

Naiara Aguiar Santestevan¹; Daniel Derrossi Meyer²; Francielle Bucker³; Fátima Menezes Bento⁴

Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, POA, RS.

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas da UFRGS, Bolsista de Iniciação Científica (naiarasantestevan@gmail.com); ²Aluno de Mestrado do PPGMAA da UFRGS (d_biomeyer@yahoo.com.br); ³Mestre pelo PPGMAA da UFRGS, Pesquisadora da UFRGS (franbucker@gmail.com); ⁴Professora Adjunta III do Departamento de Microbiologia da UFRGS (fatimabento@yahoo.com);

Introdução

O uso de combustíveis derivados de fontes renováveis de energia, como o biodiesel, tem sido amplamente estimulado em muitos países. Além de diversificar a matriz energética, o uso de biodiesel apresenta algumas vantagens sobre os combustíveis derivados do petróleo, pois apresenta alto potencial de biodegradabilidade e baixa toxicidade, devido à presença de cadeias de ácidos graxos e à ausência de hidrocarbonetos aromáticos e de enxofre na composição [2, 4, 5]. No Brasil, o uso da mistura de 5% de biodiesel ao óleo diesel é obrigatório desde 2009 e com a perspectiva de aumentar. No entanto, segundo um histórico de acidentes relacionados ao transporte terrestre de cargas perigosas no estado do Rio Grande do Sul, 25% dos acidentes registrados pela FEPAM no período de 1994 a maio/2010 estavam relacionados com o derrame de combustíveis (Figura 1). A biorremediação é uma forma de descontaminar os ambientes impactados, utilizando a competência fisiológica de micro-organismos (nativos ou introduzidos), na degradação de contaminantes, sendo uma alternativa de baixo custo e ambientalmente aceitável. Nesse sentido, estudos que avaliem a possibilidade de recuperação de solos contaminados por misturas de diesel/biodiesel são fundamentais para a tomada de medidas mitigatórias.

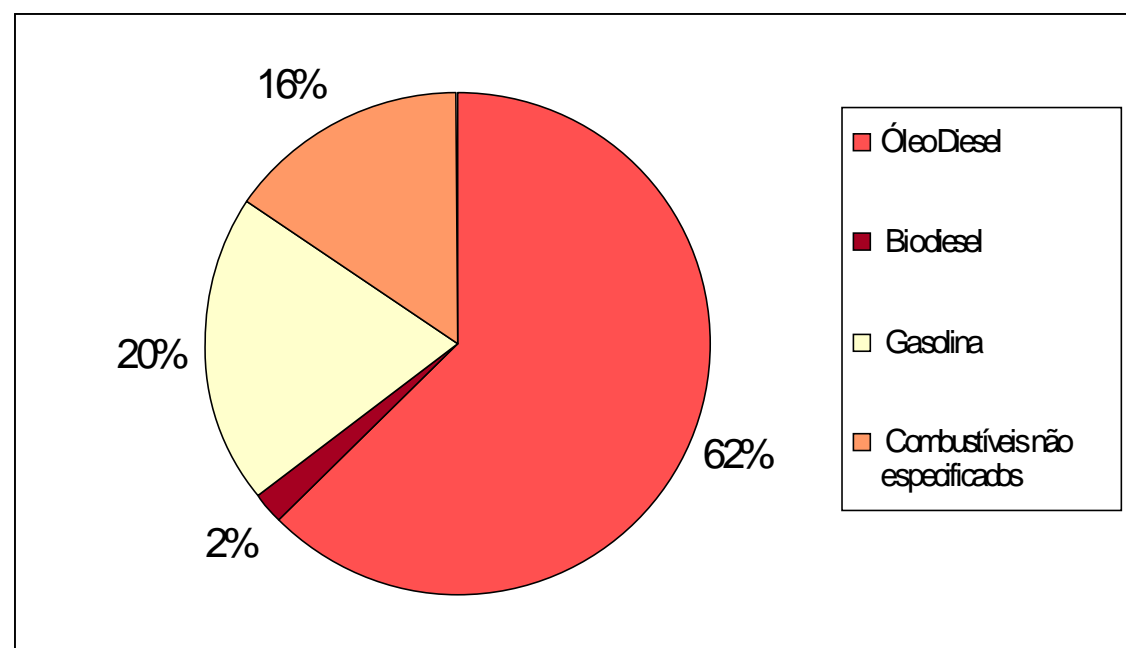


Figura 1 Relação de acidentes ao transportar combustíveis derivados do petróleo/biodiesel. Fonte: FEPAM/2010.

Objetivo

Selecionar um consórcio bacteriano com potencial degradador de misturas de diesel/biodiesel B20 (20% de biodiesel e 80% de diesel), a partir da determinação da atividade enzimática e da produção de biosurfactantes, a fim de utilizá-lo como estratégia na biorremediação, simulando um derrame desses combustíveis em dois solos (arenoso e argiloso).

Metodologia

A partir de locais com histórico de contaminação por hidrocarbonetos/ésteres foram isoladas 24 bactérias.

Destas, 10 apresentaram potencial em degradar o combustível após serem submetidas a ensaios com indicadores-redox 2,3,5-dicloro de trifeniltetrazolium (TTC) e 2,6-diclorofenil indolil (DOPIP).

Estas foram inoculadas (10^8 UFC/mL) em meio líquido (MMI) [6] com 1% de combustível – 20% de biodiesel no diesel (B20) – sob agitação (180rpm) a 28°C durante 14 dias.

O crescimento celular foi avaliado pela quantificação de proteínas totais pelo método Bradford (1976). A avaliação da fase aquosa incluiu medidas de tensão superficial (mN/m), índice de emulsificação (%) e soratório da atividade enzimática relativa ($U \cdot mg^{-1}$ de proteína nos tempos 1, 7 e 14 dias) de dioxygenases (catecol 1,2, catecol 2,3 e protocatecol 3,4), alcano hidroxilase, lipase e esterase para B20. Tratam-se de enzimas responsáveis pela degradação de compostos alifáticos, aromáticos e de ésteres. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e pela análise da variância (ANOVA).

Resultados e Discussão

O crescimento das bactérias durante 14 dias é mostrado em proteínas totais (Figura 2). Observou-se para os isolados A, D e Q os menores valores de tensão superficial do meio aquoso (Figura 3), sugerindo a produção de biosurfactantes. Por outro lado, embora tenham sido encontrados resultados promissores na produção de biosurfactantes de alto peso molecular por meio do índice de emulsificação (IE 24) para 4 bactérias (A, S, 3 e 11), apenas o isolado A foi escolhido para o consórcio.

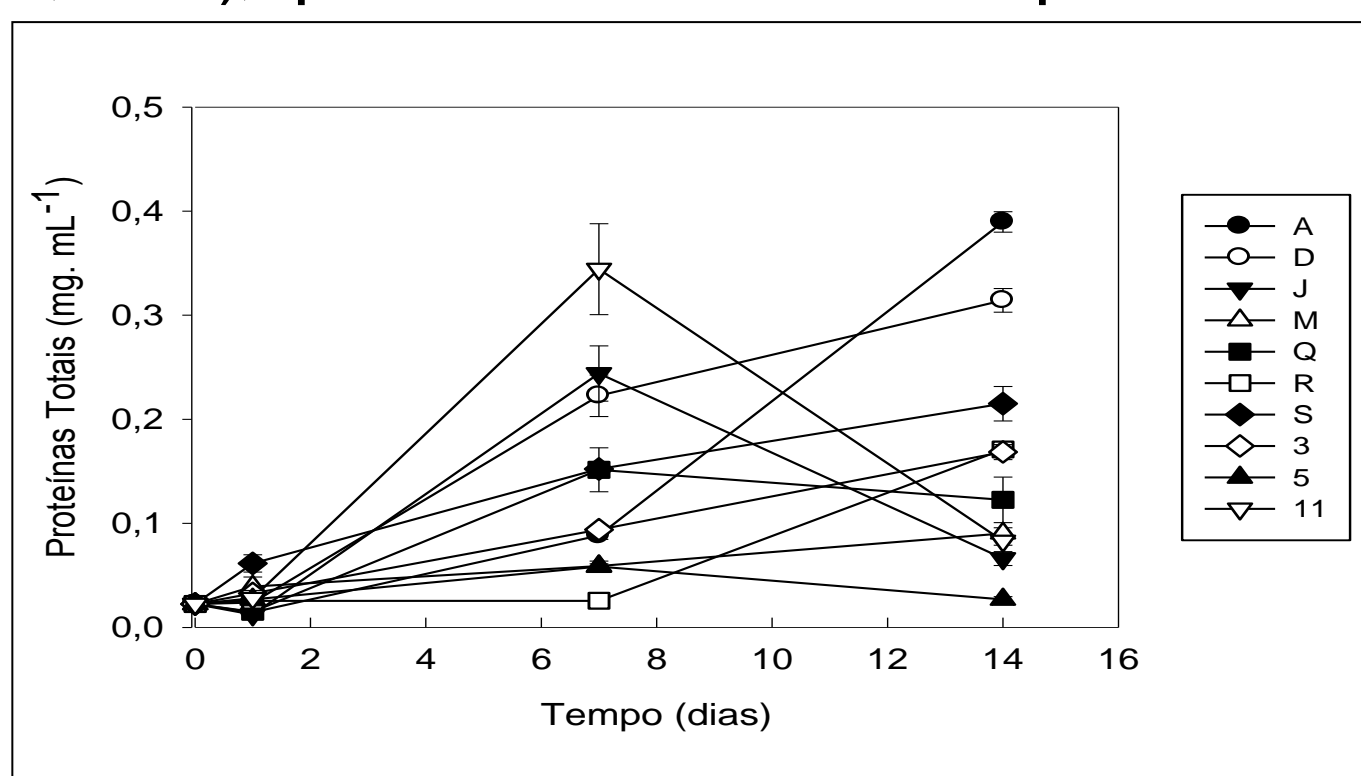


Figura 2 Avaliação da produção de proteínas totais de 10 isolados por 14 dias.

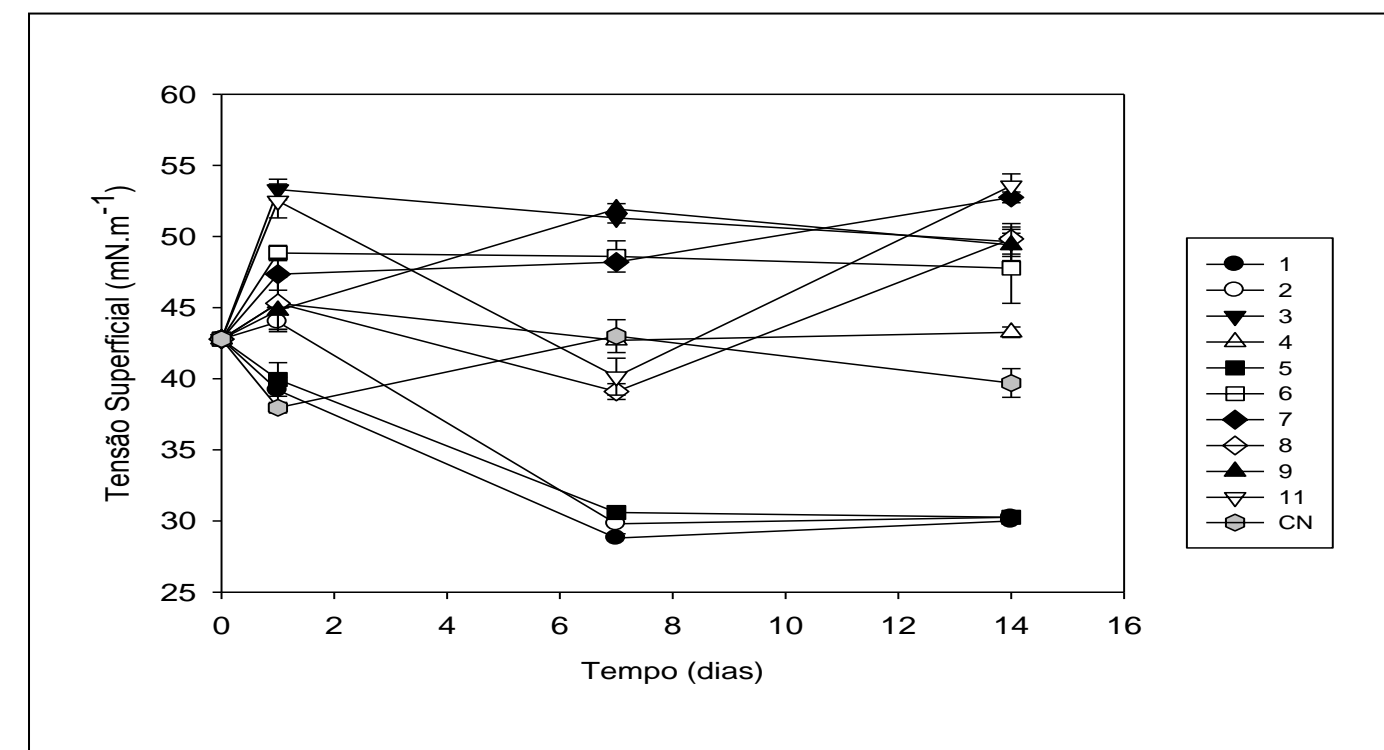


Figura 3 Medidas de tensão superficial de 10 isolados bacterianos + controle negativo (CN) durante 14 dias.

Ao comparar os resultados para a atividade enzimática, observou-se maior produção da alcano hidroxilase em relação às outras 3 dioxygenases. Os alcanos, comparados a compostos aromáticos, não só estão em maior abundância na fração diesel, mas também são reconhecidamente mais fáceis de serem degradados por micro-organismos [1] (Figuras 4-7).

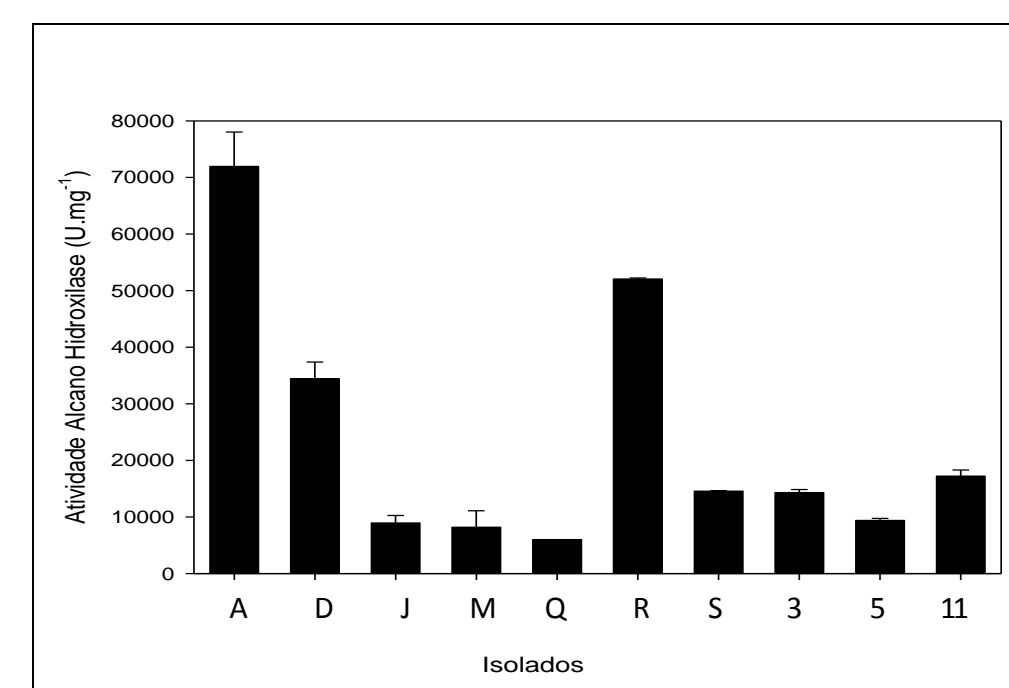


Figura 4 Soratório da atividade específica de alcano hidroxilase para 10 isolados.

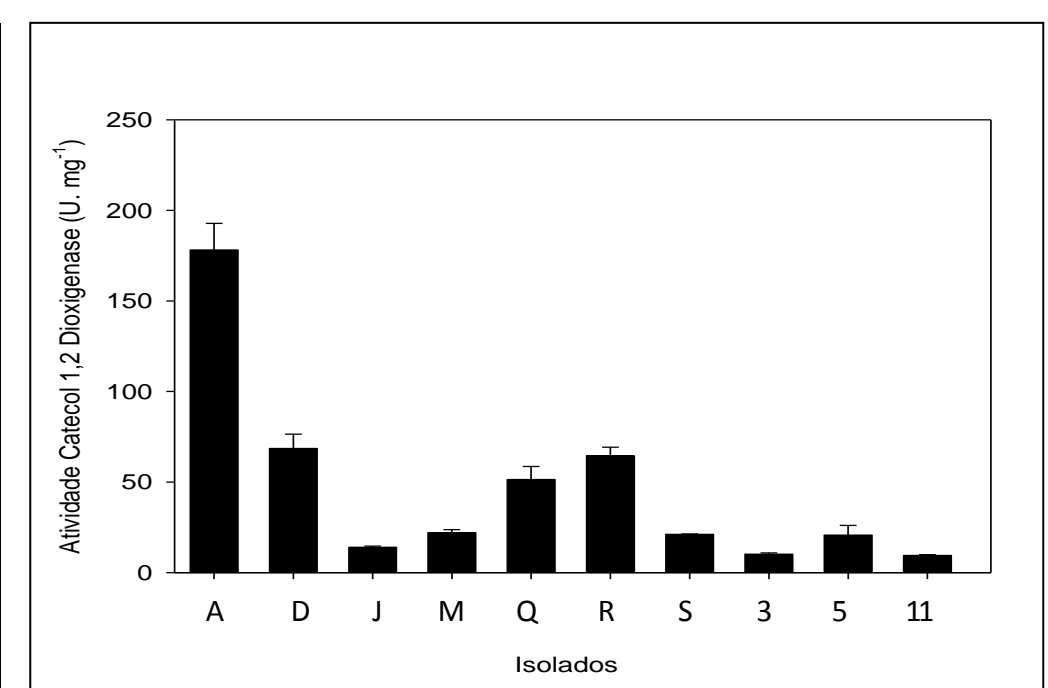


Figura 5 Soratório da atividade específica de catecol 1,2 dioxygenase para 10 isolados.

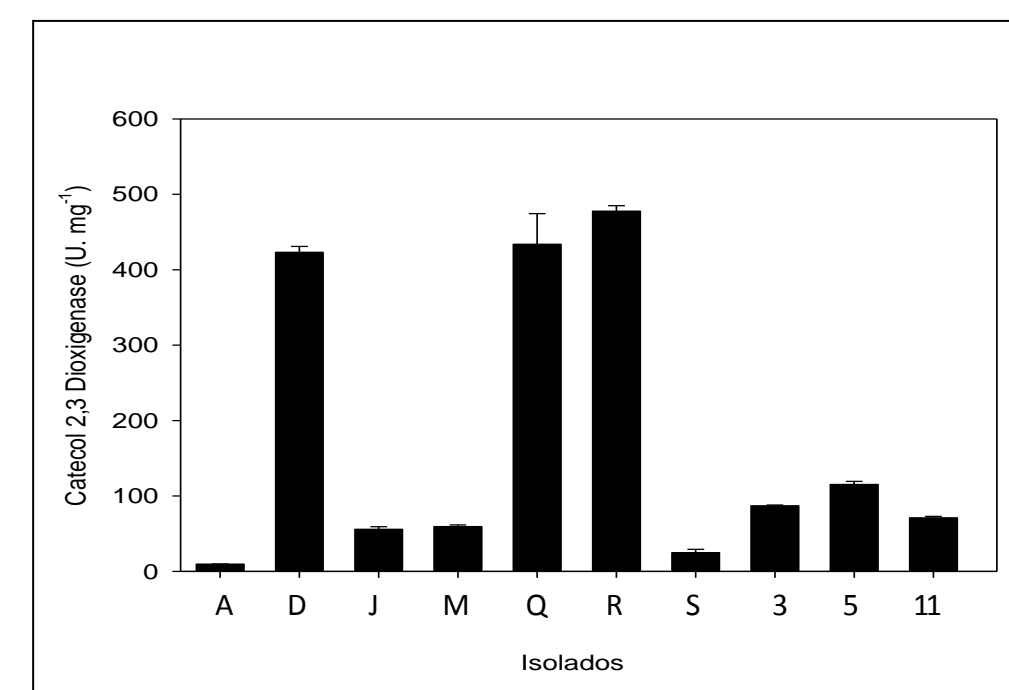


Figura 6 Soratório da atividade específica de catecol 2,3 dioxygenase para 10 isolados.

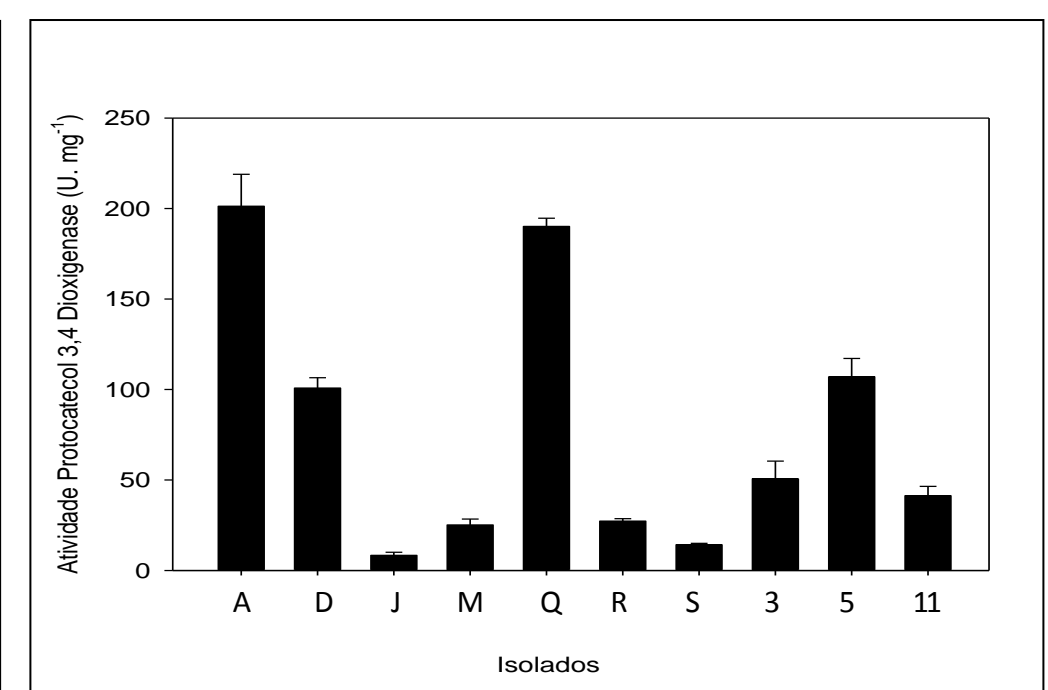


Figura 7 Soratório da atividade específica de protocatecol 3,4 dioxygenase para 10 isolados.

Na degradação de ésteres de ácidos graxos da fração biodiesel da mistura, estão envolvidas as enzimas esterases e lipases. No monitoramento da hidrólise de pNP-acetato, o isolado D (Figura 8) foi o maior produtor de esterases. Quanto à expressão de lipase, foram obtidos níveis mais representativos para os isolados A, D e 5 (Figura 9).

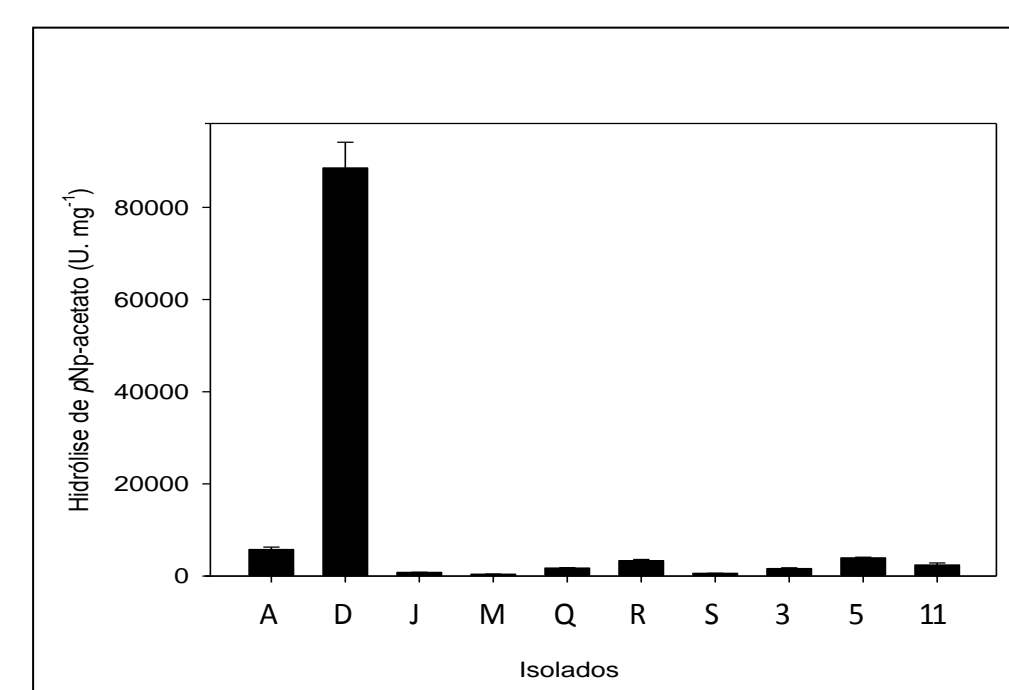


Figura 8 Soratório da atividade específica de esterases pela hidrólise do pNPA para 10 isolados.

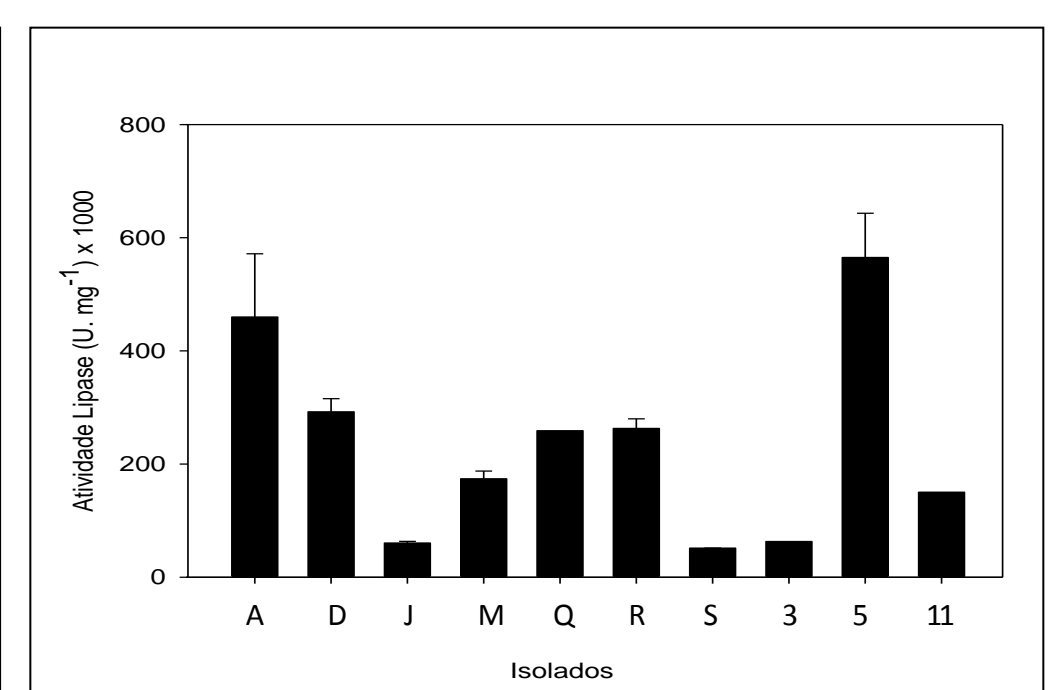


Figura 9 Soratório da atividade específica de lipase para 10 isolados.

Conclusões

Foi possível selecionar micro-organismos potencialmente degradadores de B20 através da atividade enzimática e da produção de biosurfactantes. Os isolados bacterianos A, D e Q constituirão um consórcio bacteriano que será utilizado na biorremediação de misturas de diesel/biodiesel em dois tipos de solos, simulando um derramamento superficial desses combustíveis.

Referências Bibliográficas

- [1] Atlas, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiological Reviews, p. 180-209, 1981.
- [2] BENTO, F.; VISCARDI, L. C.; DARCY, R.; MENEZES, A. G.; GAYLARDE, C. C.; CAMARGO, F. A. O. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. Revista Biodiesel, Abril, n.4, p. 24-26, 2006.
- [3] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976.
- [4] DeVELLO, J. A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; NELSON, R. K.; AREY, J. S.; REDDY, C. M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. Mar. Pollut. Bull., v.54, p.894-904, 2007.
- [5] LERMONTOV, S. A.; USHAKOVA, L. L. Transesterification and esterification with subcritical methanol. Synthesis of biodiesel. Russian Chemical Bulletin, International Edition, v.56, n.1, p.105-107, 2008.
- [6] RICHARD, J. Y. & VOGL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. Intern. Biodeterioration & Biodegradation, v.44, p.93-100, 1999.