

Naiara Aguiar Santestevan<sup>1</sup>; Francielle Bucker<sup>2</sup>; Fátima Menezes Bento<sup>3</sup>

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

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas da UFRGS, Bolsista de Iniciação Científica (naiara.santestevan@gmail.com); <sup>2</sup>Mestre pelo PPGVAA da UFRGS, Doutoranda da UFRGS (franbucker@gmail.com); <sup>3</sup> Professora Adjunta III do Departamento de Microbiologia da UFRGS (fatimabento@ehco.com);

## Introdução

A contaminação de combustíveis por microrganismos, como o diesel e o biodiesel, tem sido uma preocupação recorrente e objeto de estudos. Com a introdução de biocombustíveis observou-se maior suscetibilidade à biodegradação quando comparados ao combustível fóssil [1,4]. Entre os problemas relacionados à contaminação pode-se citar a formação de borra, o entupimento de filtros e injetores e o comprometimento da qualidade final do produto [2,7].

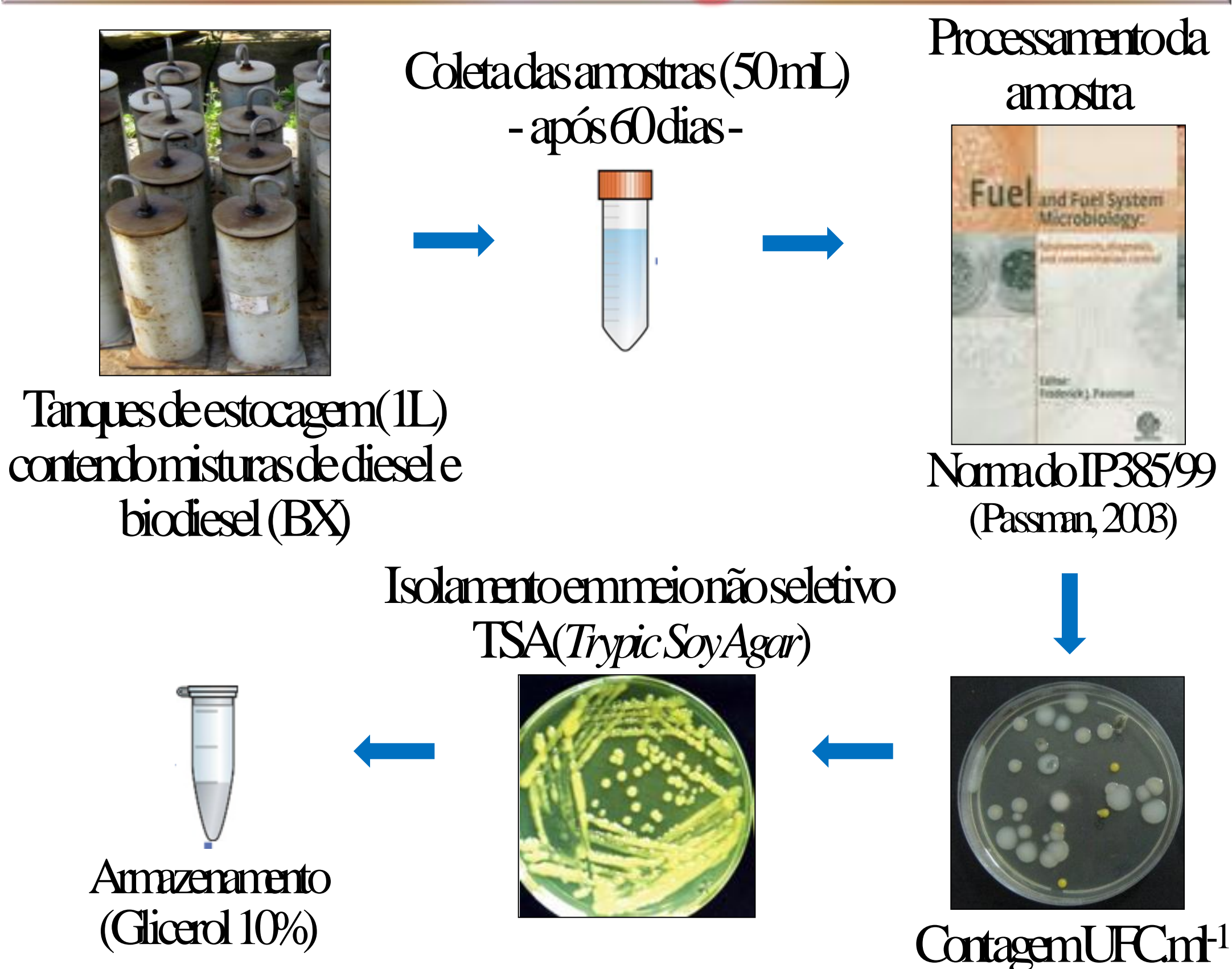
O desenvolvimento de uma população microbiana em tanques depende, principalmente, da presença de água no sistema [4]. A degradação dos alcanos, que são insolúveis, pode ser influenciada pela produção de biosurfactantes ramolipídicos, que promovem a dispersão dos alcanos na fase aquosa, uma vez que suas moléculas apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, reduzindo a tensão superficial em sistemas óleo-água.

A presença de microrganismos com a capacidade de utilizar o diesel como fonte de carbono e energia, como exemplares do gênero *Pseudomonas*, têm sido isolados e avaliados quanto à presença de genes codificantes de enzimas alcano hidroxilases [6,8]. Alcanos com cadeias C<sub>12</sub> a C<sub>18</sub> são hidrocarbonetos saturados e constituem a primeira via de degradação do combustível. Dessa forma, a detecção deste gene em bactérias isoladas a partir de locais de armazenamento de combustíveis, que não apresentem níveis críticos contaminação, podem identificar microrganismos capazes de exercer um papel fundamental na degradação do óleo diesel ou de misturas de diesel e biodiesel (BX).

## Objetivo

O objetivo do trabalho foi o de testar uma ferramenta molecular para avaliar o potencial deterio-gênico das misturas BX por microrganismos, através da detecção do gene da alcano-hidroxilase (*alk-B*), por PCR.

## Metodologia



## Resultados

Durante a coleta não foi observada a formação de borra nos tanques e a contagem dos microrganismos revelou níveis considerados normais de contaminação [7], não ultrapassando a contagem de  $5,1 \times 10^2$  UFC/ml.

Foi possível detectar o gene *alk-B* em 13 das 14 bactérias isoladas (Figura 1). Além disso, estes mesmos isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. devido ao seu crescimento em meio Cetrimida.

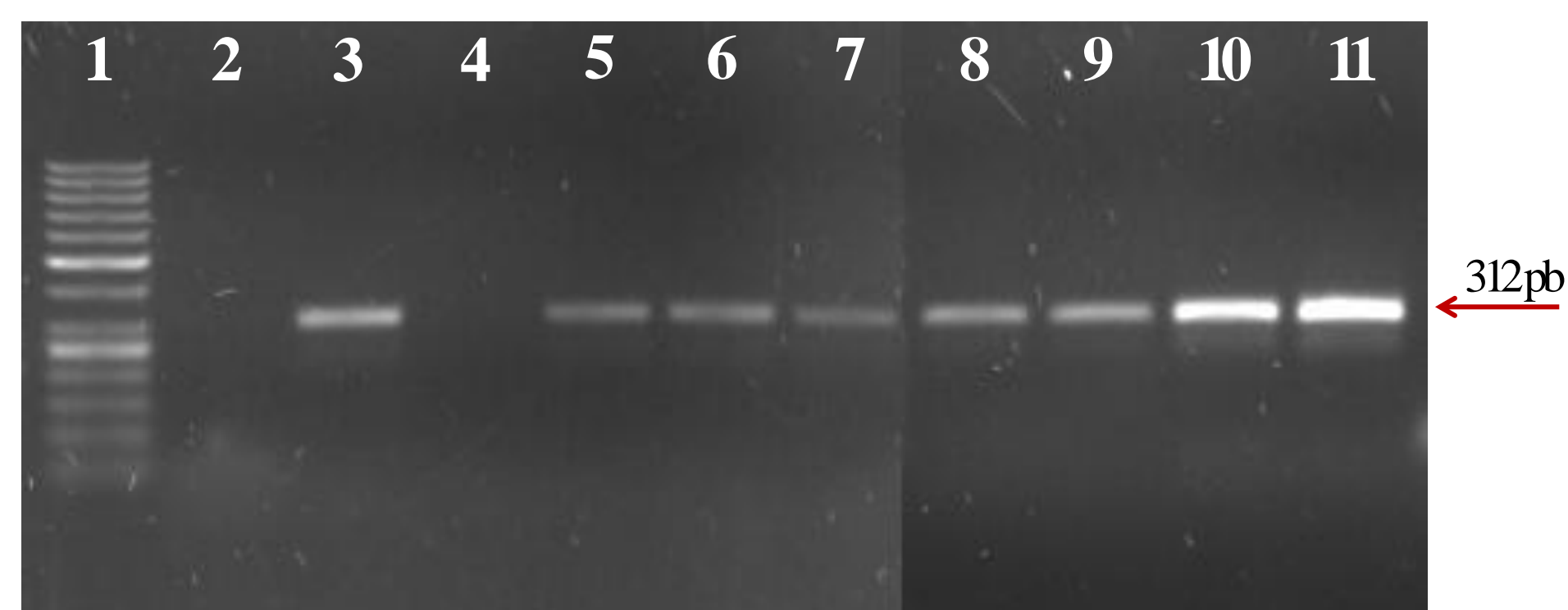


Figura 1. Padrão de amplificação por PCR do gene *alk-B* (312pb). (1) Marcador 50 pb, (2) controle negativo e (3) controle positivo *Pseudomonas aeruginosa*. Isolados A e B obtidos da mistura B5 (4, 5); isolados C e D obtidos dos tanques contendo somente diesel - B0 (6, 7); isolados E e F obtidos da mistura B20 (8, 9); e isolados G e H obtidos dos tanques contendo somente biodiesel - B100 (10, 11).

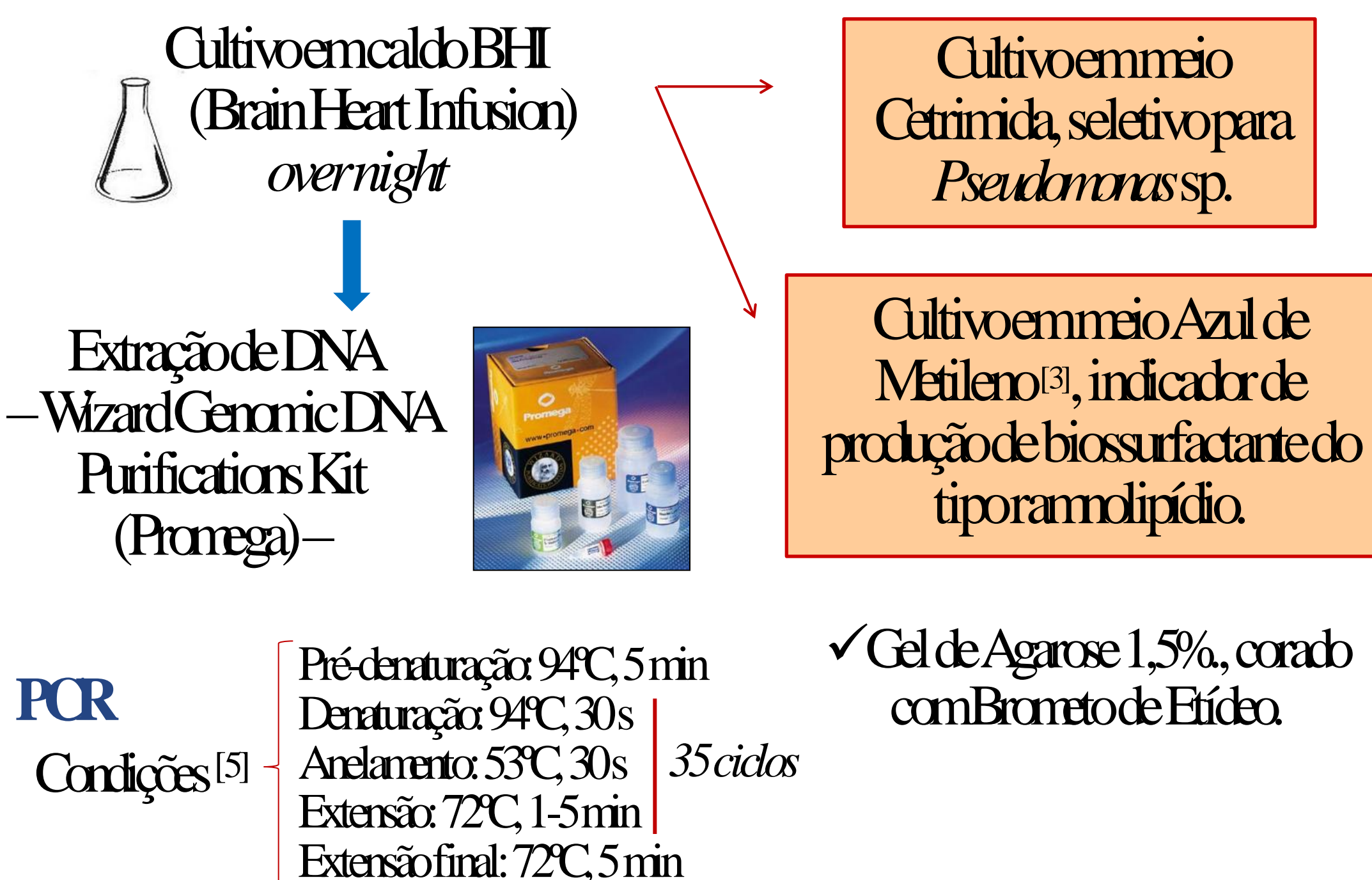
Entre os isolados positivos para *alk-B*, verificou-se 3 como produtores de biosurfactante ramolipídico, comumente produzido por *Pseudomonas* sp.

## Conclusões

Através da detecção do gene *alk-B* pode-se inferir que a técnica de PCR pode ser utilizada como uma ferramenta para identificar microrganismos com potencial de biodegradar o combustível mesmo antes de atingir níveis de contaminação que acarretem na diminuição da qualidade final do produto.

## Referências Bibliográficas

- [1] BENTO, F.M. *et al.* Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel*, São Paulo, v. 4, p. 24-26, 2006.
- [2] BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. Biodegradação de óleo diesel armazenado: estudos em Brasil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Barking, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.
- [3] BODOUR, A.A., and R.M. MAIER. Biosurfactants: types, screening methods, and applications. Chapter in: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (G. Bitton, ed.) John Wiley and Sons, pp. 750-770, 2002.
- [4] BUCKER, F.; SANTESTEVAN, N.A.; JACQUES, R.J.S.; PERALBA, M.C.; CAMARCO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M. Impact of biodiesel on stored brazilian diesel oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. *IN PRESS*, 2010.
- [5] HESS-BLANQUET, S.; BENOIT, Y.; MARÉCHAL, C. & MCNOIE, F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 1392-1403.
- [6] Kim, *et al.* Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World J Microbiol Biotechnol* (2008) 24:1047-1057, 2008.
- [7] PASSMAN, F. J. ASTM International. *Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control*, Manual 47. West Conshohocken, 114p., 2003.
- [8] Zhang *et al.* Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresour. Technology*, 2011.



Para a amplificação de parte do gene *alk-B* utilizou-se o par de oligonucleotídeos iniciadores [5] a seguir, gerando um fragmento de 312pb.

*Pseudomonas* 2

Pseuse2 5'-AYGTSCGYGGCCACCATGT-3'

Pseuas2 5'-CGACGTAGTTGAYGAYYTCC-3'