

# BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS E BIOSSURFACTANTE ISOLADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO DE DIESEL E BIODIESEL

Naiara Aguiar Santestevan<sup>1</sup>; Francielle Bucker<sup>2</sup>; Cristiane Barbosa<sup>3</sup>; Fatima Menezes Bento<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas da UFRGS, Bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; [naiara.santestevan@gmail.com](mailto:naiara.santestevan@gmail.com); <sup>2</sup>Mestre pelo PPGMAA-UFRGS; Pesquisadora do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; [franbucker@gmail.com](mailto:franbucker@gmail.com); <sup>3</sup>Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; [crisbbarbosa@gmail.com](mailto:crisbbarbosa@gmail.com); <sup>4</sup>Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; [fatimabento@yahoo.com](mailto:fatimabento@yahoo.com)

**Resumo** – Durante o armazenamento, o combustível está sujeito a bioteterioração por microrganismos. A biodegradação do combustível envolve enzimas e subprodutos que apresentam uma alternativa para a obtenção de moléculas orgânicas com potencial de uso na indústria e na recuperação de ambientes através da estratégia de bioprospecção. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial de produção de enzimas, de biossurfactantes, e a capacidade degradadora de óleo diesel por bactérias isoladas durante o armazenamento simulado de combustível. Bactérias isoladas no primeiro e aos 30 dias de armazenamento simulado de amostras de diesel (B0), biodiesel (B100) e misturas contendo 95% de diesel e 5% de biodiesel (B5) ou 80% de diesel e 20% de biodiesel (B20), foram submetidas a testes em placa quanto à produção de lipase, esterase e biossurfactante. A capacidade dos isolados em utilizar o óleo diesel como única fonte de carbono foi avaliada através do teste de degradação de hidrocarbonetos e também pelo crescimento em placa contendo óleo diesel em sua composição. Das 26 bactérias isoladas, 10 cresceram em meio seletivo para o gênero *Pseudomonas*. Quanto à atividade enzimática, 38% apresentaram atividade lipídica e 42% atividade esterásica. A produção de biossurfactante foi detectada em 2 isolados do gênero *Pseudomonas*. A capacidade em degradar hidrocarbonetos foi observada em 13 isolados; e a capacidade de crescer em meio contendo óleo diesel foi demonstrada por 19 isolados. Foi possível detectar a produção de enzimas lipase e esterase, a produção de biossurfactantes e a capacidade em degradar diesel por alguns dos isolados.

**Palavras-chave:** diesel; biodiesel; bactérias; enzimas; biossurfactante.

## Introdução

Durante o armazenamento, o combustível está sujeito à contaminação por impurezas, à degradação microbiológica, oxidativa e, conseqüentemente à formação de borra (ANP). A contaminação microbiana, na presença de água, leva ao desenvolvimento de microrganismos que utilizam o diesel e o biodiesel como fonte de carbono e energia. A biodegradação do combustível envolve enzimas e subprodutos que podem apresentar potencial de uso na indústria e em processos de recuperação de ambientes contaminados, como a biorremediação. Neste sentido, a bioprospecção é uma estratégia extremamente útil para a obtenção de moléculas orgânicas com alto potencial de aplicação nestes setores.

O objetivo do estudo foi avaliar o potencial de produção de enzimas lipases e esterases, e de biossurfactantes por bactérias isoladas durante o armazenamento simulado de

diesel e biodiesel. Além disso, investigar a capacidade destes microorganismos em degradar óleo diesel.

## **Materiais e Métodos**

As bactérias foram isoladas durante o armazenamento simulado de diesel (B0), mistura de 95% de diesel e 5% de biodiesel (B5), mistura de 80% de diesel e 20% de biodiesel (B20), e de biodiesel (B100), em tanques de aço-carbono, com capacidade para um litro. As coletas das amostras foram realizadas no primeiro e aos 30 dias de armazenamento. O isolamento baseou-se na morfologia colonial. Assim, aquelas que apresentavam diferenças visuais em uma mesma placa, para os diferentes tempos e tratamentos, foram isoladas.

A produção de lipase foi determinada pelo método de hidrólise de triacilglicerol na presença de Rodamina B (Shelley *et al.*, 1987). A produção de esterase foi determinada pelo meio de cultura descrito por Sierra (1957). A produção de biossurfactantes foi determinada de acordo com Bodour & Maier (2002). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para selecionar ramnolípidios, biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, mas pode ser utilizada para selecionar qualquer biossurfactante aniônico de baixo peso molecular.

A capacidade dos isolados bacterianos em utilizar o óleo diesel como única fonte de carbono foi testada. Utilizou-se o teste de degradação de hidrocarbonetos (óleo diesel), descrito por Bradock *et al.* (1999); e, também, os isolados foram crescidos em placas contendo Meio Mínimo Mineral (Richard & Vogel, 1999), ágar e óleo diesel.

## **Resultados e Discussão**

A partir do armazenamento simulado de combustível B0, B5, B20 e B100 isolou-se 26 bactérias, morfologicamente distintas. No primeiro dia de avaliação isolou-se três bactérias do tratamento B0; 2 do tratamento B5; 5 do tratamento B20; e, 1 do tratamento B100. Aos 30 dias de armazenamento isolou-se 3 bactérias do tratamento B0; 4 do tratamento B5; 3 do tratamento B20; e, 4 do tratamento B100.

Avaliou-se a produção de enzimas lipase e esterase pelo fato de serem enzimas que são responsáveis pela degradação inicial dos ésteres de ácidos graxos, presentes no biodiesel, assim, verificou-se que 38% dos isolados apresentou atividade enzimática lipolítica, sendo que nenhum destes foi isolado no primeiro dia de armazenamento (T0). A atividade enzimática para esterase foi detectada em 11 (42%) dos 26 isolados.

A produção de biossurfactantes pode ser uma característica de bactérias que tem a capacidade de se desenvolver utilizando substratos como petróleo ou derivados, como o diesel (Desai&Banat, 1997). São compostos que aumentam a disponibilidade do hidrocarboneto ao microorganismo (Nitche & Pastore, 2002). Assim, verificou-se duas bactérias produtoras de biossurfactante, do tipo ramnolípideo, isoladas do tratamento B0 (apenas diesel).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. são encontradas em sistemas de armazenamento de combustíveis (Bento *et al.*, 2001). A partir do meio seletivo para o gênero *Pseudomonas*, denominado cetrimide, verificou-se que 38% das bactérias isoladas pertencem ao gênero. Além disso, a presença deste gênero foi observada somente aos 30 dias de armazenamento, sugerindo uma provável sucessão microbiana nesse sistema.

Embora diversos microrganismos sejam isolados de tanques de armazenamento, nem todos possuem a capacidade em biodegradar o combustível, uma vez que os contaminantes biológicos estão presentes no ambiente. Desta maneira, é necessário testar a habilidade dos isolados em utilizar o hidrocarboneto, como fonte de carbono energia. Neste sentido, verificou-se que no teste sugerido por Bradock *et al.* (1999), 5 dos 11 isolados no primeiro dia de armazenamento degradaram o óleo diesel; e, aos 30 dias, 8 dos 15 isolados. Nas placas

contendo meio mínimo mineral, óleo diesel como fonte de carbono e ágar, todos os isolados do primeiro dia de armazenamento demonstraram crescimento. Em relação aos isolados do tempo 30 dias, 8 dos 15 isolados apresentaram crescimento em placa.

### **Conclusões**

Foi possível detectar a produção de biossurfactantes por alguns isolados, bem como a produção de enzimas lipase e esterase.

### **Apoio**

CNPQ, FINEP e Ipiranga.

### **Referências**

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico – 2007**. Disponível em: <[http://www.anp.gov.br/conheca/anuario\\_2007.asp](http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2007.asp)>. Acesso em: 06 jan. 2009.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.
- BRADDOCK, J. F., CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.3, p.81-84, 1999.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.
- SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C. & MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiology Methods**, v. 6, p. 123-137, 1987.