

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRIAGEM DE HIDROCARBONETOS EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DA ANTÁRTIDA

GARCIA, Paulo Eduardo

Estudante do Curso de Biotecnologia- ILACVN – UNILA;

E-mail: paulo.garcia@aluno.unila.edu.br;

PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano

Docente/pesquisador do curso Biotecnologia – ILACVN – UNILA.

E-mail: michel.passarini@unila.edu.br.

1 Introdução

Vive-se um momento em que se faz necessário o aumento da produção energética no globo. Este quadro leva à exploração dos recursos naturais. Diante disso, buscam-se fontes renováveis de energia. Uma dessas alternativas são os chamados micro-organismos psicofílicos. Estes apresentam características singulares, sendo capazes de sobreviver às baixas temperaturas de biomas como o continente Antártico. Existem estudos que procuram obter células microbianas com o intuito de sintetizar hidrocarbonetos ou outros compostos que derivam de hidrocarbonetos no propósito de utilizá-los como biocombustíveis. Esta opção apresentaria uma possibilidade de produção de combustíveis tidos como ecologicamente corretos, uma substituição aos combustíveis derivados do petróleo – fato que torna essas fontes de energia a partir de sistemas microbianos alternativas emergentes. O presente trabalho utilizou micro-organismos psicofílicos ou psicotolerantes isolados de amostras do continente Antártico com o objetivo de realizar a prospecção de hidrocarbonetos com potencial de utilização em processos de produção de biocombustíveis.

2 Metodologia

Os isolados foram cultivados em meio de cultura de acordo com método proposto por Park et al. (2001, p.449, modificado) que observou produção de n-alcanos a partir de uma linhagem de *Vibrio furnissii* quando o meio de cultura da mesma foi suplementado com biopolímeros, açúcares ou ácidos orgânicos. Em um primeiro momento, os isolados foram inoculados em meio sólido disposto em placas de Petri contendo: 2 mg de EDTA.2Na; 2,8 mg de H₃BO₃; 0,75 mg de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,24 mg de ZnSO₄.7H₂O; 0,2 mg de MnSO₄.4H₂O; 0,04 mg de Cu(NO₃)₂.2H₂O; 0,15 mg de CaCl₂.2H₂O; 0,2 mg de MgSO₄.7H₂O; 0,025 mg de tiamina-HCl; 0,025 mg de biotina; 0,025 mg de nicotina; 0,025 mg de ácido p-amino benzóico; 0,01 g de FeSO₄.7H₂O; 1,64 g de ácido acético; 1,92 g ácido propionico; 1,84 g de glicerol; 3,60 g de glicose; 1,32 g de sulfato de amônio; 0,2 g de extrato de levedura; 17 g de ágar; quantidades por litro de água do mar esterilizada (pH 7,0 com KOH). Após crescimento, os isolados foram transferidos para um segundo meio de cultura sólido cuja composição consiste na mesma que a do primeiro meio de cultivo, com adição de 5,40 g L⁻¹ de ácido succínico em substituição ao glicerol e glicose, e adição de 30 g de NaCl L⁻¹ em substituição da água do mar esterilizada. Os isolados que apresentam crescimento neste segundo meio foram transferidos para um terceiro, desta vez líquido, disposto em tubos de ensaio contendo cerca de 60 mL do meio de cultivo. A composição deste foi a mesma do segundo meio, com adição de 2,7 g L⁻¹ de ácido succínico e 1,87 g L⁻¹ de ácido málico. Todos os meios foram incubados a 5 °C por 20 a 30 dias sem agitação. Consideram-se como potenciais produtores de hidrocarboneto os isolados que apresentaram a produção de uma camada lipídica na superfície do meio de cultura.

3 Fundamentação teórica

Nos últimos anos se tornou evidente o aumento de estudos de bioprospecção e descoberta de novas *taxa* em ambientes como oceanos, solos e regiões extremas, uma vez que estas pesquisas representam grande interesse industrial (Passarini et al., 2013, p.195). Além disso, a literatura apresenta trabalhos que relatam linhagens microbianas sendo utilizadas em estudos que objetivam a produção e caracterização de hidrocarbonetos com potencial utilização como biocombustíveis.

Organismos encontrados em ambientes como o Antártico apresentam adaptação a condições extremas, como baixas temperaturas (entre -20 °C a -60 °C), hipersalinidade das águas, disponibilidade de nutrientes no solo *permafrost* e condições de luminosidade nessa regiões de alta latitude (Pascale et al, 2012, p.16). Tais características fazem do ambiente

Antártico um habitat promissor no que se refere à recuperação de micro-organismos com capacidades metabólicas únicas.

Uma vez que esses micro-organismos estão adaptados a ambientes permanentemente frios, especula-se que os mesmos apresentem características moleculares adaptadas à essas condições, representando, desta forma, potencial para prospecção de novos compostos metabólicos, genes e enzimas ainda não estudados sob estas condições adversas. Os micro-organismos adaptados ao frio oferecem também o potencial para produção de compostos que podem ser utilizados na síntese de biocombustíveis a partir de recursos renováveis (Atsumi et al., 2008, p.87).

A temperatura é o fator que mais influencia o desenvolvimento microbiano, devido à função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Os micro-organismos se adaptaram às condições extremas dos ambientes polares ao desenvolverem capacidade de superar os efeitos negativos das baixas temperaturas através de processos evolutivos de uma série de adaptações funcionais e estruturais – como produção de proteínas anticoagulantes, modulação da cinética de enzimas específicas, assim como o desenvolvimento de membranas mais fluídas (e isso se dá pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia insaturada).

Através de uma combinação de alterações na composição dos ácidos graxos, organismos adaptados ao frio regulam 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. Esta adaptação a condições extremas tem levado pesquisadores a buscar enzimas e outras moléculas estáveis em faixas de temperaturas muito elevadas ou muito baixas. Hidrocarbonetos derivados de ácidos graxos são compostos que vêm se destacando principalmente na utilização como biocombustível renovável e sustentável.

4 Resultados

Os testes iniciaram-se com a inoculação de 138 bactérias no primeiro meio de cultivo (sólido, disposto em placas de Petri). Destas, observou-se o crescimento de 130 bactérias que foram inoculadas no segundo meio de cultivo (também sólido). Destas, inocularam-se 110 bactérias no terceiro meio de cultivo (líquido, disposto em tubos de ensaio). A triagem seria considerada positiva se fosse possível a visualização da produção de uma camada lipídica na superfície do meio de cultivo. Entretanto, esta camada lipídica não foi observada em nenhum meio de cultivo. Logo, não houve produção suficiente desta porção lipídica para ser detectada pelo método utilizado. Os isolados serão submetidos a uma nova triagem para produção de

hidrocarbonetos, utilizando uma metodologia colorimétrica de acordo com Fujii et al. (1985, p.652), modificado.

A caracterização morfológica microscópica foi realizada para os isolados bacterianos distintos de acordo com a coloração e morfologia macroscópica das colônias. Assim, foi possível identificar (dentre os 20 isolados macroscopicamente distintos), 14 e 6 linhagens gram-positivas e gram-negativas, respectivamente.

5 Conclusões

Após realização da triagem preliminar utilizando os três meios de cultivo diferentes, não foi observada a produção de uma camada lipídica no terceiro meio de cultura. Deste modo, considera-se que nenhum isolado apresentou potencial na produção de hidrocarbonetos. Entretanto, podemos dizer que a metodologia empregada pode ser realizada com sucesso, tendo em vista o resultado positivo encontrado para 18 linhagens bacterianas isoladas das mesmas amostras do continente Antártico. Trabalho realizado no CPQBA/Unicamp. Assim, bactérias de ambientes frios podem ser consideradas fontes promissoras de moléculas de interesse industrial.

6 Principais referências bibliográficas

Atsumi, S.; Hanai, T.; Liao, J.C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*. v.451: 86-90, 2008.

Fujii, T.; Ogawa, T.; Fukuda, H. A Screening System for Microbes which Produce Olefin Hydrocarbons, *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 49: 651-657, 1985.

Park, M.O.; Tanabe, M.; Hirata, K.; Miyamoto, K. Isolation and characterization of a bacterium that produces hydrocarbons extracellularly which are equivalent to light oil. *Appl Microbiol Biotechnol* v. 56:448-452, 2001.

Pascale, D.; Santi, C.; Fu, J.; Landfald, B. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Marine Genomics*. v. 8: 15-22, 2012.

Passarini, M.R.Z.P.; Santos, C.; Lima, N.; Berlinck, R.G.S.; Sette, L.D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drarmacidon reticulatum*. *Archives of Microbiology*, v 195:99-111, 2013.