

MICROORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES PARA BIORREMEDIAÇÃO

PEIL, Greice Schwanke¹; KUSS, Anelise Vicentini²

¹Universidade Federal de Pelotas / Curso de Ciências Biológicas Bacharelado; ²Universidade Federal de Pelotas – Departamento de Microbiologia e Parasitologia. anelisevk@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Diversas atividades desenvolvidas pela humanidade se caracterizam como fontes potenciais de contaminações ambientais. Os óleos e gorduras estão entre os componentes lipídicos da alimentação humana, e sua alta demanda resulta no aumento de efluentes ricos em óleos e gorduras, originados de residências, restaurantes e indústrias alimentícias.

Os lipídeos são compostos causadores de grandes impactos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleo nas superfícies das águas, impedindo a difusão de oxigênio no meio aquático provocando a morte de diversos seres vivos (MONGKOLTHANARUK; DHARMISTHITI, 2002). Provocam ainda agregação de sólidos ou partículas em suspensão, levando ao entupimento de redes, dutos e reservatórios do sistema de tratamento de esgoto, mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura (WILLEY, 2001).

As enzimas lipolíticas (lipases) possuem grande importância devido à capacidade biológica de hidrólise de óleos e gorduras, levando a um grande interesse quanto a sua utilização em tratamento de efluentes com alto teor de gordura (MENDES et al., 2005). A degradação acelerada das gorduras por microorganismos lipolíticos resulta na máxima relação custo/benefício em sistemas e estações de tratamento de esgoto e, principalmente, em caixas de gordura residenciais e comerciais, tornando os mesmos mais eficientes, reduzindo custos de manutenção e impactos ambientais (SEMIONATO, 2006).

Microrganismos com alta atividade lipolítica são as principais fontes de lipases comercializadas para utilização em aplicações industriais. Podem ser aplicadas na remoção da carga poluidora dos efluentes industriais. Formulações biológicas podem ser utilizadas em caixas de gordura, fossas sépticas, sumidouros, filtros biológicos e esgotos sanitários (VEIGA, 2003). A técnica de biorremediação se utiliza do potencial que os microrganismos apresentam de realizar a degradação de poluentes, reduzindo assim o grau de contaminação do local (BOOPATHI, 2000).

Considerando que há microrganismos que sobrevivem nos efluentes, realizando a degradação de gorduras em condições normais, espera-se encontrar uma diversidade de microrganismos lipolíticos, portanto este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar microrganismos produtores de enzimas lipolíticas, para posterior aplicação como biorremediadores buscando minimizar a poluição ambiental.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram coletadas amostras em caixas de gordura implantadas em residências e restaurantes da região de Pelotas, RS, em março e maio de 2012. As coletas de material gorduroso flutuante foram realizadas em quatro caixas de gordura, sendo duas de restaurante e duas de residência. O material coletado foi submetido

ao processo de enriquecimento, que consiste em transferir 10g da amostra para frascos de vidro assépticos, contendo 5 mL de azeite de oliva estéril e 50 mL de meio de cultura mínimo líquido (adaptado de SEMIONATO, 2006). Após, os frascos foram incubados por 120 hs a temperatura de 30°C, a 120 rotações por minuto, segundo metodologia adaptada de Haba et al. (2000).

Do material incubado foram utilizados 100 µL para inocular as placas contendo meio mínimo sólido, acrescido de 15 g/L⁻¹ de ágar-ágar e após a esterilização, adicionado de 0,1% de fungicida e uma emulsão preparada com 5% de azeite de oliva e 1% de Tween 80, esterilizados e homogeneizados por 5 min (SEMIONATO, 2006). Os inóculos foram espalhados sobre a superfície do meio de cultura e as placas inoculadas foram incubadas em estufa a 30°C por 72 a 96 hs (adaptado de SUGIMORI; NAKAMURA; MIHARA, 2002).

Foi observado o crescimento de diferentes tipos morfológicos de colônias, e estas foram repicadas em novas placas e incubadas a 30°C no período de 72 a 96 hs. O processo de isolamento foi realizado através da técnica de esgotamento por estrias e o mesmo foi repetido até a obtenção de colônias puras. Para a identificação bioquímica dos microrganismos, as colônias bacterianas foram caracterizadas quanto a forma, elevação e bordos, e as isoladas foram avaliadas quanto a coloração de Gram e submetidas aos testes de catalase e vermelho de metila.

Para o teste vermelho de metila as bactérias isoladas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 8mL de caldo MRVP, que foram incubados a 37°C por 48 a 120 hs, e após a incubação, cinco gotas do reativo vermelho de metila foram adicionados aos tubos (DE LIMA JR., 2009). O teste é positivo quando a superfície do meio de cultura atinge a coloração vermelha (pH ≤ 4,4) e negativo para coloração amarela no meio (pH ≥ 6,0). Esse teste diferencia organismos entéricos, considerando a capacidade do microrganismo de oxidar a glicose com produção e estabilização de altas concentrações de produtos finais ácidos.

Os microrganismos isolados estão armazenados a 5°C em frascos de vidro inclinados, contendo 3mL do meio sólido (SEMIONATO, 2006). Posteriormente pelo teste da Rodamina B, os isolados serão analisados quanto a atividade lipolítica, segundo a metodologia de Haba et al. (2000). Esse teste detecta lipases extracelulares, utilizando 0,001% de Rodamina B adicionado de 1% de azeite de oliva ao meio como fonte de carbono. Após 336 hs de incubação, as placas são expostas ao resfriamento de 4°C durante 48 hs, e quando se observa um precipitado na forma de cristais de sais de cálcio ou a formação de um halo transparente desse precipitado em volta das colônias, refere-se a produção de lipase.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento e a purificação dos microrganismos do material coletado em dois restaurantes e duas residências teve como resultado a obtenção de onze isolados. A Tab. 1 apresenta a origem destes isolados e suas principais características, como morfologia e cor da colônia, morfologia bacteriana, avaliação quanto a coloração de Gram e resultados dos testes de catalase e vermelho de metila. Dentre os microrganismos isolados, sete são oriundos de restaurante e quatro da caixa de gordura residencial. As bactérias isoladas apresentaram a forma de cocos e foram caracterizadas como Gram-positivas.

Tabela 1 – Origem e caracterização dos isolados bacterianos oriundos de caixas de gordura de restaurantes e residências da região de Pelotas, RS.

Origem	Número do isolado	Morfologia das colônias	Morfologia bacteriana	Gram	Catalase	V.M
Restaurante	1	*Rosa	Cocos e diplococos	G +	+	-
	2	Circular, ondulada, convexa, bege	Cocos e diplococos	G +	+	-
	3	Circular, ondulada, elevada, amarela/bege	Cocos e diplococos	G +	+	-
	4	Circular, ondulada, elevada, marrom com borda bege	Cocos, diplococos e estreptococos	G +	+	-
	13	Circular, ondulada, elevada, marrom com borda amarela	Cocos e diplococos	G +	+	-
	14	Circular, ondulada, elevada, branca/bege	Cocos	G +	+	-
	17	Circular, ondulada, plana, alaranjada	Cocos e diplococos	G +	+	-
Residência	7	Circular, ondulada, plana, amarela	Cocos e diplococos	G +	+	-
	9	Circular, lobada, plana, branca	Cocos e diplococos	G +	+	-
	12	Circular, ondulada, elevada, bege	Cocos e diplococos	G +	+	-
	16	Circular, ondulada, elevada, amarela	Cocos e diplococos	G +	+	-

Legenda: () Análise morfológica incompleta, G+: Gram-positivo, + : reação positiva, - : reação negativa, V.M: vermelho de metila.

Estudos revelam que algumas bactérias lipolíticas são Gram-positivas, incluindo os gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* (WAKELIN, FORSTER, 1997; JAEGER, EGERT, 2002). Quanto ao teste da catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água com liberação de oxigênio, as colônias isoladas foram positivas, e para o teste vermelho de metila, negativas. Considerando que algumas enterobactérias são produtoras de lipases, estas podem normalmente estar presentes em efluentes domésticos e industriais com alto teor de lipídios, porém neste estudo não foram isolados microrganismos deste grupo, segundo os resultados bioquímicos.

4 CONCLUSÃO

A partir das amostras estudadas, obteve-se onze isolados, sendo 63,6% oriundos de caixas de gorduras de restaurante e 36,4% de residências. Segundo os testes realizados, não foram isolados microrganismos entéricos. O estudo revela que estes isolados sobrevivem em efluentes ricos em óleos e gorduras, podendo realizar a degradação dos lipídios em condições normais do ambiente. Portanto os isolados

podem ser potencialmente produtores de lipases, tornando-se eficientes em sistemas de biorremediação.

5 REFERÊNCIAS

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation Technologies. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.63-67, 2000.

DE LIMA Jr., A. F. **Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, maio de 2009.

HABA, E.; BRESKO, O.; FERRER, C.; MARQUES, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.1, p.40-44, 2000.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.4, p.390-397, 2002.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.2, p.296-305, 2005.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S. Biodegradation of lipidich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, n.2, p.101-105, 2002.

SEMIONATO, S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE-UFES**. 2006. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, setembro de 2006.

SUGIMORI, D.; NAKAMURA, M.; MIHARA, Y. Microbial Degradation by *Acinetobacter sp.* Strain SOD-1. **Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.7, p.1579-1582, 2002.

VEIGA, A. A. **Biodegradação de gordura em efluente através da adição controlada de enzimas e microrganismos em reatores aeróbios em série**. 2003. 134f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Centro de Tecnologia e Ciências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, outubro de 2003.

WAKELIN, N. G.; FORSTER, C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, v.59, n.1, p.37-43, 1997.

WILLEY, R. Fats, oils, and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, n.2, p.127-133, 2001.