

# **CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

# EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DE AMBIENTES FRIOS

**BATISTA, Eliziane**

Estudante do Curso de Biotecnologia /ILACVN -UNILA

e-mail: [eliziane.batista@aluno.unila.edu.br](mailto:eliziane.batista@aluno.unila.edu.br)

**PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano**

Docente do curso de Biotecnologia /ILACVN - UNILA

e-mail: [michel.passarini@unila.edu.br](mailto:michel.passarini@unila.edu.br)

## 1 Introdução

A utilização e desperdício dos recursos fósseis em processos industriais e rotineiros, vêm cada vez mais, acarretando em um grande impacto ambiental. Como medida de minimizar esses problemas, cresce o interesse na busca por fontes energéticas mais sustentáveis. Os micro-organismos têm tido um papel fundamental em vários processos tecnológicos, com o avanço da biotecnologia e a especialização da microbiologia industrial, estão se tornando alvos de estudos para a descoberta de diversos compostos utilizados na indústria. Micro-organismos psicofílicos possuem características metabólicas únicas que garantem sua sobrevivência em regiões extremas, como o continente Antártico. Bactérias psicofílicas apresentam potencial na produção de hidrocarbonetos, que possibilita uma nova fonte sustentável para a produção de biocombustível. O presente trabalho objetivou a extração de hidrocarbonetos a partir de bactérias isoladas de amostras marinhas do continente Antártico bem como a avaliação morfológica destas linhagens bacterianas e avaliação do peso seco.

## 2 Metodologia

### 2.1 Extração dos lipídeos em solução

No total, seis linhagens bacterianas previamente selecionadas em um teste inicial para a produção de hidrocarbonetos foram utilizadas no estudo. As células foram cultivadas em frascos de 50 mL, contendo 20 mL do meio 3 (2 mg L<sup>-1</sup> de EDTA·2Na; 2,8 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,75 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,24 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 2,1 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,04 mg L<sup>-1</sup> de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,75 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,2 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,025 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl; 0,025 mg L<sup>-1</sup> de biotina; 0,025 mg L<sup>-1</sup> de nicotina; 0,025 mg L<sup>-1</sup> de ácido p-amino benzóico; 0,01 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,64 g L<sup>-1</sup> de ácido acético; 1,92 g L<sup>-1</sup>

ácido propiônico; 1,32 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio; 0,2 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 2,7 g L<sup>-1</sup> de ácido succínico, 1,87 g L<sup>-1</sup> de ácido málico e 30 g de NaCl L<sup>-1</sup>; (pH 7,0 com KOH), incubados à 5 °C, em duplicata. Após 7 dias, as culturas foram coletadas e os lipídios totais foram extraídos de acordo com metodologia descrita por Bligh & Dyer (1959, p.911), modificada. Em um funil de separação, para cada 1 mL de meio fermentativo, foram adicionados 3,75 mL de clorofórmio/metanol (1:2) v/v. As amostras foram agitadas no funil vigorosamente. Em seguida foi adicionado 1,25 mL de clorofórmio e submeteu-se a agitação. Adicionou-se 1,25 mL de água, seguida de uma nova agitação vigorosa. A fase orgânica (de baixo) foi recuperada e submetida a evaporação em capela de exaustão. O resíduo seco foi resuspenso em 500 µL de metanol. As amostras foram encaminhadas para a Divisão de Química Orgânica do CPQBA/Unicamp para identificação dos hidrocarbonetos extraídos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS).

## **2.2 Caracterização morfológica dos isolados**

As análises macro e microscópicas foram realizadas com as 6 linhagens bacterianas. As bactérias foram cultivadas em meio de cultivo R2A, incubadas a uma temperatura de 5 °C durante 7 dias. As cores das colônias e as taxas de crescimento foram avaliadas com o auxílio de um estereoscópio. A caracterização morfológica dos isolados foi realizada pela técnica de coloração de Gram.

## **2.3 Análise do peso seco**

Foram utilizadas as duplicatas das amostras em meio líquido. Assim, 10 mL do meio foram transferidos para tubos eppendorff de 2 mL, previamente seco e pesado. Os tubos foram submetidos à centrifugação de 10.000 rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada. O líquido sobrenadante foi descartado e os tubos foram submetidos a secagem à 70 °C em estufa de secagem. Os tubos com as células bacterianas (sem umidade) foram pesados e a diferença do peso dos tubos antes da centrifugação e após a centrifugação foram calculados.

## **3 Fundamentação teórica**

Ambientes frios são frequentemente colonizados por micro-organismos, entre eles bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os micro-organismos representam as mais abundantes formas de vida adaptadas ao frio na Terra em nível de diversidade de espécie e biomassa. A temperatura pode influenciar fortemente no desenvolvimento de uma dada espécie de organismo sendo que, novos gêneros e espécies de micro-organismos psicrófilos

vêm sendo descobertos a partir de diferentes habitats gelados (Margesin & Miteva, 2011, p.341).

Os micro-organismos adaptados ao frio oferecem o potencial para produção de compostos que podem ser utilizados na síntese de biocombustíveis a partir de recursos renováveis. A produção de biocombustível nos dias atuais, vem ganhando destaque devido a problemas globais nos setores energético e ambiental, sendo um composto alternativo para a substituição de outros combustíveis derivados do petróleo (Atsumi et al., 2008, p.87). Um dos elementos chaves para que os micro-organismos se adaptem às condições extremas dos ambientes polares está relacionado com a capacidade de superar os efeitos negativos das baixas temperaturas através de processos evolutivos o que pode ser realizado, utilizam uma combinação de alterações na composição dos ácidos graxos para regular a fluidez da membrana em baixas temperaturas. O grau de insaturação dos ácidos graxos dos lipídios de membrana desempenha um papel importante na rigidez das mesmas em baixas temperaturas (Canganella & Wiegel, 2011, p.254).

Atualmente, a capacidade de adaptação microbiana às mais diversas condições ambientais tem despertado o interesse na busca por enzimas e outras moléculas estáveis em faixas de temperaturas muito elevadas ou muito baixas. Os compostos que vem se destacando principalmente na utilização como biocombustível renovável e sustentável, são os hidrocarbonetos derivados de ácidos graxos (Ladygina et al., 2006, p.1005). Desta forma, no presente trabalho, foi possível encontrar os resultados referentes a extração dos hidrocarbonetos, caracterização morfológica e avaliação do peso seco para seis linhagens bacterianas recuperadas da Antártica.

## **4 Resultados**

### **4.1 Extração dos lipídeos em solução**

A extração de hidrocarbonetos para as 6 linhagens bacterianas foi realizada com sucesso pois, o protocolo utilizado no estudo extrai os lipídeos totais das amostras. Estudos anteriores realizados no CPQBA/Unicamp, avaliaram o rendimento da extração de hidrocarbonetos em outros isolados bacterianos da Antártica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), o qual confirmaram a presença de hidrocarbonetos.

### **4.2 Caracterização morfológica dos isolados**

Com relação a caracterização macro e microscópica, as seis bactérias (código de isolamento: 370, 385, 408, 554, 559 e 599), foram identificadas como bacilos gram-positivos.

### **4.3 Análise do peso seco**

A massa seca de cada amostra foi identificada e foi possível observar um crescimento microbiano relativamente padrão entre as linhagens, apresentando um percentual de crescimento celular entre 0,195 a 0,202 g/10 mL.

### **5 Conclusão**

A metodologia empregada no trabalho foi realizada com sucesso pois foi possível a realização da extração dos hidrocarbonetos das linhagens estudadas bem como a identificação morfológicas das linhagens bem como avaliar o peso seco dos isolados. Amostras derivadas de ambientes extremos podem ser consideradas fontes promissoras na busca por compostos de interesse industrial, como os hidrocarbonetos, os quais podem ser utilizados como biocombustíveis.

### **6 Principais referências bibliográficas**

Atsumi, S.; Hanai, T.; Liao, J.C. *Nature*. v.451: 86-90, 2008.

Bligh, E.G.; Dyer, W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.* v. 37:911-917, 1959.

Canganella, F.; Wiegel, J. *Naturwissenschaften*. v 98:253-279, 2011.

Ladygina, N.; Dedyukhina, E.G.; Vainshtein, M.B. *Process Biochemistry*. v.41: 1001-1014, 2006.

Margesin, R.; Miteva, V. *Research in Microbiology*. v 1623: 346-361, 2011.