

## **ATIVIDADE METABÓLICA E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR MICRO-ORGANISMOS LIPOLÍTICOS COM POTENCIAL PARA USO EM BIORREMEDIAÇÃO**

Andrés Felipe Gil Rave<sup>1</sup>; Greice Schwanke Peil<sup>2</sup>, Yohana Melania Lopez Hernandez<sup>2</sup>, Mariana Fernandes Pereira<sup>2</sup>, Rosana Rosa<sup>2</sup>; Anelise Vicentini Kuss<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPel – pipe.biologia@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPel - schwanke.greice@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPel - anelisevk@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Diversas atividades desenvolvidas pela humanidade se caracterizam como fontes potenciais de contaminações ambientais. Pode-se citar, como sendo os principais geradores de resíduos potencialmente poluentes para o meio ambiente, o lixo, o esgoto, a agricultura e as atividades industriais em geral (VEIGA, 2003).

Os lipídeos presentes nos efluentes são causadores de grandes impactos ao meio ambiente, além de provocar 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). Para remoção de gorduras, geralmente são utilizadas caixas de gordura comuns que permitem sua separação por retirada de forma manual ou grandes tanques providos de raspadores na superfície (MENDES et al., 2005).

Buscando minimizar os problemas, a utilização das enzimas lipolíticas (lipases) possui grande importância, devido à sua capacidade biológica de hidrólise de óleos e gorduras, levando a um grande interesse de sua utilização em tratamento de efluentes gordurosos (MENDES et al., 2005). A produção de lipases pode ser observada em diferentes grupos (plantas, animais e micro-organismos), principalmente bactérias e fungos, representam a classe mais utilizada de enzimas, em aplicações biotecnológicas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). O potencial dos micro-organismos em realizar a degradação de poluentes, resulta na redução de contaminação do local, chamado processo de biorremediação (BOOPATHI, 2000).

Os biossurfactantes são uns grupos estruturalmente diversos de moléculas superficiais ativas sintetizadas por microrganismos (DESAI & BANAT, 1997), além disso, suas características são importantes para a degradação de agentes contaminantes presentes no ambiente poluído. Os surfactantes são essenciais para os processos de biorremediação, portanto, pode-se dizer que alguns microrganismos produzem o seu surfactante (biossurfactante) (RIOJAS et al, 2010). Geralmente, pode-se observar a capacidade de produzir biossurfactantes de bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Serratia* (Velázquez et al, 2009).

Considerando que há micro-organismos que sobrevivem nos ambientes poluídos, realizando a degradação de contaminantes em condições normais. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes bactérias lipolíticas obtidas de caixas de gordura do município de Pelotas, quanto à atividade metabólica e a capacidade de produção de biossurfactantes em material gorduroso, a fim de aperfeiçoar processos de biorremediação.

## 2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras em caixas de gordura implantadas em residências e restaurantes da região de Pelotas, RS. O material coletado foi submetido ao processo de enriquecimento, que consiste em transferir 10g da amostra para frascos de vidro assépticos, contendo 5mL de azeite de oliva estéril e 50mL de meio de cultura mínimo líquido (adaptado de SEMIONATO, 2006). Após, os frascos foram incubados por 120hs a temperatura de 30°C, a 120RPM, segundo metodologia adaptada de Haba et al, 2000. Do material incubado foram utilizados 100µL para inocular as placas contendo MMS, acrescido de 15g/L<sup>-1</sup> de 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 (SEMIONATO, 2006). 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 96hs.

As bactérias isoladas foram enriquecidas separadamente em 10mL de MML adicionado de 0,1% de fungicida e 5mL de azeite de oliva, por 96hs a 30°C. Após, as células foram recuperadas por centrifugação (9000rpm durante 15min) e a lavagem foi realizada com solução salina (0,85%) e a centrifugação foi repetida por três vezes. Após a lavagem das células foi realizada a padronização da densidade do inóculos através do controle de turbidez das culturas. Para padronizar a densidade, as culturas foram diluídas e comparadas a uma solução padrão Mac Farland de 0,5, equivalendo a 1,5x10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

O teste de atividade metabólica foi realizado a partir da adição de 20µL de Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio em 180µL de meio mínimo líquido e 20µL de inóculo em uma microplaca com 24 poços. Logo após a adição do trifenil, a microplaca foi incubada por 36°C por 20min. A visualização da atividade metabólica dos isolados foi realizada através da mudança de coloração da cultura, de transparente a vermelho. Para cada isolado foram realizadas cinco repetições.

Para o teste de emulsificante, foram incubados 4mL da solução de células em tubos de ensaio contendo 6mL de azeite de oliva. Para cada isolado foram realizadas três repetições, os quais antes da incubação foram agitados no vortex e logo incubados a 30°C por 96hs. A produção de biossurfactante se avaliou através da fórmula descrita por Cooper et al (1986). O resultado do teste é determinado através da altura do emulsionado, dividido pela altura total da solução e depois multiplicado por 100, obtendo-se um valor em porcentagem de biossurfactante produzido.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o isolamento e a purificação das bactérias do material coletado em quatro caixas de gorduras de restaurantes e quatro de residências, foram obtidos nove isolados, sendo cinco oriundos de restaurantes e quatro de residências.

Tabela 1- Morfologia bacteriana, arranjo e coloração de Gram dos isolados obtidos. G-: Gram-negativo, G+: Gram-positivo.

Isolados	Morfologia Bacteriana	Arranjo	Coloração de Gram	Atividade metabólica	Produção de biossurfactante (média)
1	Cocos	Diplococos	G -	Não	59,1%
2	Cocos	Diplococos	G -	Não	56,9%
3	Cocos	Diplococos	G -	Não	54,5%
4	Cocos	Diplococos	G +	Não	50%
5	Cocos	Estreptococos	G +	Sim	54,6%
6	Cocos	Diplococos	G -	Sim	53,1%
7	Cocos	Diplococos	G -	Sim	53,8%
8	Cocos	Estreptococos	G -	Sim	47,1%
9	Cocos	Estreptococos	G +	Não	53,9%

Após 20 minutos foi observado a atividade metabólica dos isolados na microplaca, e verificando que somente quatro bactérias (isolado 5, 6, 7 e 8) apresentaram atividade metabólica, sendo que os outros não modificaram a coloração para vermelho, indicando o consumo de lipídio como fonte de carbono.

Para o teste de emulsificante observou-se uma produção média de 53,6% de biossurfactante entre os nove isolados. Para análise dos resultados foi calculado a média da produção de biossurfactante das três repetições para cada isolado, os quais se apresentam na tabela 1. O teste de biossurfactante indica a produção de enzimas degradadoras de óleos e graxas, as quais são utilizadas em biorremediação.

O teste de atividade metabólica e teste de biossurfactante foram realizados para selecionar os micro-organismos como potencial para a produção de enzimas lipolíticas, que poderiam ser eficientes em sistemas de tratamentos de esgoto ou efluentes. É possível localizar micro-organismos com capacidade de acelerar os processos de biorremediação.

#### 4. CONCLUSÃO

A partir das amostras estudadas, obtiveram-se nove isolados, sendo 63,6% oriundos de caixas de gorduras de restaurante e 36,4% de residências. Para o teste de biossurfactante foi observada uma produção média de 53,6% para todos os isolados. Para o teste de atividade metabólica, somente quatro isolados (5, 6, 7 e 8) foram eficientes na metabolização dos lipídios presentes no meio de cultura. Os resultados apresentam quatro bactérias as quais possuem alta e rápida produção de enzimas lipolíticas. A importância dos testes de emulsificante e atividade metabólica permitem a otimização dos processos da biorremediação, obtendo-se micro-organismos com altas capacidades de sínteses de enzimas lipolíticas.

## 5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

COOPER, D.G; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p 224-229, 1987.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64, n.6, p.763-781, 2004.

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.

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.

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.

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.

VELÁZQUEZ, A. C; JIMENEZ, T. J; RODRÍGUEZ, V. R. **aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* del grano de café verde en presencia de cadmio y caracterización del biosurfactante producido**. *Sociedad mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, v 7, p 56-59, 2009.

JITENDRA D. DESAI, D. J; BANAT, M. I. **Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential**. *Microbiology and molecular biology reviews*, v 61, p 47-64, 1997.

GONZÁLEZ, R. H; TORRES, B. L; MONDACA, F. I; BALDERAS, C. J; GORTÁRES, M. P. **Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos**. *Química Viva*, v 9, p 120-145, 2010.