

Bioprospecção de Bactérias para Biorremediação de Ambientes Poluídos com Resíduos Lipídicos

**Marina Funchal de Barros¹, Juliana Barion Massi¹, Fabiana Guillen Moreira Gasparin¹,
Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹**

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10.011 – CEP 86057-970, Londrina – PR –
E-mail: (marinaaronne@gmail.com)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a partir de efluentes contaminados com resíduos lipídicos a presença de microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes com o intuito de aplicá-los em processos de biorremediação. Alíquotas de diferentes diluições dos efluentes foram inoculadas em placas contendo meio BHB. As placas foram incubadas a 28°C por até 48h e as colônias isoladas foram mantidas em meio Dyg's. Para a produção de lipases, os isolados bacterianos foram inoculados em meio solidificado contendo óleo vegetal e Rodamina e para produção de biossurfactantes foram cultivadas em meio Dyg's a 28°C, sem agitação, por 48h. A produção do biossurfactante foi verificada pelo teste do índice de emulsificação e a atividade tensoativa pelo teste do abaixamento da tensão superficial. Os isolados bacterianos não apresentaram atividade lipásica. A amostra EQUALIZADOR 5 exibiu menor atividade emulsificante em querosene, porém, maior atividade tensoativa, sugerindo que o querosene não foi um composto adequado para demonstrar a capacidade emulsificante deste biossurfactante. Apesar da ausência de atividade lipolítica, os resultados demonstraram que tais isolados são promissores para biorremediação.

Palavras-chave: efluentes; lipases; biossurfactantes

INTRODUÇÃO

Para minimizar os efeitos negativos de resíduos lipídicos sobre o ambiente muitas alternativas têm sido propostas como o uso de reatores anaeróbicos para o tratamento de efluentes, porém, esta metodologia pode causar inibição da atividade metanogênica e redução da concentração de ATP^{1,2}. Devido a estes efeitos negativos, outras estratégias para a remoção dos óleos e gorduras tem sido propostas como a utilização de enzimas e de surfactantes.

Enzimas são consideradas catalisadores naturais e são produzidas pela fermentação de materiais biológicos, podendo ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbiológicas. Processos enzimáticos oferecem muitos benefícios como especificidade, condições suaves e lixo reduzido. Além disso, as enzimas são biodegradáveis contribuindo muito pouco ao BOD de resíduos. Enzimas lipolíticas ou lipases estão envolvidas na degradação e na mobilização de lipídios e desenvolvem um importante papel na reciclagem de compostos insolúveis em água³.

Os surfactantes de origem microbiana denominados de biossurfactantes apresentam vantagens sobre os de origem química como baixa toxicidade, tolerância a temperatura, pH e força iônicas, além de serem biodegradáveis na água e no solo⁴. Além disso, apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espuman-

te, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases podendo através destas propriedades serem usados em diferentes setores, tais como: petróleo, petroquímico, alimentos, bebidas, cosméticos, farmacêutico, mineração, metalúrgico, agroquímico, fertilizantes, ambiental, papel e celulose⁵.

O objetivo deste estudo foi investigar a partir de efluentes contaminados com resíduos lipídicos a presença de microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes com o intuito de aplicá-los em processos de biorremediação.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Coleta:** efluente foi coletado a partir do equalizador do sistema de tratamento de efluentes de um laticínio localizado na cidade de Londrina (PR).
- **Isolamento:** alíquotas de 100 µL de diferentes diluições (10^{-1} a 10^{-6}) de efluentes foram inoculadas em placas contendo meio BHB. As placas foram incubadas a 28°C por até 48 horas e as colônias isoladas foram mantidas em meio Dyg 's a 4°C.
- **Produção de Lipases:** os isolados bacterianos foram inoculados em placas contendo meio mínimo, óleo vegetal e Rodamina. As placas foram incubadas a 28°C por até 48 horas e posteriormente foram visualizadas sob luz ultra-violeta.
- **Produção de Biossurfactantes:** bactérias isoladas em BHB e mantidas em Dyg 's foram cultivadas em frascos de 125mL contendo 25mL de Dyg 's. Em cada frasco foi inoculado duas alçadas de biomassa bacteriana. Os cultivos foram incubados por 48 horas a 28°C. Após centrifugação, os extratos brutos foram usados para teste do índice de emulsificação e para o teste do abaixamento da tensão superficial.
- **Teste do índice de Emulsificação:** 2 mL do extrato bruto foi misturado com 2 mL de querosene e após agitação por 2 minutos em vórtex formou-se uma camada de emulsificação. Em seguida, foi calculado a razão entre a camada emulsificada e a altura total do líquido. O teste foi conduzido em triplicata e os resultados estão apresentados como porcentagem de emulsificação.
- **Abaixamento da Tensão superficial:** os extratos brutos dos cultivos submersos em Dyg 's foram analisados em tensiômetro analógico modelo K6 (Kruss).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente 3 isolados bacterianos foram obtidos a partir do BHB e nenhum demonstrou atividade lipolítica pelo teste da Rodamina. No entanto, foram capazes de produzir biossurfactantes quando cultivados em Dyg 's como demonstra a figura 1. As 3 bactérias denominadas de EQUALIZADOR 1, EQUALIZADOR 3 e EQUALIZADOR 5 foram capazes de emulsificar o querosene, um composto apolar derivado do processo de refinamento de óleo cru e que pode apresentar de 12 a 18 C. Pelo teste do abaixamento da tensão superficial foi possível visualizar as propriedades tensoativas dos biossurfactantes produzidos pelas bactérias do estudo. Haba et al. (2000) selecionaram 9 isolados de *Pseudomonas* sp. capazes de crescer em meio contendo óleo de fritura (óleos de girassol e oliva) e acumular compostos tensoativos; sendo que a tensão superficial final do meio variou entre 34 a 36 mN/m. De acordo com a figura 2, o biossurfactante produzido pelo isolado EQUALIZADOR 5 exibiu a melhor propriedade tensoativa. De acordo com Pacheco et al. (2010), a atividade emulsificante aumenta com o aumento da concentração do biossurfactante no meio. Este fato poderia explicar, a menor atividade emulsificante presente na amostra EQUALIZADOR 5, porém, como a atividade tensoativa foi

maior no extrato bruto desta bactéria, provavelmente o querosene não foi um composto adequado para demonstrar a capacidade emulsificante deste biossurfactante bacteriano. Os cultivos, para a produção dos biossurfactantes, ocorreram em meio Dyg's cuja composição apresenta extrato de levedura, e este, por ser de origem protéica, provavelmente seria o responsável pelo abaixamento da tensão superficial observada no controle. Os isolados EQUALIZADOR 1 e EQUALIZADOR 3 apresentaram resultados muito semelhantes e como ainda não foram identificados, talvez sejam a mesma espécie de bactéria.

Figura 1- Teste do Índice de Emulsificação realizado a partir dos extratos brutos dos cultivos submersos de bactérias isoladas de efluentes de laticínio.

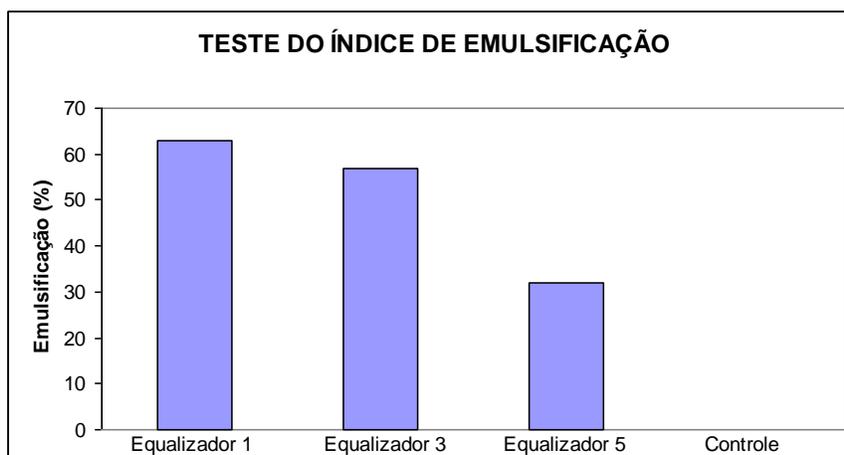
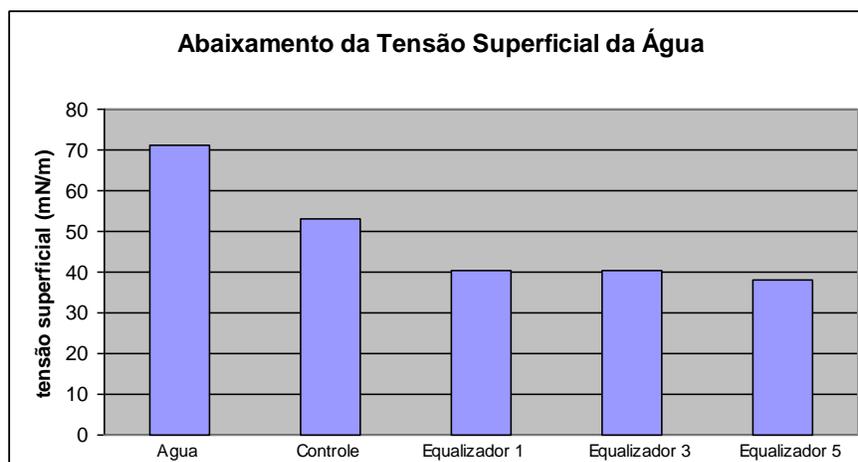


Figura 2- Teste do Abaixamento da Tensão Superficial a partir dos extratos brutos dos cultivos submersos de bactérias isoladas de efluentes de laticínio.



CONCLUSÕES

Apesar da ausência de atividade lipolítica nos isolados, os mesmos podem ser aplicados para biorremediação de ambientes poluídos com lipídios pois através da produção de biossurfactantes melhoram a solubilidade e a disponibilidade de compostos de baixa polaridade ou apolares.

Contudo, a busca por mais microrganismos produtores de lipase e/ou biossurfactantes em diferentes condições de cultivo faz-se necessário para complementar este estudo de bioprospecção.

REFERÊNCIAS

- (1) PERLE, M. et al. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. **Water Research**, v. 29, p. 1549-1554, 1995.
- (2) MENDES, A. A. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbica de efluentes com alto teor de lipídeos previamente tratados com enzimas hidrolíticas. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, Brasil. 2004.
- (3) HASSAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- (4) GOUVEIA, G. C.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S ; ARAÚJO, J. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ed 30, 2003.
- (5) FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactantes por leveduras. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.
- (6) HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379-387, 2000.
- (7) Pacheco, G.J.; Ciapina, E. M. P.; Gomes, E. B.; Junior, N. P. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 685-693, 2010.