

# PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPASE E ESTERASE E BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE BORRA OLEOSA

Cristiane Santos Barbosa<sup>1</sup>; Francielle Bucker<sup>2</sup>; Naiara Santestevan<sup>3</sup>; Marcela Moreira<sup>4</sup>; Fátima Menezes Bento<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bolsista DTI-I do CNPq do Laboratório de Micologia Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: [crisbbarbosa@gmail.com](mailto:crisbbarbosa@gmail.com); <sup>2</sup>Bolsista DTI-II do CNPq do Laboratório de Micologia Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; <sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica CNPq e estudante do Curso de Ciências Biológicas da UFRGS; <sup>4</sup>Estudante do Programa de Pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; <sup>5</sup>Professora Dr<sup>a</sup>. do Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Líder do Grupo de Pesquisa. E-mail: [fatimabento@yahoo.com](mailto:fatimabento@yahoo.com)

**Resumo** – A bioprospecção de microrganismos, tais como bactérias e leveduras, capazes de utilizar diesel e biodiesel como fonte de carbono para seu metabolismo, é importante para se conhecer as atividades química e fisiológicas envolvidas no processo de deterioração de combustíveis ou biorremediação de locais contaminados. Sendo assim, algumas das principais atividades que estão relacionadas a estes processos seriam a produção de enzimas lipolíticas e esterásicas, pois estão diretamente envolvidas na degradação de óleo diesel, além da detecção de produção de biosurfactantes por bactérias e leveduras que podem aumentar a biodisponibilidade do diesel e seus compostos à ação degradativa dos mesmos. Neste trabalho o objetivo foi isolar, de borras oleosas provenientes de centrifuga de diesel (B0; B4; B5) e de biodiesel (B100), bactérias e leveduras capazes de produzir enzimas lipase, esterase e a detecção de ramnolipídios, estas foram avaliadas de acordo com a sua capacidade de utilizar o diesel, biodiesel e suas misturas como fonte de carbono. Dos 23 microrganismos isolados: 20 apresentaram atividade da enzima lipase, enquanto 9 para esterase e nenhum isolado apresentou resultados positivos na detecção de ramnolipídios.

**Palavras-chave:** microrganismos; degradação; óleo diesel; lipase; esterase.

## Introdução

A degradação microbiana desempenha um papel importante na desagregação da composição de uma mistura de hidrocarbonetos de petróleo, sendo sua biodegradação em um ambiente natural, complexa, porque envolve as propriedades do óleo, a natureza da comunidade microbiana e a variedade de fatores ambientais que influenciam na atividade microbiana. A atenção se foca nos ambientes marinhos desde que o ambiente oceânico são os últimos e maiores receptores de hidrocarbonetos poluentes (Atlas, 1981).

Por outro viés, o controle da biodeterioração do diesel/biodiesel em tanques de armazenagem é um fator expressamente importante para a indústria petrolífera, pois a biodeterioração de diesel e seus compostos causam muitos transtornos como o entupimento de filtros em veículos, a redução na qualidade do combustível com o crescimento de microrganismos no óleo, aumento de partículas e metabólitos produzidos por estas e até mesmo, corrosão em tanques de combustível de carros e de armazenagem (Hill & Hill, 2009).

Sendo assim, o isolamento de microrganismos provenientes de resíduos oleosos é de interesse para processos de biorremediação e de controle das populações microbianas em armazenamento de diesel/biodiesel.

A seleção de microrganismos que produzem enzimas lipase e esterase e biossurfactantes pode ser mais uma ferramenta para o conhecimento da atividade metabólica destes microrganismos que podem deteriorar óleo diesel/biodiesel durante sua armazenagem, com o objetivo de controlá-los e também como para a seleção e posterior utilização deste na biorremediação de locais contaminados por combustíveis diesel.

## **Materiais e Métodos**

Microrganismos isolados: Para a avaliação da produção de enzimas e biossurfactantes foram utilizados 12 bactérias e 11 leveduras isoladas de centrífuga de diesel (B5; B4) e de biodiesel (B100).

Avaliação de utilização de diesel/biodiesel como única fonte de carbono: Os microrganismos também foram avaliados em placa, pelo crescimento em meio contendo com única fonte de carbono o óleo diesel 1%.

Preparação das placas para avaliação da atividade enzimática da lipase e esterase; e produção de ramnolipídeos: A atividade da lipase foi avaliada em placa pelo aparecimento fluorescente das colônias sob a luz ultravioleta. Este meio é composto de 5g/L de Peptona; 1g/L de Extrato de levedura; 4g/L de NaCl; 0,01g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 15 % de Agar; 2,5 % de óleo de Oliva (esterilizado separadamente por filtração e adicionado ao meio durante o preparo); e 0,001% de solução de Rhodamina B.

A atividade da esterase foi avaliada pelo aparecimento de um halo ao redor do crescimento da colônia, em placa. O meio é composto de: 5g/L de Peptona; 1g/L de Extrato de levedura; 5g/L de NaCl; 0,01g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1g/L de Extrato de carne; 15g/L de Agar; e 1% de Tween 80 (esterilizado separadamente por filtração e adicionado ao meio durante o seu preparo).

A produção de biossurfactantes foi testada em meio Azul de Metileno, onde a detecção dos ramnolipídeos é realizada pelo aparecimento de um halo branco ao redor do crescimento de cada colônia, devido a precipitação do corante azul de metileno (Wild et. al., 1997; Peixoto, 2008). Este meio possui em sua composição : 10g/L de Peptona; 10g/L de Lactose; 2g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,005g/L de Azul de metileno; 15g/L de Agar; e 0,2g/L de Brometo de cetil-trimetilamônio.

Os microrganismos foram semeados em culturas novas de caldo nutriente para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras. Estes, então, foram semeados em cada placa por uma picada com agulha de alça bacteriológica e incubados por 48h a 28°C e posteriormente avaliados.

## **Resultados e Discussão**

As enzimas esterases agem em ésteres solúveis ou hidrolisam outros lipídeos em água. Já as lipases são enzimas hidrolíticas que, além de em sua maioria poderem hidrolisar os substratos de esterases, sendo o inverso impossível, atuam na interface óleo/água, catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídeos que resulta na formação de mono e diacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol e também propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa. Ambas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem em ésteres insolúveis em água, como os triglicerídeos (Jaeger et. al. 1999; Bückner, 2009).

A produção de ramnolipídeos por cepas de microrganismos isolados de amostra de borra oleosa é uma alternativa para obtenção de tensoativos não tóxicos e nocivos ao meio ambiente, como os produzidos quimicamente. Os surfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial de interfaces óleo/água e ar/água. Estes biosurfactantes podem ser utilizados na biorremediação para limpeza de derrames de óleo e a recuperação de óleo em reservatórios podendo ser mais efetivos que os surfactantes químicos (Neto, 2010).

E dos 23 isolados 12 isolados, entre bactérias e leveduras apresentaram capacidade para degradação de óleo diesel em 48 h de avaliação.

Em nenhum dos isolados bacterianos e de leveduras se detectou a produção de ramnolipídios. Já das 12 bactérias isoladas 10 apresentaram atividade lipolítica e das 11 leveduras 10 apresentaram resultados positivos na atividade enzimática da lipase.

Na atividade de esterase somente 1 bactéria apresentou resultado positivo enquanto 8 leveduras produziram o halo que detecta a ação da enzima esterase.

## **Conclusões**

As leveduras e bactérias isoladas demonstraram bons resultados para sua seleção como microrganismos produtores principalmente de lipase e somente alguns para esterase, levando em conta que nenhum microrganismo apresentou resultado positivo para detecção de ramnolipídios.

## **Apoio**

Agradecimento ao CNPq pela concessão das bolsas.

## **Referências**

- ATLAS, Ronald M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: na Environmental Perspective. Microbiological Reviews, Kentucky. V.45, n.1, p.180-209, 1981.
- BÜCKER, Francielle. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. Julho de 2009.140 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) UFRGS. Porto Alegre, 2009.
- HILL, E. C.; HILL, G.. Strategies for Resolving Problems Caused by Microbial Growth in Terminals and Retail Sites Handling Biodiesels. ECHA Microbiology. **IASH 2009, the 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, República Tcheca, 2009.
- NETO, Doumit C. Produção de Ramnolipídios por fermentação em estado sólido. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica). UFP. Curitiba, 2010.
- PEIXOTO, Renata de M. Bioprospecção de organismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia). USP. São Paulo, 2008.