

MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMA LIPASE EXTRACELULAR

GREICE HARTWIG SCHWANKE PEIL¹; ANDRÉS FELIPE GIL RAVE²; ISABEL DE ABREU ESTEVES²; ANELISE VICENTINI KUSS²; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE³

¹Universidade Federal de Pelotas – schwanke.greice@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – pipe.biologia@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bel.esteves@live.com

²Universidade Federal de Pelotas – anelisevk@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – patsn@bol.com.br

1. INTRODUÇÃO

Diferentes atividades realizadas pelos seres humanos são responsáveis por diversos tipos de contaminações ambientais, dentre os quais, está a poluição dos ambientes aquáticos. Entre a diversidade de fontes potenciais de poluição das águas, pode-se observar um aumento de efluentes enriquecidos em óleos e gorduras, de diferentes origens, como residências, restaurantes e indústrias alimentícias, devido a alta demanda da alimentação humana, incluindo óleos e gorduras.

Efluentes contendo alto teor lipídeos são causadores de grandes impactos ao meio ambiente. Os lipídeos podem formar filmes de óleo nas superfícies das águas, impedindo a difusão de oxigênio no meio, resultando na morte de diversos seres vivos (MONGKOLTHANARUK; DHARMISTHITI, 2002). Os resíduos sólidos orgânicos são originados da fermentação do material presente nos efluentes, podendo formar ácidos orgânicos com geração de odores desagradáveis e também diminuir o oxigênio dissolvido nas águas (GRAMINHA et al. 2008). Efluentes industriais de frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral apresentam altos teores de demanda bioquímica e química de oxigênio, visto que o teor de gorduras eleva a concentração de matéria orgânica (COLLA et al. 2012).

A partir do exposto acima, observa-se a necessidade de processos alternativos ou coadjuvantes para amenizar os problemas de poluição do meio ambiente, bem como os quais se referem ao tratamento de efluentes oleosos. Portanto a utilização das enzimas lipolíticas (lipases) possui grande importância, devido à sua capacidade de hidrolisar óleos e gorduras (MENDES et al., 2005). A produção de lipases é observada em plantas, animais e micro-organismos. No entanto, as lipases microbianas se destacam devido ao seu potencial em aplicações industriais (ANBU et al., 2011). Diversos micro-organismos têm a capacidade de realizar a degradação de poluentes, resultando na redução de contaminação do local, conhecido como biorremediação. Esta técnica pode ser aplicada de diferentes formas: a partir da utilização de micro-organismos autóctones; adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes; ou através da inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (BENTO et al. 2003)

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas lipolíticas extracelulares pelos micro-organismos isolados de efluentes industriais, para posterior aplicação em processos de biorremediação, a fim de minimizar a poluição ambiental.

2. METODOLOGIA

As amostras foram coletadas em diferentes estações de tratamento de efluentes, incluindo indústrias de laticínios, de alimentos e abatedouros, da região de Pelotas, RS. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Inicialmente as amostras passaram por um processo de enriquecimento, que consistiu em pesar 10g do material coletado e adicioná-lo ao meio de cultura mínimo líquido acrescido de óleo de oliva (SEMIONATO, 2006), e após incubar por 120h a temperatura de 30°C, a 120 rotações por minuto (rpm), segundo metodologia adaptada de BURKERT et al. (2004). Posteriormente foi utilizado 100µL do caldo de enriquecimento de cada amostra para semear as placas contendo meio mínimo sólido acrescido de 5% de azeite de oliva emulsionado com 1% de Tween 80. O espalhamento do material foi realizado pela técnica de esgotamento por estrias, e logo as placas foram incubadas a 30°C por 72h a 96h.

Após a incubação foi observado o crescimento de diferentes tipos morfológicos de colônias bacterianas, bem como dos fungos. Os micro-organismos foram repicados e novamente incubados a 30°C no período de 72h a 96h. O isolamento das bactérias foi realizado em esgotamento por estrias, que foi repetido até a obtenção de colônias puras, enquanto os fungos foram repicados em quatro pontos da placas. As bactérias isoladas foram caracterizadas pela coloração de Gram e posteriormente identificadas a partir de provas bioquímicas realizadas através do kit de identificação automatizado, Sistema Vitek 2[®]. Para identificação as bactérias foram inoculadas em meio BHI, em estrias, e incubadas por 24h. Os fungos filamentosos foram identificados através de microscopia ótica em lâmina corada com azul de algodão, após o crescimento de sete dias a 30°C, em ágar PDA.

Todos os micro-organismos isolados foram avaliados quanto a produção de enzimas lipolíticas extracelulares, pelo teste da Rodamina B (adaptado de LIMA et al. 2004 e MOURA et al. 2013). Neste teste a detecção de lipases extracelulares é observada a partir da liberação de ácidos graxos e glicerol, os quais formam um complexo fluorescente com a Rodamina B. Os micro-organismos foram inoculados em meio mínimo sólido descrito anteriormente, acrescido de 1% de solução de Rodamina B (0,1% m/v), com pH final 7,0. A inoculação das bactérias foi realizada em estrias, enquanto os fungos filamentosos foram semeados no centro da placa de cultivo. As bactérias foram incubadas a 30°C por 48h e os fungos por 168h. Após o período de incubação as placas foram visualizadas em câmara escura com luz ultravioleta (UV) 365nm, com o objetivo de observar halos de coloração laranja fluorescentes ao redor dos micro-organismos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de lipase extracelular foi avaliada em 26 micro-organismos isolados, sendo 16 bactérias e 10 fungos filamentosos. A maioria das bactérias (12) revelaram fluorescência sob luz UV, caracterizando a produção de lipase extracelular. A maioria dos fungos também revelou fluorescência, do total de 10, 7 foram positivos para o teste. Os resultados do teste rodamina B de cada micro-organismo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados do teste Rodamina B das bactérias e fungos filamentosos obtidos de efluentes de laticínios e abatedouros da região de Pelotas.

Micro-organismos	Teste Rodamina B
<i>Serratia marcescens</i> 1	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 1	+
<i>Serratia marcescens</i> 2	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 2	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 3	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 4	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 5	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> 1	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i> 1	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> 2	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i> 2	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 6	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 7	-
<i>Raoultella planticola</i>	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 8	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp 9	+
<i>Geotrichum</i>	+
<i>Gliocladium</i>	+
<i>Mucor</i>	+
<i>Penicilium</i> 1	+
<i>Penicilium</i> 2	+
<i>Penicilium</i> 3	+
<i>Fusarium</i>	+
<i>Paecilomyces</i>	-
<i>Trichoderma</i>	-
Fungo não identificado	-

As bactérias que apresentaram resultados negativos são *Klebsiella pneumoniae* ssp, porém de 9 espécies, apenas 3 revelaram-se negativas. Se obteve bons resultados, visto que 75% das bactérias e 70% dos fungos obtidos revelaram produção de enzima lipase extracelular. Os micro-organismos que apresentaram resultados negativos para o teste rodamina, ainda assim têm sua importância, pois o fato de serem obtidos em meio de cultura com óleo como única fonte de carbono, ainda os caracteriza como lipolíticos, apenas não produzem lipase extracelular. A produção de enzimas extracelulares é fator positivo sob o ponto de vista biotecnológico, no caso de explorar os micro-organismos, devido a redução de custos para isolamento do produto no meio de cultura (DALLA-VECCHIA et al. 2004; MARTINS et al. 2008).

4. CONCLUSÕES

A maioria dos isolados obtidos são produtores de lipases extracelular, portanto apresentam potencial para aplicação em tratamentos biotecnológicos de efluentes. A produção de enzima extracelular favorece a utilização destes micro-organismos em sistemas de biorremediação de locais com alta carga orgânica, incluindo óleos e gorduras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBU, P.; NOH, M.; KIM, D.; SEO, J.; HUR, B.; MIN, K. H. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.20, p.4147-4156, 2011.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER JR., W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n.1, p.65-68, 2003.

BURKERT, F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, n.1, p.77–84, 2004.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista de Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas da Universidade de Passo Fundo**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

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

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A; GOMES, E. R. S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, n.1-2, p.1-22, 2008.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.31, n.1-3 , p.53–61, 2004.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.

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 lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, n.2, p.101-105, 2002.

MOURA, L. F. W. G.; OLIVEIRA, M. V.; LÔ, M. M.; MOTA, J. G. S. M.; MAGALHÃES, E. A.; LIMA, M. C. L.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 2, p. 157-165, 2013.

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.