

COMO A ADIÇÃO DE BIODIESEL PODERÁ IMPACTAR O ÓLEO DIESEL MARÍTIMO DURANTE A ESTOCAGEM?*

THAIS LIVRAMENTO SILVA**
Bióloga

JUCIANA CLARICE CAZAROLLI***
Bióloga

MARCO FLORES FERRÃO****
Químico

FÁTIMA MENEZES BENTO*****
Bióloga

SUMÁRIO

Introdução
Material e Métodos
Resultados
Conclusão

INTRODUÇÃO

Historicamente, a principal fonte de energia no setor industrial tem sido o petróleo, mas alternativas renováveis e de menor impacto ao ambiente já são uma realidade no cenário mundial. Tanto o biodiesel quanto o óleo diesel são gerados a partir da exploração dos recursos

naturais e, em escala econômica, podem ser classificados como produtos do setor primário. Os chamados biocombustíveis, como o biodiesel de primeira, segunda ou terceira geração, são produzidos a partir de matérias-primas diversas, como óleo de soja, óleos não comestíveis e microalgas, respectivamente. Possuem vantagens importantes sobre o combustível fóssil, como

* Baseado na Dissertação de Mestrado de Thais Livramento Silva, intitulada “Avaliação do impacto da adição de biodiesel e misturas (B10 e B20) óleo diesel marítimo durante estocagem simulada” apresentada em julho de 2020, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob orientação da Prof. Dra. Fátima Menezes Bento.

** Graduada em Biologia e mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

*** Graduada em Biologia, mestre e doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

**** Professor e orientador na UFRGS, com mestrado, doutorado e pós-doutorado em Química. Atua nas áreas de Química e Engenharia, com ênfase em Quimiometria, Espectroscopia Molecular, Biocombustíveis e Pesquisa Operacional.

***** Professora e orientadora na UFRGS, com mestrado, doutorado e pós-doutorado em Microbiologia de Combustíveis. Atua nas áreas de Biodeterioração, Biodegradação, Biorremediação de Combustíveis e Biocombustíveis. Atualmente, é professora associada da UFRGS, pesquisadora do CNPq e coordenadora do Labbio.

menor geração de poluentes, por exemplo, o dióxido de carbono e compostos nitrogenados (DEMIRBAS, 2017; OTHMAN *et al.*, 2017; HOSSEINZADEH-BANDBAFHA *et al.* 2018; SAKTHIVEL *et al.* 2018; CLUME *et al.*, 2019).

As atividades de transporte de cargas são as que mais contribuem para a poluição em ambientes aquáticos, especialmente pela emissão de gases de embarcações de diferentes portes (MOHD *et al.*, 2018; CLUME *et al.*, 2019). Neste sentido, a limitação das emissões tem sido controlada pela Organização Internacional Marítima (IMO), que precisou encontrar uma nova alternativa para os motores marítimos. Ao nível internacional, o biodiesel foi escolhido por ser uma alternativa aceitável ambientalmente e pela possibilidade de redução da dependência dos combustíveis fósseis.

No Brasil, os biocombustíveis foram incorporados à matriz energética por meio de leis que determinam a obrigatoriedade de sua adição (ANP, 2009; CLUME *et al.*, 2019). Atualmente, para o óleo diesel rodoviário é estabelecida pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) a adição obrigatória mínima de 12% de biodiesel (B12) e máxima de 15% (B15) (ANP, 2019). Para o óleo diesel marítimo, ainda não há qualquer determinação oficial sobre adição de biodiesel, como ocorrido com o diesel rodoviário. Embora existam várias vantagens que validam o biodiesel como um sucessor natural do óleo diesel, características como a baixa estabilidade ao armazenamento a longo prazo, higroscopicidade, desempenho a baixas temperaturas e ação solvente devem ser consideradas quanto a sua aplicabilidade em embarcações.

Durante o transporte e o armazenamento de combustíveis, pode ocorrer o acúmulo de água na parte inferior dos tanques de caminhões, das embarcações e em tanques

(aéreos ou subterrâneos). A entrada da água pode acontecer por problemas de vedação e, principalmente, pela condensação da umidade nas paredes dos caminhões e tanques. A higroscopicidade, que é uma tendência natural do biodiesel em absorver água, é um dos fatores importantes a considerar no uso de biodiesel em ambientes de alta umidade, pelo risco acelerado de alteração no teor de água permitido e especificado. O contato direto com a água (dissolvida e/ou na fase livre) favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de biofilmes, que podem concentrar-se na interface óleo-água ou aderidos às paredes do tanque (SUFLITA *et al.*, 2012; BÜCKER *et al.*, 2014; BENTO *et al.* 2016; DA FONSECA *et al.*, 2019; CAZAROLLI *et al.* 2020). A preocupação com perdas econômicas e manutenção da qualidade dos produtos é uma questão de interesse mundial, e problemas associados à contaminação microbiana de combustíveis, como o óleo diesel e biodiesel, vêm sendo relatados e reconhecidos na literatura (HAGGETT & MOCHAT, 1991; BENTO *et al.*, 1996; 2001; 2016; PASSMAN & DOBRANICK, 2005; HILL *et al.*, 2009; KNOTHE *et al.*, 2010; PASSMAN, 2013; AZAMBUJA *et al.* 2017; ZIMMER *et al.*, 2018; 2020; BUCKER *et al.*, 2018; BOELTER *et al.*, 2018; CAZAROLLI *et al.*, 2020). O biodiesel é mais biodegradável que o óleo diesel, pois os ácidos graxos oriundos de ésteres metílicos, que compõem o biodiesel, podem ser facilmente reconhecidos e utilizados como fonte de carbono e energia pelos micro-organismos. No entanto, os hidrocarbonetos também podem ser metabolizados por algumas espécies microbianas (ZHANG *et al.*, 1998; PASQUALINO *et al.*, 2006; BÜCKER *et al.*, 2011; WU *et al.* 2016). Como consequência, alguns microrganismos podem, durante a estocagem e na presença de água,

produzir uma biomassa que pode comprometer a qualidade final do produto (sólidos suspensos) e provocar o funcionamento inadequado dos equipamentos e peças, como a saturação prematura de filtros e desgastes no motor, (DAVIDOVA *et al.*, 2012; PASSMAN *et al.*, 2013; BENTO *et al.*, 2016; 2020; DE SIQUEIRA *et al.*, 2017).

As normas brasileiras ABNT NBR 15512-18 e 16732-19 trazem orientações sobre diferentes medidas de controle para prevenir a contaminação microbiana, visando assegurar a integridade do combustível. Entre essas medidas podemos citar os métodos físicos, que incluem procedimentos de limpeza e drenagens regulares que dificultam o acúmulo da água formada no fundo dos tanques, impedindo a multiplicação microbiana. Como medidas de controle químico, indica-se o uso de compostos biocidas, que podem apresentar estruturas químicas diversas em sua composição e são responsáveis por eliminar ou inibir o crescimento microbiano. A utilização de biocidas em combustíveis é regulamentada pela Diretiva de Produtos Biocidas (BDP, Diretiva 98/8/EC) e pela Agência de Proteção Ambiental (EPA), na Europa e nos Estados Unidos da América, respectivamente (PASSMAN, 2013). No Brasil, os biocidas podem ser encontrados na forma pura ou como parte integrante de produtos multifuncionais que combinam diferentes aditivos para proteção da qualidade do combustível armazenado (FONSECA *et al.* 2019; ZIMMER & BENTO, 2020). A seleção de um biocida para uso em combustíveis envolve muitos aspectos, entre eles a definição de seu espectro de ação (eliminação de bactérias e/ou fungos), dosagens, qual

fase tratar (oleosa, aquosa ou interface), eficiência no sistema óleo/água, compatibilidade com o combustível, toxicidade e biodegradabilidade, entre outros (HILL & HILL, 2008; KLINKSPON 2009; SIEGERT, 2009; BENTO *et al.*, 2010; LUZ *et al.* 2018; FONSECA *et al.*, 2019; ZIMMER & BENTO, 2020).

O óleo diesel é considerado um dos produtos obtidos a partir da destilação fracionada do petróleo, correspondendo à fração pesada, com elevado teor de carbono, metais, asfaltenos, pequenas concentrações de enxofre e menor estabilidade em relação à fração mais leve. O óleo diesel é composto de hidrocarbonetos com cadeias carbônicas na faixa de C_{15} - C_{22} , líquido e com ponto de ebulição entre 150° C e 400° C; possui cerca de 40% de alifáticos

e alcanos cíclicos e cerca de 22% de aromáticos (com um ou dois anéis), mais os compostos sulfurados que podem variar entre 0,04 a 6% (v/v) (ABBAD-ANADLOUSSI *et*

A adição de biodiesel confere lubricidade ao óleo diesel, garantindo desempenho e vida útil ao motor

al., 2003; CYPLIK *et al.*, 2011; AL-DEGS & AL-GHOUTI, 2015). No entanto, dependendo da origem do petróleo, o óleo diesel pode ter características distintas com relação à composição da mistura de hidrocarbonetos (BATHS & FATHONI, 1991; MOHD *et al.*, 2018).

No Brasil, o óleo diesel pode ser comercializado como rodoviário ou marítimo, dependendo da sua aplicação. O óleo diesel pode receber a adição determinada de biodiesel, que é caracterizado pela letra B (óleo diesel B) e, em seguida, recebe o valor de sua porcentagem de adição. A adição de biodiesel proporcionou ao óleo diesel uma melhoria no parâmetro lubricidade, e o biodiesel conta com outros aditivos

em sua composição, que melhoram seu desempenho e a vida útil do motor. Os aditivos, normalmente incorporados aos combustíveis (diesel e biodiesel), são antioxidantes, antiespumantes, desemulsificantes, dispersantes e inibidores de corrosão (ANP, 2009; CNT, 2012; SUFLITA *et al.*, 2012; ALLSOPP *et al.*, 2016).

Os combustíveis marítimos são produzidos pela destilação de petróleo cru em refinarias, sendo antes utilizado, normalmente estocado em áreas portuárias. Na indústria naval, o óleo pesado é normalmente utilizado para abastecimento do motor principal, enquanto o óleo diesel marítimo é normalmente utilizado em motores auxiliares (MOHD *et al.*, 2018; CLUME *et al.*, 2019). Para o setor naval, a disponibilidade de combustíveis de baixo enxofre não é considerada o maior problema. Segundo Mohd *et al.*, (2018), o grande desafio será entender o comportamento dos diferentes tipos de combustíveis, como utilizá-los isoladamente ou em combinação com outros. Na literatura, são apresentados cinco tipos, baseados em características das misturas possíveis e viscosidade:

1) óleo marítimo (Marine Gas Oil - MGO) – é idêntico ao óleo diesel automotivo utilizado em veículos terrestres;

2) óleo diesel marítimo (Marine Diesel Oil - MDO) – apresenta uma mistura de óleo combustível pesado e óleo diesel marítimo, com baixa viscosidade e não exige pré-aquecimento antes do uso;

3) óleo combustível intermediário (Intermediate Fuel Oil- IFO) – é similar ao óleo diesel marítimo, sendo uma mistura de óleo residual (HFO com MGO);

4) óleo combustível marítimo (Marine Fuel Oil- MFO) – é similar ao HFO, trata-se de uma mistura com MGO, mas contém menos MGO do que o IFO; e

5) óleo combustível pesado (Heavy Fuel Oil- HFO) – considerado o tipo mais

residual de todos, com alta viscosidade e exigindo um pré-aquecimento antes do uso.

Um combustível é considerado estável quando apresenta a tendência de manter suas propriedades ao longo do tempo. O reconhecimento da formação de lodos e das consequências para as embarcações já é recorrente no setor marítimo (HAGGETT & MOCHAT, 1991). Combustíveis instáveis sofrem modificações químicas em curto período de tempo, provocando problemas operacionais, como a formação de resinas, gomas e vernizes. Combustíveis residuais instáveis, tais como asfaltos e outros aromáticos, compostos polares, podem se aglutinar, formando resíduos que podem se depositar no fundo dos tanques. Estes lodos são caracterizados por serem viscosos e podem provocar o entupimento de filtros separadores e mangueiras. Com isso, os motores marítimos podem ficar sobrecarregados, com problemas de ignição e combustão, além de haver risco permanente de danos aos anéis dos pistons e às linhas dos cilindros. Casos extremos podem provocar danos em motores auxiliares e trazer perigo à embarcação e à tripulação. Neste sentido, é preciso considerar estudos para a previsão da estabilidade química de possíveis misturas de combustíveis (WAYNICK, 2005; HOSHINO, 2007; ATADASHI *et al.*, 2010, MOHD *et al.*, 2018).

Biodiesel e o cenário brasileiro

A tradição brasileira com biocombustíveis começou em 1975, com programas como o Proálcool. No entanto, em 1978, o engenheiro cearense Expedito Parente, conduzindo pesquisas sobre a utilização de ésteres alquílicos de ácidos graxos em motores automotivos, alavancou uma nova fase da matriz energética brasileira. A primeira patente brasileira foi concedida em

1983, ao engenheiro Parente (PI 8007957), pela utilização de diversas matérias-primas (soja, algodão, amendoim, girassol, babaçu, maracujá e até óleo de sardinha) ao produzir biodiesel. Foram conduzidos testes de desenvolvimento de produto, processo, caracterização, ensaios de aplicabilidade em bancada, provas de desempenho e dirigibilidade, com consumo de mais de 300 mil litros de biodiesel e com cerca de 2 milhões de quilômetros percorridos (PARENTE JUNIOR, 2016).

Desde então, surgiram outras iniciativas com óleos vegetais em todo o País, que somaram esforços na tentativa de difundir e popularizar a produção e o uso de um biocombustível sucedâneo ao diesel de petróleo, com a criação do Programa Nacional de Produção de Biodiesel-PNPB, em 2002, por iniciativas governamentais. Em 2017, o governo brasileiro aprovou o RenovaBio (Política Nacional de Biocombustíveis), uma política de Estado, com o reconhecimento do papel estratégico de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira, tanto para a segurança energética quanto para mitigação de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa, protegendo também os interesses do consumidor (RENOVABIO – Lei nº 13.576, 2017).

O biodiesel foi introduzido oficialmente na matriz energética brasileira pela Lei 11.097/2005, aprovada em 13 de janeiro de 2005, que determinou a obrigatoriedade da adição de 2% de biodiesel no diesel de petróleo. A partir de 1º de setembro de 2019, todo o óleo diesel vendido no Brasil deveria ter, no mínimo, 11% de biodiesel, podendo alcançar o percentual máximo de 15%, de acordo com a legislação (ANP, 2019).

Para o óleo diesel marítimo ainda não há porcentagem obrigatória de adição de biodiesel, pois a Resolução nº 52 da ANP, de dezembro de 2010, prevê que

o biocombustível necessita atender às especificações dos motores navais (ANP, 2010), e o ISO 8217.2010 impõe que o óleo diesel marítimo deve ser livre de materiais bioderivados, como óleo vegetal e sebo animal (KALLIGEROS *et al.* 2011). As características do biodiesel que potencialmente afetam a segurança em aplicações marítimas são de extrema importância. Essas preocupações incluem qualidade inconsistente, falta de padrões marítimos e impacto nos componentes do sistema de combustível, como vedações de motor, garantias do fabricante do motor, propriedades hidrofílicas desvantajosas, inconvenientes do fluxo de clima frio e a capacidade de permanecer estável em um ambiente marinho durante um período de tempo (MARAD, 2010). Alguns resultados de estudos (MOHON *et al.*, 2014; YASIN *et al.* 2014) mostram que a utilização de biodiesel é compatível com motores a diesel convencional e também demonstram que as emissões são menores com biodiesel, porém a maioria desses estudos se refere a motores terrestres, enquanto há poucos estudos de aplicação do biodiesel em motores marítimos. O ponto de fulgor do biodiesel é maior que o do diesel de petróleo, tornando-o mais seguro para fins de transporte e armazenamento. Os padrões comuns para medições de ponto de fulgor são ASTM D93 e EN ISO 3697. O ponto de fulgor do biodiesel é maior do que o do diesel de petróleo, que é superior a 150° C.

Histórico da aplicação de biodiesel nos motores marítimos

O uso de biodiesel no setor marítimo começou em 1998, com estudos sobre a viabilidade do biodiesel produzido a partir de óleo de soja em embarcações recreacionais na região dos Grandes Lagos, na América do Norte. Essas foram as primei-

ras embarcações americanas a utilizarem e operarem um combustível alternativo, livre de qualquer produto de petróleo (KOLWZAN & NAREWSKI, 2012). No entanto, oito anos após, o Instituto Marítimo dos Grandes Lagos constatou problemas técnicos associados ao uso de biodiesel nos motores marítimos, pois a ação solvente deste biocombustível é potencialmente degradadora aos componentes elastômeros do motor. Outro estudo com biodiesel de soja foi conduzido em Detroit, em 2003, com a mistura B20, visando causar menor impacto ao motor (ANGUS & JACKSON, 2003). No Canadá, em 2004, o biodiesel passou a ser utilizado por pequenas embarcações, produzido a partir de óleos residuais mais baratos, porém de baixa qualidade. Foi observado um aumento no rendimento da *performance* do motor de 2-3%. Holmseth (2008) em uma experiência de 60 dias conduzida em embarcações utilizando biodiesel puro (B100), criou uma consciência global da necessidade de redução de impactos ambientais com a possibilidade de combustíveis alternativos e renováveis.

No Reino Unido, um estudo foi conduzido com biodiesel (canola) visando à exploração de combustíveis alternativos para a indústria recreacional marítima (ZHOU *et al.*, 2014). O teste foi realizado em iates, com e sem modificações no motor, concluindo-se sobre a necessidade de troca dos filtros e limpeza dos tanques antes da troca do diesel marítimo comum pelo biodiesel. Alguns produtores de motores marítimos estão considerando, em suas pesquisas, testes com biocombustíveis. Segundo Juoperi *et al.* (2007), Wärtsilä foi um dos pioneiros em testar e vem trabalhando no mercado de combustíveis desde 1980. Em 2006, o laboratório Great Lakes Environmental Research Laboratory escolheu o biodiesel de soja para testar em um

dos navios do programa, a fim de reduzir as emissões de gases e monitorar efeitos a longo termo (NOAA, 2007). O programa canadense BioMer teve início em maio e terminou em outubro de 2004. Seus propósitos eram testar o uso de biodiesel puro (B100) como uma alternativa em botes de passeio de vários tamanhos e verificar a viabilidade econômica e os benefícios do uso do biodiesel em operações de rotina (BioMer, 2005).

Desde 1978 ocorre, em escala mundial, o estabelecimento de padrões para os combustíveis marítimos, e essas padronizações permanecem até hoje. A primeira norma de especificação para combustíveis marítimos foi a ISO 8217, publicada em 1987 e sendo atualizada em 2005, trazendo novas mudanças a respeito do conteúdo máximo de água ou do conteúdo máximo de enxofre, entre outros (PEDERSEN, 2015). O teor de enxofre do combustível consumido é o motivo da emissão de SOX e da formação de sulfato resultante de emissões de partículas sólidas. A Marpol é a principal convenção internacional de prevenção da poluição do ambiente marinho que, por motivos operacionais ou acidentais, adotou, em setembro de 1997, o Anexo VI. Este documento prevê a cobertura da poluição do ar, delimitando o limite para as emissões de óxido de enxofre e de óxido de nitrogênio, de navios e também de substâncias que causem danos a camada de ozônio. Em outubro de 2008, foi adicionado ao Anexo VI da Marpol, pela Organização Internacional Marítima, medidas que intensificavam as exigências quanto aos níveis permitidos de enxofre nos combustíveis marítimos, prevendo uma redução progressiva no conteúdo. Em janeiro de 2012, o conteúdo de enxofre foi reduzido de 4,50% a 3,50%. No Anexo VI da Marpol, a Regulamentação 14 diz que, a partir de 1º de janeiro de 2020, o

limite máximo de enxofre é de 0,50% para combustíveis marítimos (IMO, 2019).

O óleo diesel marítimo, que no Brasil recebe as classificações de óleo diesel marítimo A (DMA), é um combustível destilado médio, e o óleo diesel marítimo B (DMB) é um combustível composto de destilados médios, podendo conter pequenas quantidades de óleos oriundos do processo de refino; no entanto, ambos contêm até 5.000 ppm de enxofre (ANP, 2015).

Em relação ao óleo diesel automotivo ou rodoviário, o diesel marítimo pode ser diferenciado por seu ponto de fulgor mais elevado, atendendo às demandas de maior segurança nas embarcações marítimas. Para o óleo diesel marítimo, o ponto de fulgor é a menor temperatura que o óleo diesel vaporiza em quantidade suficiente para formar com o ar uma mistura explosiva, capaz de se inflamar quando incidir uma chama. O valor fixado é de 60° C, enquanto o ponto de fulgor do diesel automotivo está fixado a um valor de 38° C (PETROBRAS, 2013).

Em um estudo realizado por Peixoto *et al.* (2015), foram verificadas que as características físico-químicas do óleo diesel rodoviário e marítimo estão de acordo com as especificações vigentes da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), estabelecidas por meio de metodologias convencionais e da técnica de destilação simulada. A partir desse estudo foram observadas algumas diferenças entre o MDO e o diesel rodoviário, indicando que o MDO apresenta

conteúdo energético maior do que o diesel S500 e S10, podendo possuir cadeias carbônicas mais longas. O óleo diesel marítimo apresentou as temperaturas mais elevadas na destilação, exceto na faixa de 60-80% de recuperado, na qual o S500 teve temperaturas levemente superiores.

Contaminação microbiana em combustíveis navais

A contaminação microbiana em combustíveis navais foi avaliada e reconhecida desde a década de 60, quando ocorreram os primeiros estudos, abordando a presença de

bactérias redutoras de sulfato (grupo microbiano produtor de H₂S) no lodo avaliado (NEIHOF & KLEMME;1969). O levantamento da composição da comunidade microbiana, utilizando a abordagem clássica, foi conduzida por Hettige & Sheridan (1989), com amostras de óleo diesel retiradas do lastro

As condições em tanques de armazenamento de combustíveis navais, especialmente pela presença de água e pelo tamanho dos tanques, influenciam a variabilidade de microorganismos e o seu crescimento

de tanques de estocagem de embarcações. Foram identificadas 31 espécies de fungos filamentosos, cinco isolados de bactérias, entre elas bactérias redutoras de sulfato (produzem H₂S-metábólito corrosivo). Entre as espécies de fungos, as mais frequentes foram *Hormoconis resiniae*, *Penicillium corylophilium* e *Paecilomyces variotti*. Em um estudo de caso isolado em um navio da costa da Califórnia, a contaminação microbiana predominante foi atribuída ao fungo *Cladosporium resiniae* (atual *Hormoconis resiniae*), que, devido à biomassa produzida, causou danos às

turbinas de gás. O estudo analisou que a presença de água gerada pela condensação foi um facilitador para o estabelecimento da comunidade microbiana nos sistemas de combustível naval (HAGGETT & MORCHAT, 1991). As condições em tanques de armazenamento de combustíveis navais, especialmente pela presença de água e pelo tamanho dos tanques, acabam influenciando a variabilidade de micro-organismos e o seu crescimento. A limpeza e a remoção de água diminuem a chance de crescimento microbiano, que também pode ser estimulado por outros fatores, como a composição do combustível e temperatura de armazenagem. O potencial de degradação de duas espécies de micro-organismos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, em diferentes tipos de diesel, inclusive diesel marítimo, foi avaliado por Striebich *et al.*, 2014. Os resultados indicaram que *P. aeruginosa* degradou preferencialmente alcanos (C_{12} - C_{18}), seguidos por n-alcanos de cadeia superior (C_{19} - C_{23}). As cicloparafinas foram consumidas em taxas muito mais baixas, enquanto as aromáticas e isoparafinas não foram consumidas. No entanto, *M. hydrocarbonoclasticus* mostrou um perfil diferente, com degradação preferencial de n-alcanos mais curtos (C_8 - C_{11}) e compostos aromáticos específicos. Ambos os tipos de bactérias eram incapazes de degradar alcanos ramificados.

A primeira investigação, no Brasil, acerca da natureza microbiana dos resíduos (lodos) formados em tanques de estocagem ocorreu em 1966 (GUTHEIL, 1966). Foi isolado e identificado o fungo *Cladosporium resinae* do lodo formado no armazenamento de querosene de aviação. Os problemas com contaminação microbiana em óleo diesel sempre foram crônicos, mas, com a adição de biodiesel,

os problemas aumentaram, principalmente pela falta de informações de como a mistura se comportaria. Porém vários estudos foram conduzidos para demonstrar que o biodiesel exige mais cuidados, na medida em que o aumento nos lodos ou borras em tanques seria esperado. Estudos demonstraram que a adição de biodiesel ao diesel nas proporções de 5% (B5), 7% (B7) e 100% (B100) promoveu maior crescimento microbiano, tornando-se mais suscetível à contaminação e exigindo maior atenção durante o armazenamento (BÜCKER *et al.*, 2011; ZIMMER *et al.*, 2013; GASSEN *et al.*, 2015; SORIANO *et al.*, 2015; BENTO *et al.*, 2016; BOELTER, 2017; CAVALCANTI *et al.*, 2019). O lodo biológico é caracterizado como um consórcio microbiano, com a presença de fungos filamentosos que criam pela emissão de hifas, uma rede capaz de sustentar fisicamente a presença de outros microrganismos, como leveduras e bactérias aeróbias. No interior do lodo (biofilme) podemos encontrar regiões desprovidas de oxigênio (condição de anaerobiose), que possibilitam o desenvolvimento de um grupo importante de bactérias redutoras de sulfato, conhecidas como BRS. As BRS produzem um composto oriundo de seu metabolismo, o ácido sulfídrico (H_2S), potencialmente corrosivo para as paredes dos tanques e tubulações, além de comprometer a qualidade final do combustível (BENTO *et al.*, 2016). A presença de BRS (*Desulfovibrio spp.*) foi observada em lodos biológicos presentes em tanques de óleo diesel no Brasil (LUTTERBACH 1992; BENTO & GAYLARDE, 1986; 2001; SORIANO *et al.*, 2015). Este grupo de anaeróbios é bastante citado em estudos com corrosão microbiana (GAYLARDE *et al.*, 1999; BENTO & GAYLARDE, 2001; TARASOV *et al.*, 2015; ARKAN *et al.*, 2016). Entre os micro-organismos isolados

dos tanques de combustíveis, os fungos filamentosos desenvolvem hifas, que são responsáveis por produzirem biomassa visível, capaz de provocar o entupimento de filtros precoce e outras consequências importantes para a comunidade usuária de combustíveis (BENTO *et al.*, 2016). Os organismos representantes dessa classe, isolados mais frequentemente e considerados deteriorogênicos ao óleo diesel, são *Hormoconis resinae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus penicillioides*, *Fusarium sp.*, *Paecilomyces variotii* e *Penicillium sp.* (GAYLARDE *et al.*, 1999; BENTO & GAYLARDE, 2001; PASSMAN, 2003; SORIANO *et al.*, 2015; BENTO *et al.*, 2016). O propósito deste trabalho foi prospectar espécies que compõem o lodo biológico formado no tanque de uma embarcação e avaliar o comportamento de um dos fungos prospectados (*Exophiala oligosperma*) em diesel marítimo puro e na presença de misturas (B10 e B20) com fases aquosas oriundas de uma condição real (água de lastro de embarcações) e com uma condição ideal (meio mineral).

MATERIAL E MÉTODOS

Prospecção Microbiana

Para a prospecção dos micro-organismos foram utilizadas amostras de óleo diesel marítimo e do lodo formado no tanque de armazenamento. Foi utilizada a Norma ASTM D6974-09 (modificada), que consiste, resumidamente, em filtrar amostras de 500 mL dos combustíveis, em condições assépticas e a vácuo, utilizando membrana filtrante de porosidade 0,22 µm, em triplicata. Após a filtragem, as membranas foram depositadas em meio de cultura apropriados para o crescimento bacteriano e fúngico, sendo as placas incubadas em estufa, a 30° C, durante 48 horas

e 7 dias. Após este período as colônias bacterianas e fúngicas, com morfotipos diferentes foram isoladas em novos meios de cultura, visando a purificação dos isolados. Os combustíveis, após este procedimento (esterilização), foram acondicionados em frascos âmbar, estéreis e mantidos sob refrigeração (4°C). Para identificação ao nível de gênero de fungos filamentosos, foram montados microcultivos dos isolados das amostras de fungos.

A identificação pela técnica de microcultivo permite a observação de estruturas reprodutivas ao microscópio (MOLLA *et al.*, 2002; CAZAROLLI *et al.*, 2013). Para a identificação molecular, foi realizado o sequenciamento Sanger. O DNA utilizado para a identificação foi obtido a partir de amostras da biomassa de cada fungo filamentoso prospectado. A extração de DNA foi realizada por meio do Método CTAB (FERREIRA E 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 à amplificação, por PCR, da região ITS-5.8S- ITS2. Os produtos da reação em cadeia da polimerase foram purificados com o auxílio do Kit Pure-Link™ 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 por meio 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 GenBank (ferramenta *online* disponível em: <http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram depositadas no GenBank.

Combustível utilizado

Foram utilizadas amostras de biodiesel produzido a partir de soja comercial, cedido por uma usina produtora. O óleo diesel marítimo foi coletado diretamente do tanque de uma embarcação no Rio de Janeiro, acondicionado e enviado ao Labbio-RS em galões próprios para o armazenamento de combustível. A mistura de biodiesel (20%) com diesel naval foi preparada no laboratório. O combustível de um dos galões foi separado, com funil de separação, da fase aquosa com o lodo biológico, e esse lodo foi armazenado em frascos na temperatura ambiente.

Esterilização

Os combustíveis e a água de lastro foram esterilizados por filtração em membrana filtrante de acetato de celulose de 0,22 µm, da Millipore, com o auxílio da bomba de vácuo e de um conjunto Kitasato previamente esterilizado, em condições assépticas. Depois foram acondicionados em frascos de vidro âmbar de 1 litro e armazenados em geladeira (4°C) para uso posterior.

Montagem de microcosmos

Para avaliar a capacidade deteriogênica dos micro-organismos, foram montados microcosmos (frascos estéreis de vidro) contendo 5 mL de fase aquosa e 2 mL de fase oleosa. Os experimentos foram classificados quanto à fase oleosa utilizada, óleo diesel marítimo puro ou a mistura com 20% de biodiesel (B20). Quanto

à fase aquosa, foi utilizada a condição denominada ideal com o meio mínimo mineral Bushnell & Haas (1941), pH 7,2, e a condição real, que corresponde à água de lastro pH de 5,9, coletada diretamente do tanque de armazenamento da embarcação. Após a montagem dos microcosmos, foram adicionados os fungos *Paecilomyces dactylethromorphus*, *Curvularia luneta* e *Pseudallescheria boydii* e a levedura *Exophiala oligosperma*.

Outra condição avaliada foi com a inoculação da comunidade microbiana presente no lodo biológico (conforme Norma ASTM E1259-16), oriundo diretamente do tanque de estocagem de óleo diesel marítimo de uma embarcação no Rio de Janeiro. Os experimentos foram identificados quanto à fase oleosa utilizada, óleo diesel marítimo puro ou a mistura com 20% de biodiesel. O experimento foi realizado em triplicata, mantido sob a temperatura de 24°C com repetições destrutivas. Para comparação dos experimentos, foi utilizado um controle (sem adição do inóculo) estéril.

Inóculo

Foi utilizado 150 µL de um inóculo não caracterizado (conforme preconizado na Norma ASTM E1259-16) de um biofilme formado na interface da amostra enviada diretamente de um tanque de estocagem de uma embarcação com óleo diesel marítimo. O isolado fúngico *Exophiala oligosperma* foi selecionado e utilizado, pois obteve a maior biomassa entre os isolados em um estudo preliminar. Culturas com sete dias de cultivo do fungo em ágar batata (BDA) receberam água destilada estéril e 2 mL de um surfactante (Tween 80, preparado na concentração de 0,01%), para facilitar a remoção dos esporos.

A concentração do inóculo fúngico foi determinada pela contagem dos esporos

ros presentes na solução, em Câmara de Neubauer, correspondendo a 10^6 esporos por mL.

Análises microbiológicas

O crescimento microbiano foi avaliado estimando-se gravimetricamente a biomassa produzida nas condições determinadas: MDO-B0 BH BR (Óleo Diesel Marítimo com meio Bushnell Haas como fase aquosa e inoculado com Borra Oleosa), MDO-B20 BH BR (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com meio Bushnell Haas como fase aquosa e inoculado com Borra Oleosa), MDO-B0 AL BR (Óleo Diesel Marítimo com água de lastro como fase aquosa e inoculado com Borra Oleosa), MDO-B20 AL BR (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com água de lastro como fase aquosa e inoculado com Borra Oleosa).

Para o fungo isolado, os tratamentos foram: MDO-B0 BH EX (Óleo Diesel Marítimo com meio Bushnell Haas como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*), MDO-B20 BH EX (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com meio Bushnell Haas como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*), MDO-B0 AL EX (Óleo Diesel Marítimo com água de lastro como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*), MDO-B20 AL EX (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com água de lastro como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*). A biomassa na interface óleo-água em cada tempo foi registrada com fotografias do microcosmo (fase óleo-interface-fase aquosa). A biomassa formada foi coletada nos tempos amostrais de 15, 30 e 45 dias, sendo filtrada em um sistema a vácuo com discos de

papel-filtro previamente pesados (Marca J. Prolab, gramatura 80, espessura 205 μm , porosidade 14 μm).

Após a retenção da biomassa no filtro, foram adicionados 3 mL de hexano para a remoção do excesso de óleo aderido sobre cada disco. Os discos contendo a biomassa foram colocados em estufa a 30°C durante dois dias para secagem e após mantidos durante 24 horas em dessecador. Após esse período, foram pesados em uma balança de precisão (Marca Marte – modelo AL200C). Para o cálculo da biomassa produzida, os valores iniciais foram subtraídos dos pesos finais das membranas.

Análises de pH e de tensão superficial da fase aquosa

Foram realizadas medidas do pH da fase aquosa, visando à detecção da natureza de possíveis metabólitos (ácida e/ou básica), determinada à temperatura ambiente com auxílio de um pHmetro digital (Digimed, modelo DM-22). As medidas da tensão superficial foram determinadas em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini Digital Tensiometer, Milão, Itália), utilizando-se o método da placa de Wilhelmy.

Para a medida, foram utilizados cerca de 10 mL de fase aquosa, após a filtração, na ausência de biomassa. As amostras permaneceram por 30 minutos à temperatura ambiente. Para a calibração do aparelho, foram utilizados como padrões líquidos água destilada (72,0 mN.m-1) e etanol (24,0 mN.m-1).

Degradação da fase oleosa

As amostras da fase combustível dos microcosmos dos tempos iniciais e finais foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de

Fourier acoplada a um acessório de reflectância total atenuada (FT-IR/ATR) no espectrofotômetro Agilent Cary 630 com um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000-900 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 32 scans em temperatura ambiente. Os dados obtidos foram analisados no software Chemostat.

Análise estatística

O tratamento estatístico dos valores de crescimento, pH e tensão superficial (análise de variância; teste de Tukey p 5%) foi realizado com o programa Origin (versão 2018).

RESULTADOS

Prospecção de micro-organismos e identificação

Foram isolados sete fungos a partir das técnicas de prospecção e três bactérias, da amostra de óleo diesel utilizado em uma embarcação e do lodo coletado. Os fungos foram identificados ao nível de gênero por técnicas de microcultivo e confirmados por técnicas moleculares (Tabela 1). Seis

dos sete fungos puderam ser identificados por meio de técnicas moleculares, chegando a nível de gênero ou espécie. Os isolados que obtiveram identificação por meio de técnicas moleculares foram: *Paecilomyces dactylethromorphus*, *Exophiala oligosperma*, *Pseudallescheria boydii*, *Penicillium sp*, *Curvularia lunata* e *Fusarium sp*. Apenas um dos isolados não pôde ser identificado, mas, por meio do microcultivo e da observação, foi identificado como *Paecilomyces sp*.

Aspecto da biomassa formada durante estocagem simulada

Durante os 45 dias de experimento, foi avaliado, a cada 15 dias, o aspecto da biomassa formada na interface óleo-água, com registro fotográfico no tempo inicial do experimento, sem a presença de biomassa (Figura 1). Aos 15 dias de experimento, verificou-se a presença de um biofilme nos tratamentos MDO-B0 BH BR, MDO-B20 BH BR e MDO-B20 BH EX. Os demais tratamentos, que continham água de lastro como fase aquosa e também o tratamento MDO-B0 BH EX, não apresentaram formação de biomassa (Figuras 1 e 2).

Código da Sequência	Identificação do Micro-organismo
LABBIO_MDO1	<i>Pseudallescheria boydii</i>
LABBIO_MDO2	<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i>
LABBIO_MDO3	<i>Penicillium sp</i>
LABBIO_MDO4	<i>Exophiala oligosperma</i>
LABBIO_MDO5	<i>Curvularia lunata</i>
LABBIO_MDO6	<i>Fusarium sp</i>

Tabela 1 – Informações sobre o código de acesso do resultado de sequenciamento genético dos microrganismos identificados no Genbank

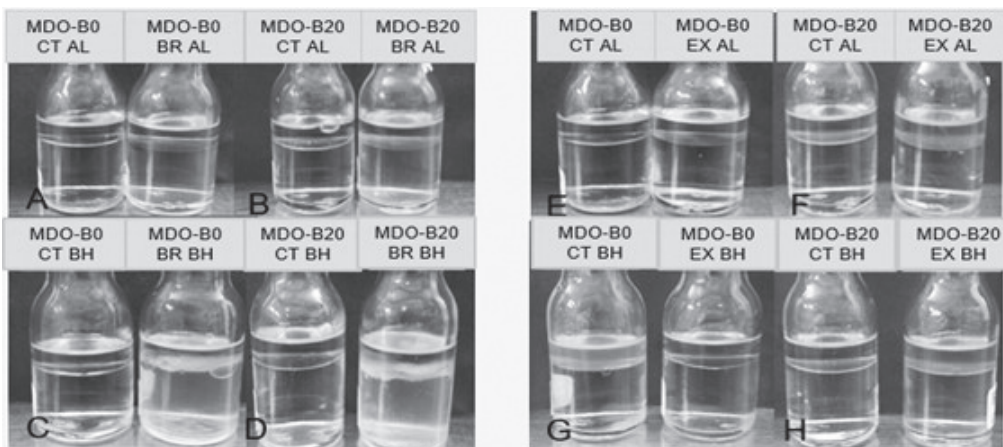


Figura 1 – Aspecto dos microcosmos montados ao tempo zero do experimento.

MDO-B0 AL BR (óleo diesel marítimo com água de lastro como fase aquosa e inoculado com borra oleosa), MDO-B20 AL BR (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com água de lastro como fase aquosa e inoculado com borra oleosa), MDO-B0 BH EX (óleo diesel marítimo com meio Bushnell Haas como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*), MDO-B20 BH EX (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com meio Bushnell Haas como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*), MDO-B0 AL EX (óleo diesel marítimo com água de lastro como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*) e MDO-B20 AL EX (mistura de óleo diesel marítimo contendo 20% de biodiesel com água de lastro como fase aquosa e inoculado com *Exophiala oligosperma*)

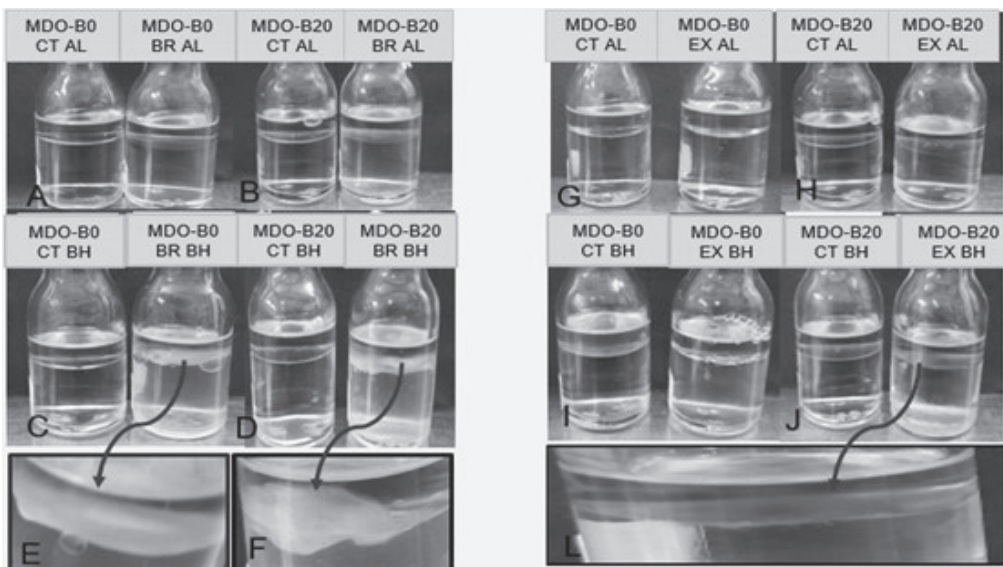


Figura 2 – Aspecto dos microcosmos montados aos 15 dias de experimento. As setas indicam a biomassa que se forma na interface óleo-água

No tempo de 30 dias, todos os tratamentos com meio mínimo mineral Bushnell Haas, como fase aquosa, promoveram o desenvolvimento de um biofilme na interface (Figura 3). A biomassa produzida pelo tratamento

MDO-B20 BH EX apresentou uma coloração mais escura que foi capaz de escurecer o combustível (Figura 4). Para todos os tratamentos, com meio mínimo mineral, foram observadas biomassas mais espessas (Figuras 3 e 4).

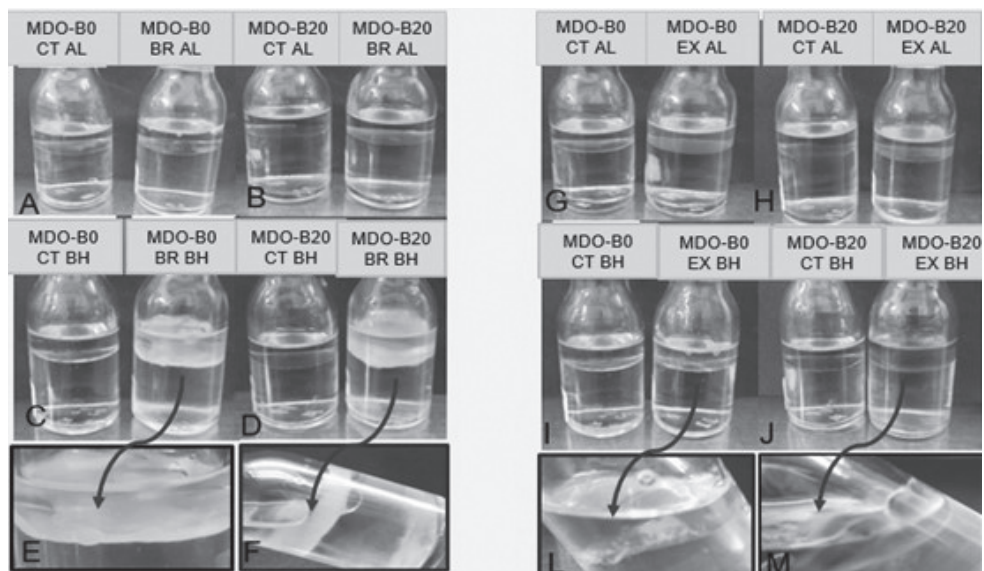


Figura 3 – Aspecto dos microcosmos montados aos 30 dias de experimento. As setas indicam a biomassa que se forma na interface óleo-água

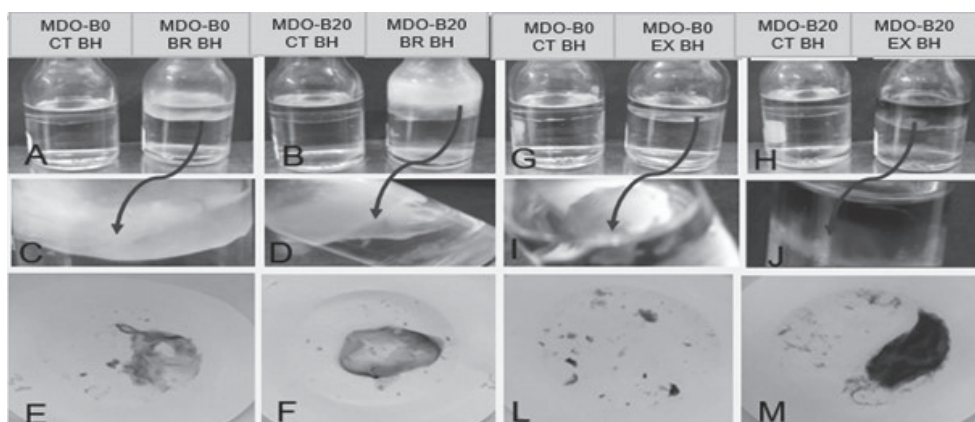


Figura 4 – Microcosmos montados aos 45 dias de experimento. Tratamentos com Bushnell Haas MDO-B0, MDO-B20 e inóculo de lodo biológico e *Exophiala oligosperma*. As setas indicam a biomassa que se formou na interface óleo-água

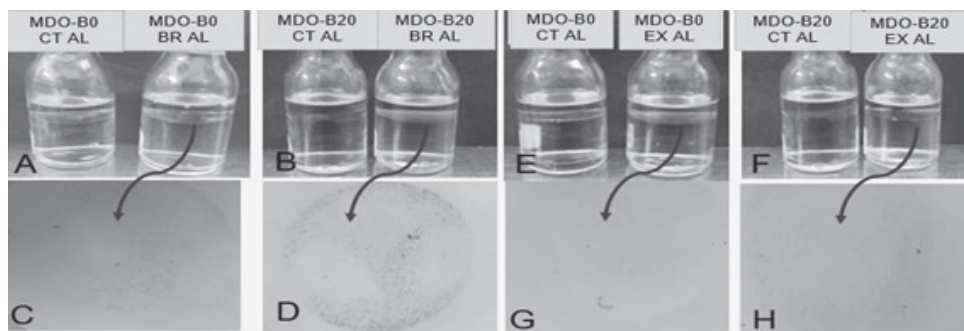


Figura 5 – Microcosmos montados aos 45 dias de experimento. Tratamentos com água de lastro MDO-B0, MDO-B20 e inóculo de lodo biológico e *Exophiala oligosperma* As setas indicam a biomassa que se formou na interface óleo-água

Os tratamentos MDO-B0 BH BR e MDO-B20 BH BR apresentaram biomassa que foram capazes de separar totalmente a fase aquosa da fase oleosa por conta de sua espessura. O tratamento MDO-B20 BH EX mostrou uma biomassa que pode ter produzido pigmentação, uma vez que o óleo escureceu, no entanto isso foi observado apenas em uma das replicatas. A água de lastro como fase aquosa não promoveu o crescimento de biomassa espessa no período de 45 dias em nenhum dos tratamentos, no entanto, para o tratamento MDO B20 BH BR, notou-se a presença de partículas que poderiam indicar o início do crescimento microbiano (Figura 5).

Curva de crescimento

Foram observadas diferenças nos valores de peso seco (mg) na presença de biodiesel e na composição da fase aquosa utilizada entre os micro-organismos avaliados, o inóculo não caracterizado e o fungo *Exophiala oligosperma*. Os valores médios de biomassa (mg) obtidos a cada 15 dias para os tratamentos, com o meio mineral Bushnell Haas e a água coletada no fundo do tanque da embarcação (chamada aqui de água de lastro) como fase aquosa são apresentados na Figura 6.

Observou-se que os tratamentos MDO-B0 BH BR e MDO-B20 BH EX alcançaram os mesmos valores de biomassa no tempo de 15 dias, correspondendo a $7,1 \pm 3,0$ mg e $7,1 \pm 2,4$ mg, respectivamente. O tratamento MDO-B0 BH EX atingiu o menor valor de $2,5 \pm 0,8$ mg neste tempo, enquanto o maior valor ($9,2 \pm 5,7$ mg) de biomassa foi obtido para MDO-B20 BH BR. Aos 30 dias, MDO-B0 BH EX manteve o menor peso ($2,1 \pm 0,3$ mg), seguido por MDO-B0 BR ($7,7 \pm 1,7$ mg); destacam-se os valores obtidos por MDO-B20 BH BR e MDO-B20 BH EX, que foram próximos $11,9 \pm 0,1$ mg e $11,4 \pm 2,6$ mg. Os tratamentos MDO-B0 e MDO-B20 inoculados com *Exophiala* diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) quando comparados. No tempo final, os valores das biomassa foram de $7,5 \pm 0,6$ mg, para MDO-B0 BH EX (valor mais baixo); $12,4 \pm 0,9$ mg, para MDO-B0 BH BR; $17,2 \pm 3,4$ mg, para MDO-B20 BH BR. Foram observadas diferenças estatísticas entre o tratamento MDO-B0 BH BR e o tratamento MDO-B20 BH BR aos 45 dias. O tratamento que obteve o maior valor, $23,2 \pm 4,6$ mg, de biomassa no tempo final foi MDO-B20 BH EX. Os valores de MDO-B0 e MDO-B20 *Exophiala* mostraram diferenças estatisticamente significativas aos 28 dias.

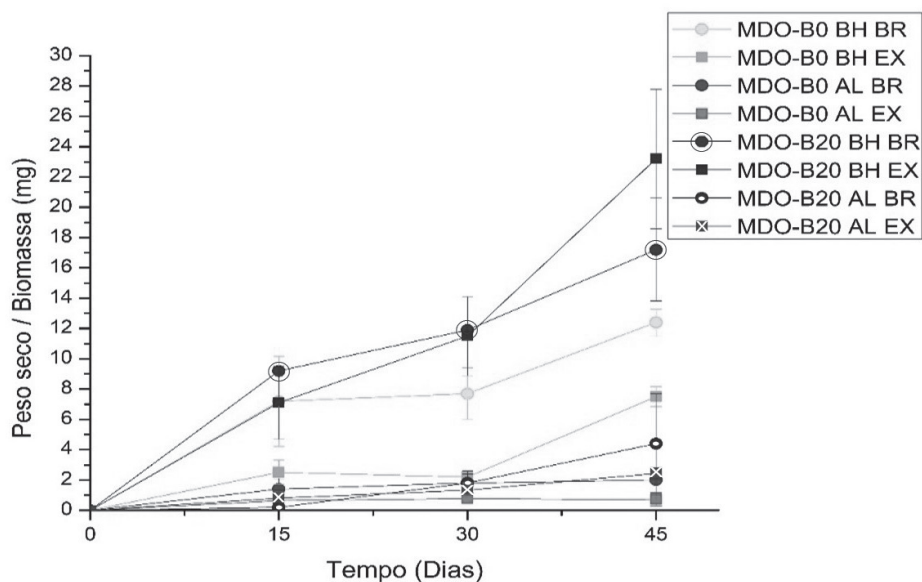


Figura 6 – Medidas dos valores de biomassa (mg) obtidas nos tempos amostrais 15, 30 e 45 dias para os tratamentos com Bushnell Haas e água de lastro

Os valores obtidos para as biomassas formadas nos tratamentos que tinham água de lastro como fase aquosa foram menores, conforme o esperado, pois trata-se de uma condição com baixo aporte de nutrientes minerais, quando comparado com o meio mineral BH. Aos 15 dias, foram obtidos valores de $1,3 \pm 0,7$ mg para MDO-B0 AL BR, sendo o maior valor obtido (Figura 6). O tratamento MDO-B20 AL BR $0,2 \pm 0,2$ mg foi o menor valor, sendo $0,8 \pm 0,5$ mg para MDO-B0 AL EX e $0,6$ mg, para MDO-B20 AL EX. Após 15 dias, que totalizavam 30 dias de experimento, novamente foram observados os valores biomassa. O tratamento MDO-B0 AL EX exibiu o menor valor ($0,7 \pm 0,0$ mg) de biomassa, seguido de MDO-B20 AL EX, que alcançou $1,3 \pm 0,2$ mg. Os tratamentos MDO-B0 AL BR e MDO-B20 AL BR obtiveram valores próximos, $1,6 \pm 0,8$ e $1,8 \pm 0,6$ mg, respectivamente. O tempo

final de 45 dias revelou que o tratamento MDO-B20 AL BR obteve o maior valor de biomassa, $4,4 \pm 3,2$ mg. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para as amostras com água de lastro como fase aquosa nos tempos amostrais.

A análise estatística mostrou diferenças estatisticamente significativas entre todos os tratamentos com meio mineral (BH) como fase aquosa e seus respectivos tratamentos com água de lastro, nos mesmos tempos amostrais. O menor valor encontrado para a água de lastro foi de $0,2 \pm 0,2$ mg para MDO-B20 AL BR, no tempo de 15 dias, e o maior valor $4,4 \pm 3,2$ mg para MDO-B20 AL BR, no tempo 45 dias, embora não tenha sido observado um grande volume de biomassa. Para a condição ideal (meio mínimo mineral), o menor valor de biomassa registrado foi $2,1 \pm 0,3$ mg para MDO-B0 BH EX, no

tempo de 15 dias; e o maior 23,2±4,6mg, para o tratamento MDO-B0 BH EX.

Análises de pH e tensão superficial da fase aquosa

A natureza dos metabólitos produzidos foi avaliada por meio das medidas de pH das fases aquosas nos tempos 0, 30 e 45 dias. A avaliação comparativa foi conduzida com as medidas dos tratamentos com inóculo não caracterizado ou *Exophiala oligosperma* e os respectivos controles. Foram observadas variações no pH (Tabela 2) da fase aquosa dos tratamentos em relação à condição inicial do experimento, para o meio mínimo mineral Bushnell Haas. Embora a redução observada tenha sido de 7,2 (tempo inicial) para 6,6±0,3 (MDO-B20 BH BR no tempo 45 dias) e 6,4±0,2 (MDO-B20 BH EX no tempo de 30 dias), não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2). Na condição com água de lastro, observou-se redução nos valores de

pH quando comparados ao inicial de 5,9 aos 30 e 45 dias e comparados com seus controles e com diferenças estatísticas.

As medidas de tensão superficial foram realizadas para detectar a produção de surfactantes pelos micro-organismos e liberados na fase aquosa. Houve redução nos valores das medidas de tensão superficial quando observado o tempo inicial tanto nos tratamentos com inóculo quanto no controle. É possível verificar ainda que a redução é observada em maiores valores para os tratamentos que contêm biodiesel em sua porção oleosa. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para todos os tratamentos em comparação com o tempo inicial e também para MDO-B20 BH BR e MDO-B0 BH BR (Tabela 3). Para o tratamento com água de lastro como fase aquosa, também foram verificadas reduções nas medidas de tensões superficial em comparação com o tempo inicial, com significância estatística; no entanto não foram observadas entre os tratamentos com inóculo e controle aos 45 dias (Tabela 3).

Tratamentos			Tratamentos		
Meio BH	30 dias	45 dias	Água de lastro	30 dias	45 dias
T0: 7,2			T0: 5,9		
MDO-B0 BH CT	7,0±0,0	6,8±0,4	MDO-B0 AL CT	5,8±0,0	5,9±0,4
MDO-B20 BH CT	6,8±0,0	6,8±0,1	MDO-B20 AL CT	5,5±0,0	5,9±0,1
MDO-B0 BH BR	7,1±0,0	7±0,1	MDO-B0 AL BR	5,7±0,0	5,7±0,0
MDO-B20 BH BR	7,0±0,2	6,6±0,3	MDO-B20 AL BR	5,3±0,0 ¹	5,6±0,0
MDO-B0 BH EX	6,9±0,0	6,9±0,0	MDO-B0 AL CL	5,5±0,0	5,9±0,0
MDO-B20 BH EX	6,4±0,2	6,8±0,1	MDO-B20 AL CL	5,2±0,2 ²	5,9±0,0

Tabela 2 – Valores de pH para os tratamentos com fase aquosa constituída de meio Bushnell Haas e água de lastro no tempo inicial, 30 dias e tempo final

1 Diferiu significativamente quando comparado ao seu controle negativo no mesmo tempo de tratamento.

2 Idem.

Tratamento Meio BH Tempo inicial: 61±0,0 mN-m-1	Tensão superficial após 45 dias	Tratamento Água de lastro Tempo inicial: 59±0,0 mN-m-1	Tensão superficial após 45 dias
MDO-B0 BH CT	46,3±0,7 ³	MDO-B0 AL CT	40,4±0,6
MDO-B20 BH CT	35,7±1,9	MDO-B20 AL CT	35,7±0,1
MDO-B0 BH BR	47±1,8 ⁴	MDO-B0 AL BR	41,7±3,1
MDO-B20 BH BR	37,1±0,6	MDO-B20 AL BR	37,2±6,2
MDO-B0 BH EX	45,3±2,7	MDO-B0 AL CL	40,5±2,9
MDO-B20 BH EX	41,5±4,2	MDO-B20 AL CL	36,7±1,1

Tabela 3 – Valores das medidas de tensão superficial para os tratamentos com fase aquosa constituída de meio Bushnell Haas e água de lastro nos tempos iniciais e finais (45 dias)

Análise da fase oleosa no infravermelho – Degradação do biodiesel

Para a avaliação dos resultados dos tratamentos que continham as blendas de 20% de biodiesel, foi selecionada a região de 1800-900 cm^{-1} na avaliação das análises quimiométricas. Os dados, então, foram suavizados para remover o efeito de ruído e normalizados e foi aplicada a primeira derivada para que as diferenças entre amostras fossem evidenciadas. Por meio de uma Análise Hierárquica de Agrupamentos (*Hierarchical Cluster Analysis* – HCA) (Figura 7), pode-se observar a tendência para a formação de dois grandes grupos, sendo um deles formado por amostras contendo água de

lastro, enquanto outro grupo é formado exclusivamente por amostras com o meio Bushnell Haas (BH). No gráfico de escores da Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis – PCA), observa-se que as duas primeiras componentes principais (PCs) explicam 61% da variação dos dados (Figura 8). Na PC1, amostras contendo meio BH com inóculo de fungo isolado e borra oleosa se encontram na parte negativa, enquanto que amostras controle e aquelas que possuem água de lastro apresentam-se na parte positiva. No gráfico de pesos (*loadings*) da PC1, observa-se que a maior contribuição para esta distribuição se dá na região entre 1800-1650 cm^{-1} , onde estão presentes os estiramentos C=O presentes nos ésteres, característicos do biodiesel.

3 Todos os valores diferiram significativamente do valor inicial.

4 Assim como MDO-B20 BH BR 37.1±0.6, diferiu significativamente do tratamento quando comparado com óleo diesel marítimo puro e blenda.

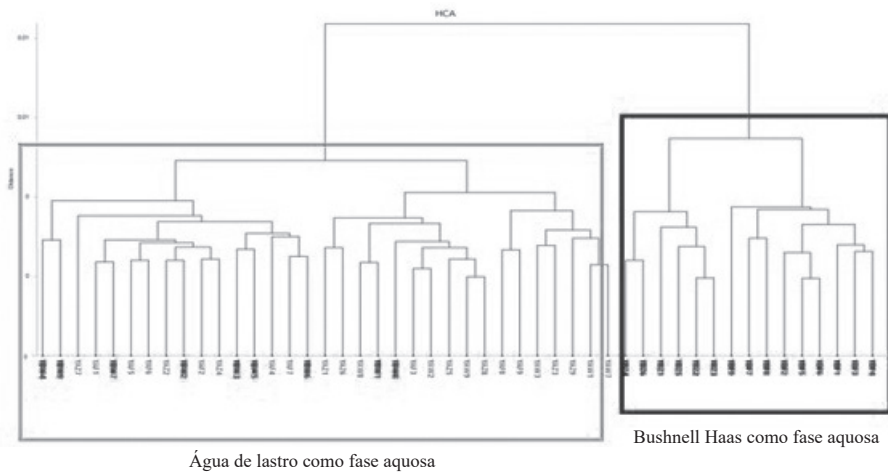


Figura 7 – Dendrograma obtido a partir dos dados de infravermelho das amostras de MDO-B20 no tempo final do experimento 45 dias. Em destaque, a separação dos grupos

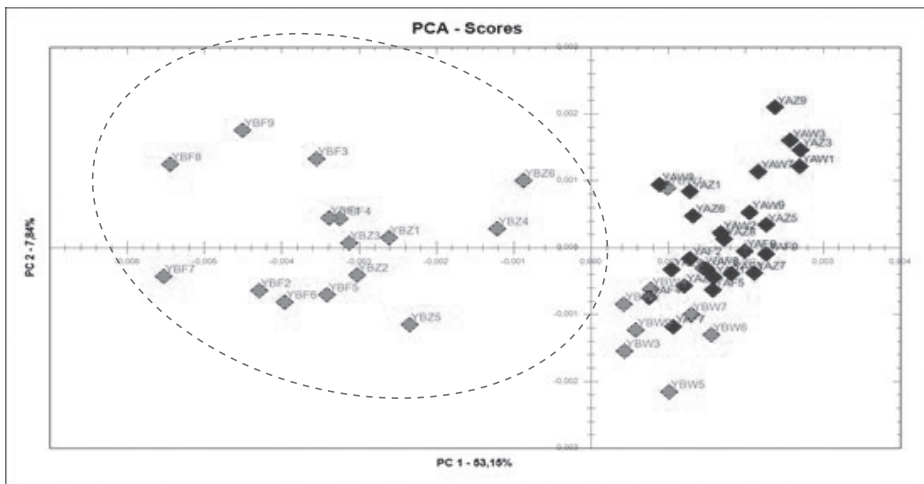


Figura 8 – Escores de PCA obtidos por meio dos dados de infravermelho das amostras de MDO-B20 no tempo final do experimento 45 dias
 Amostras com Bushnell Haas como fase aquosa – cinza; Amostras com água de lastro como fase aquosa – preto. Em destaque, as amostras que sofreram degradação

CONCLUSÃO

Foi possível realizar o isolamento e a caracterização de espécies microbianas presentes no lodo encontrado no fundo de uma embarcação com óleo diesel ma-

rítimo. Foram caracterizados os seguintes fungos filamentosos: *Paecilomyces dactylethromorphus*, *Exophiala oligosperma*, *Pseudallescheria boydii*, *Penicillium sp*, *Curvularia lunata* e *Fusarium sp*. O desenvolvimento microbiano em condi-

ções com o meio mínimo mineral (aporte nutricional) e com a água livre (condição real) como fase aquosa foi distinto. Com a presença da mistura com 20% de biodiesel, foram observados maiores valores de biomassa (peso seco) do que o tratamento com óleo diesel marítimo puro. Foi observado que o fungo *Exophiala oligosperma* isoladamente obteve maiores valores de biomassa (peso seco) quando comparado com o inóculo do lodo biológico, na condição com 20% de biodiesel quando comparado com óleo diesel marítimo. Os valores das medidas de pH e da tensão superficial não apresentaram reduções significativas

A adição de biodiesel em diesel marítimo exigirá cuidados e implementação de rotinas rígidas na manutenção do combustível estocado

durante o crescimento microbiano. Os resultados de FTIR mostraram degradação da fração biodiesel apenas para a condição em que a fase aquosa foi o meio mineral Bushnell Haas, devido ao aporte de nutrientes minerais.

A presença de biodiesel pode ter sido responsável pelos maiores valores de biomassa observados na mistura B20 quando comparado com a condição de diesel naval puro. Essa constatação alerta a comunidade

usuária, como o ocorrido para o óleo diesel rodoviário, de que a adição de biodiesel em diesel marítimo exigirá cuidados e implementação de rotinas rígidas na manutenção do combustível estocado.

📁 CLASSIFICAÇÃO PARA ÍNDICE REMISSIVO:
<ECONOMIA>; Indústria do Petróleo; Óleo Combustível; Recursos do Mar;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Devido à extensão da lista de Referências Bibliográficas (cerca de 14 páginas), os interessados em obtê-la devem entrar em contato com a Professora Doutora Fátima Menezes Bento, pelo *e-mail* fatima.bento@ufrgs.br.