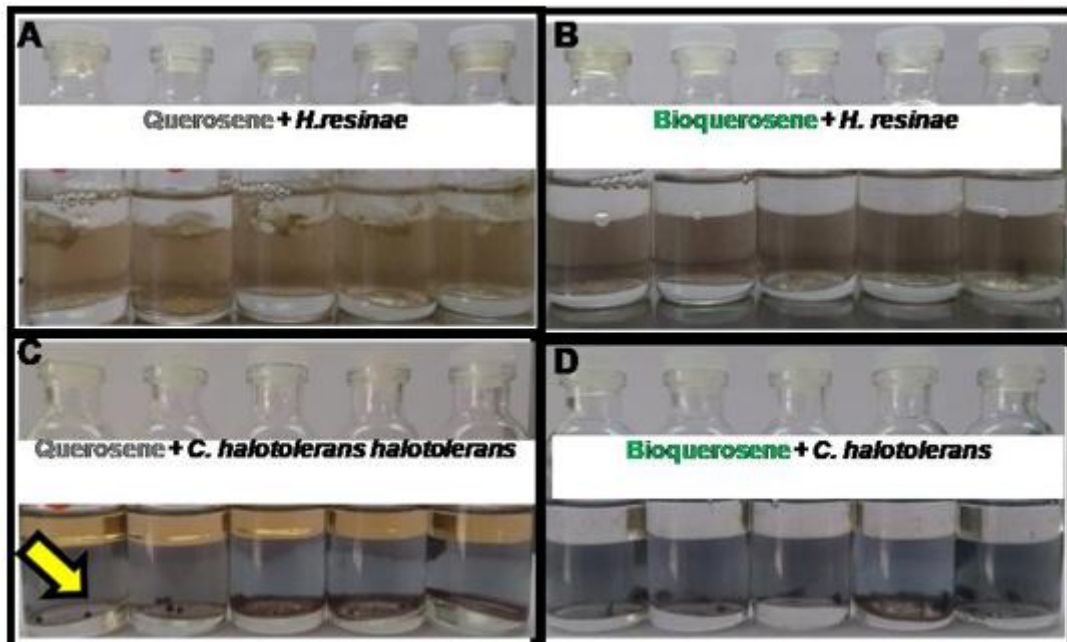


Figura 4 – Estocagem simulada em microcosmos com Querosene (A) e Bioquerosene (B) com o fungo *Hormoconis resiniae* e com o fungo *Cladosporium halotolerans* em Querosene (C) e Bioquerosene (D) após 28dias. As setas indicam biomassa fúngica.

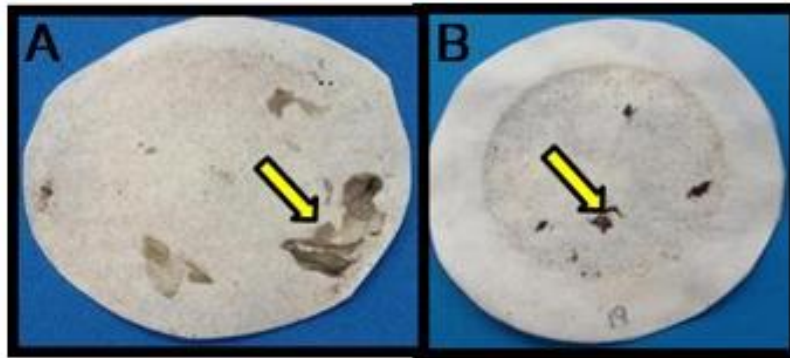


Figura 5 – Aspecto da biomassa retida pela filtração em membrana após 28 dias em Querosene (A) com o fungo *Hormoconis resinae* e em Bioquerosene (B) com o fungo *Cladosporium halotolerans*.

4.5 CONCLUSÃO

Foi possível caracterizar 7 fungos filamentosos, 6 bactérias e 4 fungos leveduriformes. O potencial preliminar de biodegradabilidade com o indicador redox foi indicativo na triagem de microrganismos capazes de utilizar o carbono, dos combustíveis de aviação, como única fonte de energia. O fungo filamentoso *Hormoconis resinae* é reconhecido como um dos mais deteriogênicos de combustíveis armazenados, e conforme os resultados mostrou a maior produção de biomassa em querosene e menor em bioquerosene, com menor tempo de viragem do indicador redox-DCPIP (48 horas). No entanto, observou-se que a produção de biomassa foi variável entre os fungos avaliados quanto a adição de bioquerosene (2,6,10 trimetildodecano) ao querosene comercial e nas misturas (10 e 20%). Desta forma, a presença de bioquerosene continuará exigindo da comunidade usuária de aviação, cuidados rígidos com as rotinas e Boas Práticas durante o armazenamento dos combustíveis.

4.6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. CNPq, Capes. GOL Linhas Aéreas, Rede Brasileira de Bioquerosene e Hidrocarbonetos Renováveis para aviação- RBQV, União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene- Ubrabio.

4.7 REFERÊNCIAS

AKINTOKUN, A.K. *et al.* Biodegradation potential of fungi isolated from soil on fossil diesel and biodiesel. **Life Journal of Science**, v.15, n. 3, p. 543-553. 2013.

ARAYA, R.; BOBADILLA, C.; ROSALLES, V. Biochemical analysis of the *Hormoconis resiniae* fungal mycelium in the corrosion of aeronautical aluminium alloys. **Revista de Metalurgia**, v. 43, n. 3, p. 228-236. 2007.

BAENA-ZAMBRANA, S. *et al.* Behaviour of water in jet fuel: a literature review. **Progress in Aerospace Sciences**, v. 60, p. 35–44, jul. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.paerosci.2012.12.001>

BAKANAUKAS, S. **Bacterial Activity in JP-4 Fuel**. [S. I]: Wright Air Develop Center Rept., 1958. p. 32-58.

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107–112. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00112-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00112-8)

BENTO, F.M.; ENGLERT, G.E.; GAYLARDE, C.C. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. **Materials and Corrosion**, v. 55, n. 8, p. 577-585. 2004. <https://doi.org/10.1002/maco.200303772>

BENTO, F. M. *et al.* Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In: PINHO, D. M.M.; SUAREZ, P. A. Z. (Orgs.). **Armazenagem e uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle**. Brasília: CDT; UNB, 2016. p. 112-175.

BUSHNELL, L.D.; HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653-673. 1941.

CAZAROLLI, J.C.; BÜCKER, F.; MANIQUE, M.C. Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 3, p. 251-257. 2012.

DENARO, T.L. *et al.* **DNA Isolation of microbial contaminants in aviation turbine fuel via traditional Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct pcr**

preliminary results. Fort Belvoir; DTIC, 2005. p. 1–24. Disponível em: <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA446701>. Acesso em: 5 out. 2022.

EDMONDS, P.; COONEY, J.J. Identification of microorganisms isolated from jet fuel systems. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 411-6. 1967.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1996.

FOSSO-KANKEU E.; MARX, S.; BRINK, A. Adaptation behaviour of bacterial species and impact on the biodegradation of biodiesel- diesel. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 469-480. 2017.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Review Microbiology**, v. 30. n. 1, p. 1–10. 1999. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000100001>

GRAEFF, H.W. **An analysis of microbial contamination in military aviation fuel systems.** 2003. Tese (Mestrado em Engenharia) - Air Force Institute of Technology, Ohio, 2003.

GUARRO, J.; GENE, J.; STICHIGEL, I. Development in fungal taxonomy. *Clinical Microbiological Reviews*, v. 12, n. 3. 1999.

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

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748. 1993.

HENDEY, N.I. Some observations on *Cladosporium resinae* as a fuel contaminant and its possible role in the corrosion of aluminium alloy fuel tanks. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 47, n. 4. 1964.

HIEN, L.T. *et al.* Microbial diversity in trace water of jet fuel in Vietnam. **ASEAN Journal on Science & Technology for Development**, v. 25, n. 2, p. 413–420. 2007. <https://doi.org/10.29037/ajstd.260>

IME, James Iniobong *et al.* Screening for hydrocarbon degrading bacteria using redox indicator 2, 6- dichlorophenol indophenol. **Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, n. 2, p. 11-16. 2018

ISOLA, D. *et al.* Isolation and screening of black fungi as degraders of volatile Aromatic Hydrocarbons. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 369-379. 2013.

ITAH, A.Y. *et al.* Biodegradation of International Jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 318-327. 2009

JUNIOR, J.S.; MARIANO, A.P.; ANGELIS, D.D.F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, p. 2774-2778. 2009.

KHAN, S. *et al.* A review on deoxygenation of triglycerides for jet fuel range hydrocarbons. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 140, p. 1-24. 2019.

MACIEL, C.C.S.; SOUZA, C.S.; SILVA, P.A. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium sp.* através da bioestimulação. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 39-42. 2013.

MAIER R.M. Microorganisms and Organic Pollutants. *In*: PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. **Environmental Microbiology**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 387-420.

MARIANO, A.P.; TOMASELLA, R.C. Aerobic biodegradation of butanol and diesel oil blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 42, p. 7094-7101. 2010.

MARTIN-SANCHEZ, P.M. *et al.* A novel qPCR protocol for the specific detection and quantification of the fuel-deteriorating fungus *Hormoconis resinae*. **Biofouling**, v. 32, n. 6, p. 635-644. 2016.

MARTIN-SANCHEZ, P.M. *et al.* Improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 129, n. 1, p. 89-94. 2018.

MIRANDA, R.C. *et al.* Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco -Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 147-152. 2007.

MOLLA, A.H. *et al.* A potential resource for bioconversion of domestic wastewater sludge. **Bioresourcetechnology**, v. 85, n. 3, p. 263-272. 2002.

PARBERY, D.G. Isolation of the Kerosene Fungus, *Cladosporium resinae*, from Australian Soil. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 50, n. 4, p. 682-IN3. 1967.

PARBERY, D.G. The natural occurrence of *Cladosporium resinae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 53, n. 1, p. 15-23. 1969.

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

PASSMAN, F.J.; KELLEY, J.; WHALEN, P. Interlaboratory study comparing two fuel microbiology standard test methods. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 141, p. 17-23. 2019.

RADWAN, O.; GUNASEKERA, T.S.; RUIZ, O.N. Robust multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for universal detection of microorganisms in fuel. **Energy and Fuels**, v. 32, n. 10, p. 10530–10539. 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b02292>

RAFIN, C.; VEIGNIE, E. *Hormoconis resinae*, the kerosene fungus. In: MCGENITY, Terry J. **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes**. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Switzerland: Springer, 2019. p. 299–318.

RAIKOS, V. *et al.* Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**, v. 90, n. 2, p. 695–700. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.09.030>

RAIKOS, V. *et al.* Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, v. 93, p. 559–566. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.028>

RAUCH, M. E, *et al.* Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 29–36. 2006. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0023-x>

ROBBINS, J.A.; LEVY, R. A review of the microbial degradation of fuel. In: PAULUS, Wilfried. **Directory of Microbicides for the Protection of Materials: a Handbook**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 177-201.

ROSALES, B.M.; IANNUZZI, M. Aluminium AA2024 T351 aeronautical alloy. Part 1. Microbial influenced corrosion analysis. **Materials Science and Engineering**, v. 472, n. 1-2, p. 15–25. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2007.06.079>

SINGHAL, N. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 1-16. 2015.

SIPORIN, C.; COONEY, J.J. Inhibition of glucose metabolism by n hexadecane in *Cladosporium (Amorphotheca) resinae*. **Journal of Bacteriology**, v. 128, n. 1, p. 235–241. 1976.

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

SOUZA, Lorena Mendes de; MENDES, Pietro; ARANDA, Donato. Assessing the current scenario of the Brazilian biojet market. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 98, n. 10, p. 426-438. 2018.

STOLK, A.; SAMSON, A.R. **The genus Talaromyces**: Studies on Talaromyces and related. 2nd ed. Netherlands: CBS, 1972.

VALLE, Soelly Magalhaes do. **Estudo da corrosão microbiológica do alumínio e liga de alumínio 2024, por contaminantes fúngicos de turbo combustível**. 1991.

Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

WHITE, J. *et al.* Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation.

Applied and Environmental Microbiology, v. 77, n. 13, p. 4527–4538. 2011.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02317-10>



Figura 6- Capa do Livro: Coletânea Estudos Ambientais e Agronômicos; resultados para o Brasil / Camila Pinheiro Nobre e Anna Christina Sanazario de Oliveira (Org.). São Luís: Editora Pascal LTDA, 2020.

CAPÍTULO 22

**PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E
CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE
MICROORGANISMOS DE QUEROSENE
DE AVIAÇÃO E BIOQUEROSENE
DURANTE ESTOCAGEM SIMULADA**

PROSPECTION, IDENTIFICATION AND GROWTH CAPACITY OF
MICROORGANISMS IN JETFUEL AND BIOJETFUEL DURING
SIMULATED STORAGE

Mariane Rodrigues Lobato
Donato Alexandre Gomes Aranda
Nelson Roberto Antoniosi Filho
Marcia T. S Lutterbach
Pedro Rodrigo Scorza
Juciana Clarice Cazarolli
Fátima Menezes Bento

Figura 7 – Autores do capítulo: PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO E BIOQUEROSENE DURANTE ESTOCAGEM. SIMULADA. Coletânea Estudos Ambientais e Agrônômicos; resultados para o Brasil / Camila Pinheiro Nobre e Anna Christina Sanazario de Oliveira (Org.). São Luís: Editora Pascal LTDA, 2020.

6 CONCLUSÃO DA TESE

Foram realizados estudos de prospecção a partir de amostras de combustível e biocombustível de aviação. Das amostras de querosene de aviação foi possível identificar 6 fungos filamentosos, 4 fungos leveduriformes e 4 bactérias. Por sua vez, das amostras de bioquerosene de aviação (Farnesano) foi possível identificar 1 fungo filamentoso e 2 bactérias.

A levedura *Exophiala phaeomuriformis* UFRGS Q4.2 foi selecionada para ensaios de estocagem simulada a partir do tempo de viragem do indicador redox (DCPIP). Os resultados das análises da biomassa da *E. Phaeomuriformis* indicou maior crescimento na mistura 10% BioQAV-QAV do que no QAV e BioQAV.

Não foram observadas diminuições com significância estatística (degradação) dos compostos do tratamento 10% BioQAV-QAV com inóculo da levedura *E. Phaeomuriformis* pela técnica de GC-MS, mesmo sendo esse o tratamento onde houve maior valor de biomassa recuperada.

Os resultados obtidos a partir da análise do peso seco e das análises de degradação do composto decano, no QAV e dos compostos nonano e decano no 10% BioQAV indicam que o fungo *Hormoconis resiniae* foi capaz de utilizar esses compostos dos combustíveis para seu crescimento.

É importante ressaltar que embora não tenha sido observada produção de biomassa nos tratamentos de BioQAV com nenhum dos fungos utilizados no estudo o farnesano não apresentou toxicidade aos esporos, uma vez que foi observado o crescimento dos fungos quando inoculados em meio de cultura.

Estudos, subsequentes, de análises metagenômicas e transcriptômicas bem como análises laboratoriais deverão ser realizados para uma maior elucidação do funcionamento (papel) de cada microrganismo nos combustíveis e sistemas de aviação.

Deverão, igualmente, serem considerados estudos com delineamento experimental que utilizem técnicas analíticas (GC, GC-MS, e GC-GC) com diferentes proporções de fase aquosa/combustível a fim de avaliar se pequenas variações produzidas pelos microrganismos poderão ser discriminadas.

7 REFERÊNCIAS

ADETITUM, D.O. *et al.* Biodegradation of Jet fuel by three Gram negative bacilli isolated from Kerosene contaminated soil. **Pollution**, v. 4, n. 2, p. 291-303. 2018. <http://dx.doi.org/10.22059/poll.2017.241366.319>

AGÊNCIA NACIONAL DE AVIAÇÃO CIVIL. **Combustíveis sustentáveis para aviação**. Brasília: ANAC; 2019. Disponível em: <https://www.anac.gov.br/assuntos/paginas-tematicas/meio-ambiente/combustiveis-sustentaveis-para-a-aviacao#> . Acesso em: 4 out. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE AVIAÇÃO CIVIL. **Homepage**. Brasília: ANC, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anac/pt-br> Acesso em: 9 nov. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução nº 856, de 22 de outubro de 2021**. Brasília: ANP, 2021.

AKTAS, D.F. *et al.* Effects of oxygen on biodegradation of fuels in a corroding environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 114–126. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.006>

ALLSOPP, D. *et al.* **Introdução à biodeterioração**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ATSM D1655**: 2019. ATSM, 2019a. Disponível em: https://infostore.saiglobal.com/en-au/standards/astm-d-1655-2019-141453_saig_astm_astm_2714774/. Acesso em: 4 out. 2022.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ATSM D4054**: 2019. ATSM, 2019b. Disponível em: https://infostore.saiglobal.com/en-us/standards/astm-d-4054-2019-147730_saig_astm_astm_2731455/. Acesso em: 4 out. 2022.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ATSM D7566**: 2019. ATSM, 2019c. Disponível em: https://infostore.saiglobal.com/en-us/standards/astm-d-7566-2019-158110_saig_astm_astm_2714863/. Acesso em: 4 out. 2022.

ANGELL, P. *et al.* A multiple chemostat system for consortia studies on microbially influenced corrosion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, n. 3, p. 173–178. 1997.

AZADI, P. *et al.* The evolution of the biofuel science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. C, p. 1479-1484, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.181>
<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=422075>. Acesso em: 4 out. 2022

BAENA-ZAMBRANA, S. *et al.* Behaviour of water in jet fuel: a literature review. **Progress in Aerospace Sciences**, v. 60, p. 35–44, jul. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.paerosci.2012.12.001>

BAKANAUKAS, S. **Bacterial Activity in JP-4 Fuel**. [S. l]: Wright Air Develop Center Rept 1958. p. 32-58.

BAUEN, A. *et al.* Sustainable Aviation Fuels. **Johnson Matthey Technology Review**, v. 64, n. 3, p. 263–78. 2020. <http://dx.doi.org/10.1595/205651320X15816756012040>

BEECH, I.B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 181–186. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2004.05.001>

BENTO, F. M. *et al.* Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In: PINHO, D. M.M.; SUAREZ, P. A. Z. (Orgs.). **Armazenagem e uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle**. Brasília: CDT; UNB, 2016. p. 112-175.

BENTO, F.M. *et al.* Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. **World Journal Microbiololy and Biotechnololy**, v. 21, n. 2, p. 135–142. 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/S11274-004-3042-2>

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 107–112. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00112-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00112-8)

BENTO, Fatima Menezes; GAYLARDE, C.C.; CAMARGO, F.A.O. Biossurfactantes. In: AZEVEDO, João Lucio; MELO, Itamar Santos. (Org.). **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2008. p. 151-184.

BLAKEY, S.; RYE, L.; WILSON, C.W. Aviation gas turbine alternative fuels: a review. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 33, n. 2, p. 2863-2885. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2010.09.011>

BOSZCZYK-MALESZAK, H. *et al.* Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values. **Polish Journal of Microbiololy**, v. 55, n. 1, p. 69–73. 2006.

BROWN, L.M. *et al.* Community dynamics and phylogenetics of bacteria fueling Jet A and JP-8 aviation fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 3, p. 253-261. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.01.008>

BROWNE, A.B. Sustentable and effective preservation strategies for Ultra Low sulphur diesel biodiesel and unleaded gasoline. In: IASH, 2011, The 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Sarasota, 2011. **Proceedings [...]**. Florida, 2011.

BÜCKER, F. *et al.* Evaluation of the deteriogenic microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage. **Fuel**, v. 233, p. 911-917. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.076>

CANTER, N. The regulatory future of antimicrobial pesticides. **Tribology and Lubrication Technology**, v. 68, n. 3, p. 34-45. 2012.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Biocombustíveis Aeronáuticos**: progressos e desafios. Brasília: CGEE, 2010.

CHICIUDEAN, I. *et al.* Jet a-1 bacterial contaminationa case study of cultivable bacteria diversity, alkane degradation and biofilm formation. **Polish Journal Environmental Studies**, v. 28, n. 6, p. 4139-4146. 2019. <https://doi.org/10.15244/pjoes/99108>

CHUNG, Y.C. *et al.* Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. **Fuel**, v. 79, n. 12, p. 1525–1532. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(99\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(99)00267-7)

COMMERCIAL AVIATION ALTERNATIVE FUELS INITIATIVE. 2021. CAAFI Webinar Series: the State of Sustainable Aviation Fuel (SAF). Washington, DC: CAAFI, 2021. Disponível em: https://caafi.org/resources/pdf/CAAFI_Webinar_State_of_SAF_05_06_2020.pdf. Acesso em: 4 out. 2022.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011p. 941810. 2010. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>

DENARO, T.L. *et al.* **DNA Isolation of microbial contaminants in aviation turbine fuel via traditional Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct pcr preliminary results**. Fort Belvoir; DTIC, 2005. p. 1–24. Disponível em: <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA446701>. Acesso em: 5 out. 2022.

DODOS, G.S. *et al.* Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Global Nest Journal**, v. 14, n. 2, p. 175-182. 2012. <https://doi.org/10.30955/gnj.000856>

DUONG, L. H, *et al.* Soap-derived biokerosene as an aviation alternative fuel: production, composition, and properties of various blends with jet fuel. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 153, p. 107980, maio. 2020.

EDWARDS, J.T. Reference Jet Fuels for Combustion Testing. *In*: 55th AIAA Aerospace Sciences Meeting, 2017, Texas. **Anais ...Texas**: AIAA, 2017. p. 9-13.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds- from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803–816. 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2652>

GAMMON, J. **ASTM MNL5-4TH** - Aviation Fuel - Quality Control Procedures. 4th ed. Baltimore: ASTM, 2009.

GASSEN, J. *et al.* Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel)

and B7 (blend), degradation and molecular detection. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 541–547. 2015. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15613>

GAYLARDE, C. C. Design, selection and use of biocides. In: GAYLARDE, C.; VIDELA, H. (Ed.). Bioextraction and biodeterioration of metals. New York: Cambridge University Press, 1995. p. 327-360.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Review Microbiology**, v. 30. n. 1, p. 1–10. 1999. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000100001>

GRADY, S. L. *et al.* A comprehensive multi-omics approach uncovers adaptations for growth and survival of *Pseudomonas aeruginosa* on n-alkanes. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1. p. 1–19. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3708-4>

GRAEFF, H.W. **An analysis of microbial contamination in military aviation fuel systems**. 2003. Tese (Mestrado em Engenharia) - Air Force Institute of Technology, Ohio, 2003.

GUIAMET, Patricia Sandra; SARAIVA, Sandra Gabriela Gomez de. Biofilms formation and Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) in different materials. **Innovations in Corrosion and Materials Science**, v. 7, n. 2, p. 117-1215. <https://doi.org/10.2174/2352094907666170420122727>

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

GUTIÉRREZ-ANTONIO, C. *et al.* A review on the production processes of renewable jet fuel. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 709-729, nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.108>.

HEMIGHAUS, G. *et al.* Aviation fuels technical review. **Chevron Corporation**. 2006. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2009544](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2009544). Acesso em: 3 out. 2022.

HIEN, L.T. *et al.* Microbial diversity in trace water of jet fuel in Vietnam. **ASEAN Journal on Science & Technology for Development**, v. 25, n. 2, p. 413–420. 2007. <https://doi.org/10.29037/ajstd.260>

HILL, E.C. Microbial corrosion in ships tanks – detection and remediation. **ECHA Microbiology**, p. 2–14. 2000.

HILL, E.C.; HILL, G.C. Microbial contamination and associated corrosion in fuels, during storage, distribution and Use. **Advanced Materials Research**, v. 38, p. 257-268. 2008. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.38.257>

HILL, G.C. **Investigation of Susceptibility of Alternative Jet Fuels to Microbiological Growth**: ALFA-BIRD Project. St Mellons: ECHA Microbiology Limited, 2012. Disponível em:

https://www.caafi.org/news/pdf/ECHA_Microbial_Rpt_Alpha_Bird_Jun12.pdf. Acesso em 6 out. 2022.

HILL, T. Microbial growth in aviation fuel. **Aircraft Engineering and Aerospace Technology**; **Bradford** v. 75, n. 5, p. 497-502. 2003. <http://dx.doi.org/10.1108/00022660310492582>

HOLMES, C. *et al.* Monitoring water contamination in jet fuel using silica-based bragg gratings. **IEEE Sensors Journal**, v. 19, n. 8. p. 2984–2990. 2019.

HU, D. *et al.* Profiling the microbial contamination in aviation fuel from an airport. **Biofouling**, v. 35, n. 8, p. 856–869. 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2019.1671977>

IANNUZZI, M.; ROSALES, B.M. Microbiologic contamination and corrosion of aircraft integral fuel tanks: evaluation and risk control. **Materials Performance**, v. 42, n. 6, p. 62–66. 2003.

IVANOVA, A.E.; KANAT'EVA, A.Y.; KURGANOV, A.A. Aerobic Biodegradation of Liquid Motor Fuels under Extreme Acidic Conditions. **Microbiology Russian Fed**, v. 88, n. 3, p.300–308. 2019.

JIA, T. *et al.* A comprehensive review of the thermal oxidation stability of jet fuels. **Chemical Engineering Science**, v. 229, p. 116157. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/J.CES.2020.116157>

JOHN, R.C. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 88, n. 6, p. 1014-1019. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0598-7>

Joint Inspection Group. **Bulletin-83 Microbial monitoring strategies**. Cambourne: JIG, 2015. Disponível em: <https://www.jigonline.com/wp-content/uploads/2015/11/Bulletin-83-Microbial-Monitoring-Strategies-Oct-2015.pdf>. Acesso em: 5 out. 2022.

KELLEY, Joan. **FUELSTAT® (US 2004/0115748 A1)**. Depositante: Pritchells Cottage. US 2004/0115748A1. Depósito: 21 fev. 2002. Concessão: 17 jun. 2004.

KLEIN, B.A *et al.* Draft genome sequences of dermacoccus nishinomiyaensis strains UCD-KPL2534 and UCD- KPL2528 isolated from an indoor track facility. **Genome Announcements**, v. 5, n. 8, e01652- 16. 2018. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01652-16>

KOSIR, S. *et al.* High-performance jet fuel optimization and uncertainty analysis. **Fuel**, v. 281, p. 118718. dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118718>

KOTU, S.P.; MANNAN, M.S.; JAYARAMAN, A. Emerging molecular techniques for studying microbial community composition and function in microbiologically influenced corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 144, n. 1, p.

104722. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104722>

LEE, J.S.; RAY, R.I.; LITTLE, B.J. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. **Biofouling**, v. 26, n. 6, p. 623–635. 2010. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2010.504984>

LIN, C. H.; CHEN, Y.K.; WANG, W. C. The production of bio-jet fuel from palm oil derived alkanes. **Fuel**, v. 260, p. 116345. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116345>

LITTLE, B.J.; LEE, J.S. Microbiologically influenced corrosion: an update. **International Materials Reviews**, v. 59, n. 7, p. 384–393. 2014. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000035>

LOBATO, M.R. *et al.* Prospecção, identificação e capacidade de crescimento de microrganismos de querosene de aviação e bioquerosene durante estocagem simulada. *In*: NOBRE, Camila Pinheiro; OLIVEIRA, Anna Christina Sanazario de. **Estudos ambientais e agrônômicos, resultados para o Brasil**. São Luís: Editora Pascal, 2020. p. 249-270.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MATVYEYEVA, O; VOVK, Y; NILOW, O. Microbiological contamination of motors fuels: analyses and identification in fuelling companies. **Advances in Aerospace Technology**, v. 86, n. 1, p. 49–56. 2021. <https://doi.org/10.18372/2306-1472.86.15444>

MCCOMB, Jerrod P. **A metagenomic analysis of microbial contamination in aviation fuels**. 2009. Thesis (Doctorate of Science in Engineering Management) - Graduate School of Engineering and Management, Air University, Ohio. 2009. Disponível em: <https://scholar.afit.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3592&context=etd>. Acesso em: 4 out 2022.

NAYA, S. Estimating water and solid impurities in jet fuel from ISO codes. **Energy and Fuels**, v. 27, n. 12, p. 858–867. 2013. <https://doi.org/10.1021/ef401378z>

NEQAL, M. *et al.* New active supported antifungal systems for potential aeronautical application. **European Polymer Journal**, v. 105, p. 304-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.029>

NEULING, Ulf; MARTIN, Kaltschmitt. Techno-economic and environmental analysis of aviation biofuels. **Fuel Processing Technology**, v. 171, p. 54–69. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2017.09.022>

NEVES, R.C. *et al.* A vision on biomass-to-liquids (BTL) thermochemical routes in

integrated sugarcane biorefineries for biojet fuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. C. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2019.109607>

OM, N. *et al.* Influência do refino de petróleos pesados sobre as principais características do combustível de aviação. In: RIO OIL & GAS EXPO AND CONFERENCE 2004. **Anais....**Rio de Janeiro; *Instituto Brasileiro do Petróleo e Gás*, 2004. p. 1–7. Disponível em: <https://www.osti.gov/etdeweb/servlets/purl/21030442>. Acesso em: 3 out. 2022.

PASSMAN, F.J. **Fuel and Fuel System Microbiology**: fundamentals, diagnosis and contamination control. [S.l]: ASTM, 2003.

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

PASSMAN, F.J.; KELLEY, J.; WHALEN, P. Interlaboratory study comparing two fuel microbiology standard test methods. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 141, p. 17-23. 2019.

PEREIRA R.P.T; RIBEIRO, G.M; FILIMONAU, V. The carbon footprint appraisal of local visitor travel in Brazil: a case of the Rio de Janeiro-São Paulo itinerary. **Journal of Cleaner Production**, v. 141, p. 256–66. 2017.

PETROBRÁS. **Querosene de Aviação**: informações técnicas 2019. Rio de Janeiro. 2021. Disponível em: <http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/public/downloads/QAV-Informações-Técnicas>. Acesso em: 3 out. 2022.

PETROBRÁS. **Querosene de Aviação**: informações técnicas. Rio de Janeiro. 2021. Disponível em: <https://petrobras.com.br/data/files/9A/47/97/3E/104ED7105FC7BCD7E9E99EA8/Manual%20de%20Querosene%20de%20Aviacao%202021.pdf>. Acesso em: 3 out. 2022.

PRENAFETA-BOLDÚ, Francesc X.; HOOG, G. Sybren de; SUMMERBELL, Richard C. Fungal communities in hydrocarbon degradation. In: MCGENITY, T. (Eds.). **Microbial Communities utilizing hydrocarbons and lipids**: members, metagenomics and ecophysiology Cham: Springer, 2019. p. 307-342.

Proceedings of the Combustion Institute, v. 33, n. 2, p. 2863–2885, jan. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proci.2010.09.011>

RABAEV, M, *et al.* International Biodeterioration & Biodegradation Effect of the fuel system icing inhibitor diethylene glycol monomethylether on the biodegradation of jet fuel in soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 6, p. 311-315. 2009.

RADWAN, O.; GUNASEKERA, T.S.; RUIZ, O.N. Robust multiplex quantitative

polymerase chain reaction assay for universal detection of microorganisms in fuel. **Energy and Fuels**, v. 32, n. 10, p. 10530–10539. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b02292>

RAFIN, C.; VEIGNIE, E. *Hormoconis resinae*, the kerosene fungus. In: MCGENITY, Terry J. **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Switzerland: Springer, 2019. p. 299–318.

RAIKOS, V. *et al.* Identification and characterization of microbial contaminants isolated from stored aviation fuels by DNA sequencing and restriction fragment length analysis of a PCR-amplified region of the 16S rRNA gene. **Fuel**, v. 90, n. 2, p. 695–700. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.09.030>

RAIKOS, V. *et al.* Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, v. 93, p. 559–566. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.028>

RAJASEKAR, A. *et al.* Bacterial degradation of petroleum hydrocarbons. In: SINGH, Shree Nath. **Microbial Degradation of Xenobiotics**. Berlin: Springer, 2012. p. 339–369.

RAUCH, M. E. *et al.* Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 29–36. 2006. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0023-x>

REPETTO; S.L.; COSTELLO, J.F.; PARMENTER, D. Current and Potential Aviation Additives for Higher Biofuel Blends in Jet A-1. **Biofuels for Aviation**, p. 261–275. 2016.

Revista de Biología Tropical, v. 57, n. 3, p. 489-504.2009. <https://doi.org/10.15517/rbt.v57i3.5470>

ROBBINS, J.A.; LEVY, R. A review of the microbial degradation of fuel. In: PAULUS, Wilfried. **Directory of Microbicides for the Protection of Materials: a Handbook**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 177-201.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Carlo E.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI Evelyn; BLANCO Rigoberto. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica.

ROFFEY, R. Microbial problems during long-term storage of petroleum products underground in rock caverns. **International Biodeterioration**, v. 25, n. 1-3, p. 219-36. 1989. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(89\)90048-1](https://doi.org/10.1016/0265-3036(89)90048-1)

ROSALES, B.M.; IANNUZZI, M. Aluminium AA2024 T351 aeronautical alloy. Part 1. Microbial influenced corrosion analysis. **Materials Science and Engineering**, v. 472, n. 1-2, p. 15–25. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2007.06.079>

RUAMCHAT, K.; THAWESAENSKULTHAI, N.; PONGPANICH, C. A method of prioritizing quality improvement in aviation refuelling services at airport. **Advances in**

Mechanical Engineering, v. 9, n. 6, p. 1–12.
<https://doi.org/10.1177/168781401770643>

RUIZ, O. *et al.* Metagenomic characterization reveals complex association of soil hydrocarbon-degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 157, p. 105161. 2021.

RYE, L.; BLAKEY, S.; WILSON, C. W. Sustainability of supply or the planet: a review of potential drop-in alternative aviation fuels. **Energy & Environmental Science**; v. 3, n. 1, p. 17–27. 2010. <https://doi.org/10.1039/B918197K>

SANCY, M. *et al.* Biofilm formation on aluminum alloy 2024: a laboratory study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 737, p. 212–217. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.08.015>

SHAPIRO, T. *et al.* Revealing of non-cultivable bacteria associated with the mycelium of fungi in the kerosene-degrading community isolated from the contaminated jet fuel. **Journal of Fungy**, v. 7, n. 1, p. 43. 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7010043>

SHARIAR, Fahim. KHANAL, Aaditya. The current techno-economic, environmental, policy status and perspectives of sustainable aviation fuel (SAF). **Fuel**, v. 325, p. 124905. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124905>

SHKILNIUK, I.; BOICHENKO, S. Biological risk of aviation fuel supply. In: ZAGADNIENIA, Wybrane. **Systemy i srodki transportu samochodowego: efektywnosc i bezpieczenstwo**. Rzeszów: Springer, 2019. p. 179–199.

SØRENSEN, G. *et al.* Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5259–5264. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.017>

SUFLITA, J.M. *et al.* Molecular tools to track bacteria responsible for fuel deterioration and microbiologically influenced corrosion. **Biofouling**, v. 8, n. 9, p. 1003–1010. 2012. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.723695>

UNITED STATES. Office of Energy Efficiency & Renewable Energy. **Sustainable aviation fuel: review of technical pathways**. Washington: EERE, 2020. Disponível em: <https://www.energy.gov/sites/default/files/2020/09/f78/beto-sust-aviation-fuel-sep-2020.pdf>. Acesso em: 4 out. 2022.

VALLE, Soelly Magalhaes do. **Estudo da corrosão microbiológica do alumínio e liga de alumínio 2024, por contaminantes fúngicos de turbo combustível**. 1991. Tese (Doutorado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 503–549. 2003. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003>

VIDELA, A.H. *et al.* Effects of fungal and bacterial contaminants of kerosene fuels on the corrosion of storage and distribution systems. *In: Conference: Corrosion '88: National Association of Corrosion Engineers meeting.* 1988. **Anais...** St. Louis, 1988.

VINHADO, Fábio da Silva; SOUZA, Lorena Mendes de; GONÇALVES, Marcelo de Freitas. Regulamentação e garantia da qualidade de combustíveis de aviação sustentáveis. *In: I Congresso da Rede Brasileira Bioquerosene e Hidrocarbonetos Renovação para Aviação,* 2019, Natal. **Anais....** Natal: Metalum, 2019. Disponível em: <https://ubr.bio.com.br/wp-content/uploads/2019/08/CURSO-1-FABIO-VINHADOANP-LORENAANP-MARCELO-GON%C3%87ALVESEMBRAER-1.pdf>. Acesso em: 4 out. 2022.

WEBSTER, R.L.; EVANS, D.J.; MARRIOTT, P.J. Detailed chemical analysis using multidimensional gas chromatography-mass spectrometry and bulk properties of low-temperature oxidized jet fuels. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2059–2066. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b00264>

WEI, H. *et al.* Renewable bio-jet fuel production for aviation: a review. **Fuel**, v. 254, p. 115999, Jun. 2019.

WHITE, J. *et al.* Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4527–4538. 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02317-10>

WISE, Marshall; MURATORI, Matteo; KYLE, Page. Biojet fuels and emissions mitigation in aviation: an integrated assessment modeling analysis. **Transportation Research Part D: Transport and Environment**, v. 52, p. 244-253, maio. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trd.2017.03.006>

YANG, T. *et al.* Propionate metabolism and diversity of relevant functional genes by in silico analysis and detection in subsurface petroleum reservoirs. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 182, set. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2350-2>

YEMASHOVA, N.A. *et al.* Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 315–337. 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-006-9118-8>

YILMAZ, N; ATMANLI, A. Sustainable alternative fuels in aviation. **Energy**, v. 140, n. 2, p. 1378- 1386. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.07.077>

ZALAR, P. *et al.* Dishwashers - a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. **Fungal Biology**, v. 115, n. 10, p. 997–1007. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007>

ZHANG, J. *et al.* Surface coating on aluminium substrate with polymeric guanidine derivative to protect jet fuel tanks from microbial contamination. **Surface and Coatings Technology**, v. 422, p. 127521. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.127521>

ZHANG, Z. *et al.* Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4111-4116. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.064>

ZIMMER, A. *et al.* Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). **Fuel**, v. 112, p. 153-62. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.062>

ZIMMER, A.; BENTO, F.M. Seleção de Biocidas. **Estudos ambientais e agrônômicos, resultados para o Brasil**. São Luís: Editora Pascal, 2020.

8 ANEXO A - ESPECIFICAÇÃO DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO JET A, JET A-1 E JET C

TABELA I - ESPECIFICAÇÃO DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO - JET A, JET A-1 e JET C

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO	
			ABNT NBR	ASTM
APARÊNCIA				
Aspecto	-	Claro, límpido e isento de água não dissolvida e material sólido à temperatura ambiente	14954 (1)	D4176 (1)
Cor	-	Anotar	14921	D156 D6045
Partículas Contaminantes, máx. (2)	mg/L	1,0	-	D5452 D2276
COMPOSIÇÃO				
Acidez total, máx.	mgKOH/g	0,015	-	D3242
Aromáticos, máx. (3)	% volume	25,0	14932	D1319 (29) D8267 (30) D8305 (30)
	% volume	26,5	-	D6379
Enxofre total, máx.	% massa	0,30	14533	D1266 D2622 D4294 D5453
Enxofre mercaptídico máx. ou Ensaio Doctor (4)	% massa	0,0030 negativo	6298 5275	D3227 D4952
COMPONENTES NA EXPEDIÇÃO DA REFINARIA PRODUTORA (5)				
Fração hidroprocessada	% volume	Anotar		
Fração severamente hidroprocessada (6)	% volume	Anotar		
VOLATILIDADE				
Destilação				
Ponto Inicial de Ebulição (PIE)	°C	anotar		
10% vol. Recuperados (T10), máx.	°C	205,0		D86 (7)
50% vol. Recuperados (T50)	°C	anotar	9619 (7)	D2887 (8)
90% vol. Recuperados (T90)	°C	anotar		D7344 (8)
Ponto Final de Ebulição (PFE), máx.	°C	300,0		D7345 (8)
Resíduo, máx.	% volume	1,5		
Perda, máx. (9)	% volume	1,5		
Ponto de fulgor, mín. (10)	°C	38,0	7974	D56 D93 D3828 D7236 (31)
Massa específica a 20°C	kg/m³	771,3 a 836,6	7148 14065	D1298 D4052
FLUIDEZ				
Ponto de congelamento, máx. (11)	°C	47,0 negativos (JET A-1) 40,0 negativos (JET A)	7975	D2386 D5972 D7153 D7154
Viscosidade a 20°C negativos, máx.	mm²/s	8,000	10441	D445 (12) D7042 (12) D7945


CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO	
			ABNT NBR	ASTM
COMBUSTÃO				
Poder calorífico inferior, mín.	MJ/kg	42,80		D4529 D3338 D4809
Ponto de fuligem, mín. ou Ponto de fuligem, mín. e	mm mm	25,0 18,0	11909	D1322 D1840 D8305 (30)
Naftalenos, máx. (13)	% volume	3,00		
CORROSÃO				
Corrosividade ao cobre (2h a 100°C), máx.		1	14359	D130
ESTABILIDADE				
Estabilidade térmica 2,5h - mín. 260°C queda de pressão no filtro, máx.	mmHg	25 menor que 3 (sem depósito de cor anormal ou de pavão)		D3241
depósito no tubo - método visual (14) (15)				
depósito no tubo - método instrumental, máx. (14) (16)	nm	85		
CONTAMINANTES				
Goma atual, máx. (17)	mg/100 mL	7	14525	D381
Chumbo, máx. (18)	g/L	0,005		D3237
Índice de separação de água, MSEP (19) com dissipador de cargas estáticas, mín. sem dissipador de cargas estáticas, mín.		70 85		D3948
CONDUTIVIDADE				
Condutividade elétrica (20)	pS/m	50 a 600		D2624
LUBRICIDADE				
Lubricidade BOCLE, máx. (21)	mm	0,85		D5001
ADITIVOS				
Antioxidante, máx.	mg/L	24,0		
Desativador de metal (aditivção inicial), máx. (22)	mg/L	2,0		
Desativador de metal (aditivção cumulativa), máx. (22)	mg/L	5,7		
Dissipador de cargas estáticas (aditivção inicial), máx. (23)	mg/L	3		
Dissipador de cargas estáticas (aditivção cumulativa), máx. (23)	mg/L	5		
Inibidor de formação de gelo	% volume	0,07 a 0,15		
Detector de vazamentos, máx. (24)	mg/kg	1		
Melhorador de lubrificidade, máx. (25)	mg/L	23		
ENSAIOS COMPLEMENTARES (26)				
Teor de biodiesel, máx. (27)	mg/kg	50		D7797
Aditivo redutor de arrasto em dutos (DRA), máx.	µg/L	72		D7872

9 ANEXO B - REQUISITOS ADICIONAIS DA ESPECIFICAÇÃO DO JET C

TABELA II - REQUISITOS ADICIONAIS DA ESPECIFICAÇÃO DO JET C

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO	
			ABNT NBR	ASTM
COMPOSIÇÃO				
Aromáticos, máx. (3)	% volume	8,0	14932	D1319 (29) D8305 (30)
	% volume	8,4	-	D6379
VOLATILIDADE				
Destilação:				D86 (7)
T50 menos T10, min.	°C	15	9619 (7)	D2887 (8) D7344 (8)
T90 menos T10, min.	°C	40		D7345 (8)
LUBRIFICIDADE				
Lubricidade BOCLÉ, máx.	mm	0,85		D5001
FLUIDEZ				
Viscosidade a 40°C negativos, máx. (28)	mm ² /s	12,00	10441	D445 (12) D7945

10 ANEXO C - CERTIFICADO DE QUALIDADE BIOQUEROSENE- AMYRIS


	COA_JET_GQA_015/17 CERTIFICADO DA QUALIDADE	Rua James Clerk Maxwell, 315 - Condomínio Techno Park Cep: 13069-380 Campinas - SP Fone: 55 (19) 3783 9450
---	--	---

Parte I: Identificação

Cliente:	Gel	Nome IUPAC:	2,6,10-trimethyldodecane
Produto:	Synthesized Iso-Paraffin(SIP) Grade Farnesane	Lote:	17P0105183060003
CAS RN:	3891-98-3		

Parte II: Requisitos detalhados do lote; Synthesized Iso-Paraffin(SIP) a partir do hidroprocessamento de açúcares fermentados

Descrição do teste	Método	Especificação	Resultado	Disposição	Laboratório
Composição					
Acidez Total KOH/g	D3242	Max 0,015	0,004	Passa	Saybolt
Volatilidade					
Destilação Física					
Temperatura de destilação, °C					
10% Recuperado, temperatura (T10)	D86	Máx 250	241	Passa	Saybolt
50% Recuperado, temperatura (T50)		Reportar	241	Passa	
90% Recuperado, temperatura (T90)		Reportar	241	Passa	
Ponto de ebulição final, temperatura		Máx 255	244	Passa	
T90-T10		Máx 5	0	Passa	
Resíduo de destilação, %		Máx 1,5	1,3	Passa	
Perda de destilação, %		Máx 1,5	0,2	Passa	
Ponto de fulgor, °C	D93	Mín 100	113	Passa	


	COA_JET_GQA_015/17 CERTIFICADO DA QUALIDADE	Rua James Clerk Maxwell, 315 - Condomínio Techno Park Cepo: 13069-380 Campinas - SP Fone: 55 (19) 3783 9450
---	--	--

Densidade à 15°C, kg/l ³	D4052	765-780	771,8	Passa	Saybolt
Fluidez					
Ponto de congelamento, °C.	D2386	Máx -60	< -78	Passa	Saybolt
Contaminantes					
Goma existente, mg/100ml	D381	Máx 7	< 1	Passa	Saybolt
Microseparmetro, classificação sem adição de condutividade elétrica.	D3948	Min 85	95	Passa	Anatech
Estabilidade Térmica (2,5h à temperatura controlada)					
Temperatura, °C.	D3241	Min 355	355	Passa	Saybolt
Queda de pressão no filtro, mmHg.		Máx 25	< 1	Passa	
Depósito tubo de classificação		Máx 3	1	Passa	
Combustão					
Calor líquido de combustão, MJ/kg	D4809	Min 43,5	44,0	Passa	Saybolt
Aditivos					
Antioxidantes, mg/L	P 540	17 to 24	21	Passa	Dixie

Parte III: Outros Requerimentos detalhados; Synthesized Iso-Paraffin(SIP) a partir do hidroprocessamento de açúcares fermentados

Composição do Hidrocarboneto					
Hidrocarbonetos saturados, massa %	X001	Min 98	100	Passa	Saybolt
Farnesano, massa %		Min 97	99	Passa	
Hexahidroxifarnesol, massa%.		Máx 1,5	0,0	Passa	

Esse documento é propriedade da Amyris Brasil Ltda.
Confidencial, distribuição proibida

	COA_JET_GQA_015/17 CERTIFICADO DA QUALIDADE	Rua James Clerk Maxwell, 315 - Condomínio Techno Park Cep: 13069-380 Campinas - SP Fone: 55 (19) 3783 9450
---	--	---

Diefinas, mgBr2/100g	D2710	Máx 300	42	Passa	Saybolt
Aromaticos, massa%	D2425	Máx 0,5	0,1	Passa	Saybolt
Carbono e Hidrogênio	D5291	Min 99,5	100	Passa	Saybolt
Composição de Não-hidrocarbonetos					
Nitrogênio, mg/kg	D4629	Máx 2	< 1	Passa	Saybolt
Água, mg/kg	D6304	Máx 75	37	Passa	Saybolt
Enxofre, mg/kg	D2622	Máx 2	< 1	Passa	Saybolt
Metals, (Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Pd, Pt, Sn, Sr, Ti, V, Zn), mg/kg.	UOP 389	Máx 0,1/metal	< 0,1	Passa	Dixie
Halogênio, mg/Kg.	D7359	Máx 1/halogênio	< 1	Passa	Saybolt

CONCLUSÃO

- Aprovado.
 Reprovado.

Jéssica Correia Ramella Sães

Coordenadora de Química Analítica

CRQ: 104.269 - 4ª Região

Date of approval: 07/06/2017

Signature electronics, authenticated by system.

Observações: