

## PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E QUANTIFICAÇÃO DE ENZIMAS LIPASES DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE EFLUENTES COM ALTA CARGA DE LIPÍDEOS

ANDRÉS FELIPE GIL RAVE<sup>1</sup>; GREICE SCHWANKE PEIL<sup>2</sup>, YOHANA MELANIA  
LÓPEZ HERNÁNDEZ<sup>2</sup>, ANELISE VICENTINI KUSS<sup>2</sup>; PATRICIA DA SILVA  
NASCENTE<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 - patsn@bol.com.br

### 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).

O processo metabólico dos microrganismos é responsável pela remoção de contaminantes (MANDRI&LIN, 2007), reduzindo a sua concentração no local da remoção (BELLO, 2007) ou da transformação dos poluentes em compostos de baixa toxicidade (COLLA& COSTA, 2003). 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). A aplicação de enzimas como biocatalisadores nas indústrias vem sendo estudada, devido à alta atividade catalítica, em comparação com os catalisadores convencionais (DALLA-VECCHIA *et al.*, 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 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 próprio surfactante (biossurfactante) (GÓNZALEZ *et al.*, 2010).

Considerando que há micro-organismos que sobrevivem nos ambientes poluídos, realizando a degradação de contaminantes em condições normais, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de biossurfactante e quantificar enzimas lipases de bactérias com características lipolíticas, mediante a degradação de azeite de oliva, a fim de aperfeiçoar processos de biorremediação.

## 2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de materiais graxos de quatro caixas de gorduras de restaurantes e quatro caixas de gorduras de residências e material gorduroso de cinco agroindústrias na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. O material obtido foi mantido entre 5-10°C durante 3 dias (PRADE *et al*, 2006). As amostras da espuma (material flotado) foram submetidas ao processo de enriquecimento.

Nesta etapa foram utilizados 100µL do caldo de enriquecimento para inocular as placas contendo meio mínimo sólido. Este meio foi acrescido de 15g.L<sup>-1</sup> de ágar puro em pó e após a esterilização foi adicionado 0,1% de fungicida Nistatina e uma emulsão preparada com 5% de azeite de oliva e 1% de Tween 80, esterilizados e homogeneizados em agitador de mesa durante 5min (SEMIONATO, 2006). As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 30°C por 72h a 96h. Foi observado o crescimento de diferentes tipos morfológicos de colônias, e estas foram repicadas em novas placas contendo o mesmo meio de cultura mínimo sólido. As placas inoculadas foram incubadas a 30°C no período de 72h a 96h. Após, os isolados foram armazenados a 5°C em frascos de vidro inclinados, contendo 3mL de meio mínimo sólido.

Foram identificadas as características morfológicas para cada colônia isolada pela visualização microscópica, além disso, fez-se a coloração simples de Gram para verificar a morfologia celular das bactérias e, posteriormente, fez-se a caracterização bioquímica pelo VITEK® 2. Além disso, realizou-se o teste de colapso da gota, para avaliar a produção de biossurfactantes, e titulação, para quantificar a produção de enzimas lipases das diferentes espécies de bactérias, segundo os resultados obtidos no VITEK® 2.

Depois da identificação, para fazer os testes de colapso da gota e titulação, realizou-se a lavagem das células. As culturas de micro-organismos isolados foram enriquecidas em 50mL de meio LB e incubadas durante 96h a 30°C. Foi utilizado 36mL de meio LB. As células foram recuperadas por meio de uma microcentrifuga refrigerada (lavagem: 9000RPM por 15 min a 4°C). O sobrenadante foi descartado, fizeram-se três lavagens sucessivas com as mesmas condições. Após lavagem das células, foi realizada a padronização da densidade óptica, usando um espectrofotômetro Kasuaki IL-227. Utilizou-se uma densidade óptica padrão de 1.0 DO para cada isolado.

Para o teste de colapso da gota, foram inoculados 100µL de células (1.0 DO) em 10mL de MMS durante 72h a 36°C, para obtenção do sobrenadante. Para a observação da produção de biossurfactante, foram incubados 2µL de azeite de oliva em uma microplaca a 36°C por 24h. Depois, foram adicionados 5µL de sobrenadante à superfície do óleo de oliva. Após um minuto observou-se a gota, sendo considerado positivos quando houve alteração do formato da gota de óleo.

A atividade da lipase foi determinada pelo método de titulação utilizando azeite de oliva como substrato. 10% de azeite de oliva foi emulsionada com 5% de goma arábica em 400mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 100µl de sobrenadante à emulsão e incubou-se durante 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida por adição de 1,0 ml de acetona:etanol (1:1). A quantidade de enzima produzida foi calculada por titulação com NaOH 0,05 M até um pH de 10,5 utilizando a fenolftaleína como um indicador.

### 3. RESULTADOS

Após o isolamento e purificação das bactérias a partir de material coletado, foram obtidas 30 bactérias, das quais foram identificadas bioquimicamente 5 espécies diferentes mediante o sistema VITEK® 2. A Tabela 1 mostra as bactérias isoladas e as suas características quanto a coloração de Gram, espécies de bactérias caracterizadas bioquimicamente mediante o VITEK® 2 e também os resultados obtidos no teste de colapso da gota e titulação.

ISOLADOS (# de espécies isoladas)	ESPÉCIES	TESTE DE COLAPSO DA GOTA	TITULAÇÃO (U/mL)
2	<i>Raoutella ornithinolytica</i>	+	192
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	182
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	172
12	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	+	168
1	<i>Raoutella planticola</i>	+	192
<b>Controle positivo</b>	<i>Bacillus cereus</i>	+	158
<b>Controle negativo</b>	Sem inóculo	-	-

Nos resultados apresentados pelo método de titulação se observam bactérias como as do gênero *Raoutella* com capacidade de catalisar ou transformar até 192µm/min dos ácidos graxos presentes no azeite de oliva. Sagar *et al*, 2013 mostraram resultados semelhantes mediante titulação da degradação de azeite de oliva e outros substratos oleosos por bactérias com características lipolíticas.

## 4. CONCLUSÃO

Todos os isolados apresentaram produção de biossurfactante e enzima lípases extracelular, que são características desejáveis em micro-organismos utilizados em processos de biorremediação. A importância dos testes de colapso da gota e quantificação de enzimas mediante titulação permitem a otimização dos processos da biorremediação, obtendo-se micro-organismos produtores de biossurfactante e com altas capacidades de sínteses de enzimas lipolíticas.

## 5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLO, M, Y. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.2, p.2735-2739, 2007.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation Technologies. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.63-67, 2000.
- COLLA, L, M; Y COSTA, J, A, V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v.13, p.85-103, 2003.
- DALLA, V, R; NCASCIMENTO, M; Y SOLDI, V. (2004). Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p.623-630, 2004.
- 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.
- GUPTA, R; GUPTA, N; Y RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64, n.6, p.763-781, 2004.
- 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.
- MENDES, A, A; CASTRO, H, F; PEREIRA, E, B; Y FURIGO JR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n.2, p.296-305, 2005.
- PRADE, C. A; MATSUMURA, A. T. S; GUERRERO, R. T; PORTO, M. L. D. Diversidade de fungos filamentosos e microscópicos do solo em uma plantação de *Hoveniadelphicis* Thumb. **Biociências**, v.14, n.2, p.101-106, 2006.
- 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.