

JUÇARA FEITOSA

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE
COMPOSTOS LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL DE AMOSTRAS DE
ÁGUAS DA BARRAGEM DO PASSAÚNA, SITUADA NO MUNICÍPIO DE
ARAUCÁRIA, PARANÁ.**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, referente ao Estágio em Patologia Básica, na área de Microbiologia como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a Ida C. Pimentel

Co - orientadores: Prof. Carlos R. Dalke

Prof^ª. Marcia R. Beux

**CURITIBA
2002**

JUÇARA FEITOSA

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE
COMPOSTOS LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL DE AMOSTRAS DE
ÁGUAS DA BARRAGEM DO PASSAÚNA, SITUADA NO MUNICÍPIO DE
ARAUCÁRIA, PARANÁ.**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, referente ao Estágio em Patologia Básica, na área de Microbiologia como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a Ida C. Pimentel

Co - orientadores: Prof. Carlos R. Dalke

Prof^ª. Marcia R. Beux

**CURITIBA
2002**

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. A EVOLUÇÃO DA QUESTÃO DOS RESÍDUOS	4
2.2. OS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS	5
2.2.1. HISTÓRICO	5
2.2.2. ORIGEM E COMPOSIÇÃO DOS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS	7
2.2.3. RISCOS AO MEIO AMBIENTE	8
2.2.4. SOLUÇÕES PARA O PROBLEMA DOS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS	8
2.3. O QUE É BIORREMEDIAÇÃO?	9
2.3.1. COMO FUNCIONA?	10
2.3.2. TIPOS BÁSICOS DE BIORREMEDIAÇÃO	11
2.3.3. VISÃO BIOLÓGICA DA REMEDIAÇÃO	11
2.4. APLICAÇÕES DOS MICRORGANISMOS EM BIORREMEDIAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO	12
2.4.1. BACTÉRIAS ACELERAM PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE VÁRIAS SUBSTÂNCIAS	12
2.4.2. A BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO ATRAVÉS DE FUNGOS/ METABOLISMO FÚNGICO:	14
2.5. POTENCIAL MICROBIANO	15
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E EXPERIMENTOS	25
4.1.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Pseudomonas</i> sp. SUPOSTAMENTE DEGRADADORAS DE COMPOSTO LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL	25
4.1.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS SUPOSTAMENTE DEGRADADORES DE COMPOSTOS LIPIDICOS DE ORIGEM VEGETAL	26
4.2. MEIOS DE CULTURA E PROCEDIMENTOS	26

4.2.1 CALDO ASPARAGINA DE CONCENTRAÇÃO DUPLA - MEIO SELETIVO PARA <i>P. aeruginosa</i>	26
4.2.2. CALDO ACETAMIDA MEIO SELETIVO PARA <i>P. aeruginosa</i>	27
4.2.3. ÁGAR CETRIMIDE.....	27
4.2.4. CALDO ADAPTADOR.....	27
4.2.5 ÁGAR SABOURAUD.....	28
4.2.6 ÁGAR MACCONKEY	28
4.2.7 ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA).....	29
4.2.8 SOLUÇÃO DE ÁGUA PEPTONADA.....	29
4.3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL	29
4.4. ELABORAÇÃO DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Pseudomonas</i> sp. SUPOSTAMENTE DEGRADADORAS DE COMPOSTOS LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL.....	30
4.5. ELABORAÇÃO DO EXPERIMENTO DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS SUPOSTAMENTE DEGRADADORES DE COMPOSTOS LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL.....	31
4.6. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DA ANÁLISE DE ÓLEOS E GRAXAS PARA AVERIGUAÇÃO DA DEGRADAÇÃO OBTIDA	33
4.6.1 METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS.....	33
4.6.2 CÁLCULOS.....	33
4.6.3 PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES.....	33
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	35
5.1. RESULTADOS DO EXPERIMENTOS E DEGRADAÇÃO LIPÍDICA.....	35
6. CONCLUSÃO	51
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

Cresce a tendência em se estudar alguns microrganismos, em especial, gêneros de bactérias e fungos que possuam a propriedade de produção de enzimas específicas para a degradação de certos compostos. Estas podem vir a serem utilizadas como uma das técnicas de recuperação de áreas degradadas.

Seguindo tal tendência, neste trabalho, foram utilizadas amostras de pontos diferentes de águas da Barragem do Passaúna na elaboração dos experimentos. Em um deles, primeiramente isolou-se bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp., em especial *Pseudomonas aeruginosa*, onde o cultivo foi feito através de meios seletivos e confirmados por meio de provas bioquímicas. Uma vez isoladas, estas bactérias foram metabolicamente adaptadas a um caldo adaptador, utilizando um substrato lipídico (óleo de soja virgem e utilizado), pretendendo-se assim, promover o desenvolvimento destes microrganismos lipolíticos, supostamente pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. Concomitantemente a este experimento, foi executado um outro, onde cada amostra coletada foi colocada em ensaios contendo o meio específico (Caldo Adaptador) e o substrato lipídico. Neste experimento não houve a seleção prévia de microrganismos específicos. Por fim, os experimentos foram incubados a temperatura ambiente, e após dois (2) meses, foram levados para a análise e comprovação da degradação do substrato lipídico.

Como resultados constatou-se que houve a degradação do substrato lipídico (óleo de soja virgem e utilizado) apenas em relação ao experimento onde não houve a seleção prévia de microrganismos específicos.

1. INTRODUÇÃO

As atividades industriais e agrícolas cada vez mais crescentes têm gerado grandes quantidades de compostos químicos tóxicos, os quais podem contaminar o solo e a água (SERAFINI, BARROS e AZEVEDO, 2001).

Em literaturas mais recentes (DHARMSTHI e KUHASUNTISUK, 1998) é possível constatar a preocupação, bem como a tendência que toma destaque dentro das linhas de pesquisas, envolvendo os ramos da Microbiologia Aplicada as novas técnicas desenvolvidas na área de Biotecnologia - técnicas estas, como de tratamento, biorremediação e biotransformação de contaminantes, têm contribuído e muito na produção de compostos para a recuperação e preservação ambiental - a biodegradação e a biotransformação são algumas das alternativas viáveis para diminuição da concentração de xenobiontes no ambiente.

Por meio destas técnicas, organismos vivos isolados podem remover os poluentes podendo produzir também moléculas com menor toxicidade.

Atualmente, vemos uma crescente atuação dentro das grandes universidades em pesquisas que se referem no sentido de expandir os conhecimentos sobre os processos microbianos visando a um melhor aproveitamento de suas atividades degradativas na manutenção da qualidade ambiental.

Encontramos hoje, dentro da literatura, a evidência de que alguns microrganismos, em especial, alguns gêneros de bactérias e fungos possuem a propriedade de produção de enzimas específicas para a degradação de certos compostos e que estas podem vir a serem utilizadas como uma das técnicas de biorremediação, ou seja, como uma alternativa de recuperação de áreas degradadas.

Seguindo tal tendência, neste trabalho, procurou-se comprovar a constatação da presença e desenvolvimento de microrganismos degradadores de compostos lipídicos no ambiente.

Para tal, utilizou-se amostras de águas da Barragem do Passaúna (situada no município de Araucária – Pr), com o objetivo de promover o isolamento e cultivo de microrganismos ditos degradadores de compostos lipídicos, evidenciando sua propriedade lipolítica, utilizando para tal, técnicas

de cultivos e análises laboratoriais simplificadas, caracterizando assim, o experimento o mais próximo do ambiente natural, confirmando assim, a importância em se estudar cada vez mais estes microrganismos, servindo como alternativa na recuperação de áreas degradadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A EVOLUÇÃO DA QUESTÃO DOS RESÍDUOS

Segundo LAIGO (1994), citado em Aplicações dos Microrganismos em Biorremediação e Biotransformação, a revolução industrial trouxe consigo o desenvolvimento e a manutenção de estruturas que fossem capazes de suportar padrões de consumo e o bem estar social impostos pelo capitalismo. A ignorância a respeito das conseqüências ambientais se deu até o limite em que os efeitos começaram a se tornar visíveis. A degradação ambiental, inicialmente concentrada próximo ao seu agente causador, passou a ter uma abrangência maior. A consciência sobre a incerteza e irreversibilidade dos impactos, não foi suficiente para eliminá-los, mas foi capaz de sinalizar os limites antes que as conseqüências fossem irreversíveis e catastróficas.

Na medida em que ocorreu a evolução da atividade produtiva, diversificando-se cada vez mais as tecnologias e os produtos, observou-se o aumento proporcional de resíduos industriais e domésticos. Estes, além de terem sido gerados em quantidades nunca vistas, surgiram nas mais diversas formas afetando os recursos naturais, e a saúde e a qualidade de vida do homem.

Por outro lado, houve também uma evolução na solução para a geração dos resíduos. LAIGO, 1994 relata que até a década de 60, os elementos poluentes frutos do processamento industrial e domésticos eram despejados diretamente no meio ambiente, o qual julgava-se capaz de absorver toda e qualquer forma de resíduo.

Políticas internas contra a poluição começaram a tomar forma principalmente diante de pressões de grupos ambientais ativistas e da população informada sobre os danos que as emissões poluentes eram capazes de causar à saúde. Estas pressões se traduziram em regulamentações que tinham como objetivo punir as empresas que não cumpriam as normas de proteção e conservação.

Em resposta, para acomodar as pressões sem desassociar o consumo à qualidade de vida, empresas procuraram dar uma solução para os resíduos no

momento de seu despejo no meio ambiente. Esta fase caracterizou-se pelo tratamento dos resíduos

Assim, instalou-se equipamentos de controle de poluição nas saídas das emissões, onde era realizado o tratamento adequado: os efluentes líquidos passavam por uma estação de tratamento, as emissões gasosas eram filtradas e os resíduos sólidos eram tratados para depois serem dispostos em local apropriado (LAIGO, 1994).

Entretanto, ainda se verificava a produção de outros rejeitos que eram subprodutos do tratamento dos resíduos, tal como o lodo proveniente das estações de tratamento, partículas sólidas retiradas dos filtros e água de lavagem destes filtros. Havia também os cuidados especiais a serem dispensados aos aterros sanitários, pois o chorume gerado pelos resíduos sólidos lá dispostos poderiam ser absorvido pelas águas subterrâneas, e a sua decomposição poderia liberar gases tóxicos na atmosfera. Enfim, o problema dos resíduos continuava existindo só que se manifestava de outra forma. E os custos de operacionalização e manutenção dos processos de tratamento ainda eram muito altos.

2.2. OS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS

2.2.1. HISTÓRICO

Considerar a água como essencial ao setor produtivo é uma prática tão antiga quanto à própria revolução industrial. Na época, as fábricas procuravam estabelecer-se próximas à rios que permitissem a captação da água e posterior despejos dos efluentes gerados. Os efeitos da poluição se fizeram sentir tão rapidamente quanto se desenvolvia e multiplicava-se o número de unidades produtivas.

Na Inglaterra, berço da revolução industrial, o trecho do rio Tâmisa que vai de Londres até seu estuário, chegou ao ponto crítico no final da década de 50, pois nele eram despejados os esgotos domiciliares da cidade e também os resíduos industriais. Para conter a crise, foi instalada em 1960 uma estação de tratamento de esgotos, e surgiram leis para controlar rigorosamente o lançamento de efluentes líquidos vindos das indústrias.

A poluição do rio Reno, o mais importante rio do continente europeu, chegou até a criar problemas internacionais, pois a Holanda acusava os países situados a montante (Suíça, Áustria, França, Luxemburgo e Alemanha) de serem responsáveis pelo grande volume de despejos provenientes de resíduos industriais e esgotos domiciliares.

Em São Paulo, têm-se o rio Tietê, que há décadas vêm sofrendo com a descarga dos efluentes industriais, os esgotos urbanos e as águas do rio Tamanduateí que atravessa uma região altamente industrializada conhecida como ABC (Santo André, São Bernardo e São Caetano) . Há poucos anos atrás, o rio não oferecia condições a vida aquática, pois predominava uma grande concentração de carga orgânica, cuja decomposição retirava todo o oxigênio necessário à vida, além do desconforto em se ver colchões de espuma na superfícies dos rios causadas pela ação dos detergentes não degradáveis que em sua composição química indestrutível permanecia presente nas águas dos rios durante todo o percurso.

Assim como ocorreu na Europa, criou-se em São Paulo uma legislação apropriada para o controle da poluição nos corpos hídricos, procurando forçar as indústrias a instalarem estações de tratamento de efluentes (ETEs) antes de despejá-los nos rios. Em 1976 foi criado um sistema de licenciamento para a instalação e implantação de indústrias potencialmente poluidoras, ou seja, a indústria só conseguiria se instalar ou obter licença de ampliação ou alteração com a autorização da CETESB, que é o órgão de controle e fiscalização ambiental de São Paulo.

A situação crítica ocorrida tanto no Tâmsa quanto no Tietê, embora em épocas diferentes, reflete a realidade ocorrida com as indústrias frente ao questionamento sobre que postura assumir diante do incontestável dano ambiental causado pelos despejos diretos de seus efluentes nos rios. A ocasião em que a CETESB começou a agir restringindo a atividade das indústrias potencialmente poluidoras através da negação de sua licença de funcionamento para obrigá-las a instalar tratamentos adequados para seus efluentes, caracteriza perfeitamente a fase de tratamento de resíduos citada no item anterior. As empresas naquele momento queriam tão somente livrar-se de multas e obrigações junto aos órgãos de controle ambiental, e isso na época era um obstáculo ao bom funcionamento da indústria.

Para evoluir na análise do contexto, tornar-se oportuno caracterizar os efluentes industriais, a fim de identificar sua origem e composição, e seu impacto ambiental.

2.2.2. ORIGEM E COMPOSIÇÃO DOS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS

A água é indispensável para a maioria das indústrias, bem como para o consumo doméstico. Na indústria ela é utilizada nos processos de lavagem, na transferência de calor (sistemas de aquecimento e de resfriamento) e como matéria-prima para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e principalmente na fabricação de bebidas.

O resultado deste consumo é a água misturada a substâncias inorgânicas nocivas ou não, ou apresentando alto teor de carga orgânica (com DBO elevada), principal causa de morte dos rios, já que o oxigênio necessário à vida aquática é utilizado para decompor a carga orgânica.

De uma forma geral, os efluentes gerados pela atividade industrial provém de duas fontes: esgoto sanitário e dos processos produtivos.

i) Provenientes de esgoto sanitário

São constituídos de compostos provenientes de banheiros, cozinhas, áreas de lavagem, etc. Na maioria das vezes são biodegradáveis e em outras podem conter detergentes, na sua maioria constituídos de Alkyl Benzeno sulfonado (ABS), que são indestrutíveis naturalmente e continuam nos efluentes acompanhando-os até o corpo hídrico mesmo que tenha passado por uma estação de tratamento.

ii) Provenientes de processos industriais

São gerados através das várias etapas da transformação industrial. Os efluentes podem conter poluentes tais como: metais pesados, óleos, graxas, sulfetos, fenóis, cianetos, fluoretos e produtos químicos orgânicos em geral (VALLE, 1994) citado em Aplicações dos Microrganismos em Biorremediação e Biotransformação.

2.2.3. RISCOS AO MEIO AMBIENTE

O excesso de carga orgânica nos efluentes despejados diretamente nos rios pode levar à morte por asfixia nos peixes. Os efluentes industriais que mais preocupam são aqueles provenientes de indústrias "naturais", tais como indústrias de papel celulose ou indústrias agroalimentares.

As bactérias degradam a matéria orgânica fazendo uma despoluição natural, entretanto o excesso de "comida" reduzirá a quantidade de oxigênio necessária à sobrevivência de outras espécies aquáticas.

Os elementos tóxicos contidos nos efluentes industriais podem causar morte direta da vida aquática. Segundo VERNIER (1994), citado em Aplicações dos Microrganismos em Biorremediação e Biotransformação, a indústria química é a maior responsável pela poluição por elementos tóxicos (mais de 50%) sendo seguida pela indústria de metais (mais de 35%).

Outros elementos como os metais pesados, tais como cobre, zinco, chumbo e mercúrio chegam a atingir indiretamente os seres vivos e produzir efeitos cumulativos. Esse fenômeno é denominado de bioacumulação e afeta os vegetais, pequenos animais, peixes e mamíferos, e conseqüentemente em nível mais baixo o homem que os utiliza como alimento. Por exemplo, a ingestão de peixes contendo alta concentração de mercúrio pode causar distúrbios no sistema nervoso.

Os efluentes industriais em grande parte são águas de resfriamento que são despejados em temperatura elevada. Segundo ainda VERNIER, esse aquecimento das águas pode ter duas conseqüências:

- um reflexo direto sobre a vida de certas espécies vegetais e animais;
- uma atividade bacteriana mais intensa e, portanto um maior consumo de oxigênio.

2.2.4. SOLUÇÕES PARA O PROBLEMA DOS EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS

As soluções para a problemática dos efluentes líquidos têm evoluído tal qual todos os tipos de resíduos industriais e domésticos. A fase do controle da

poluição e tratamento dos efluentes é observada no surgimento das leis brasileiras de controle da poluição, cuja atenção e aplicação, se deu principalmente devido ao estado de degradação que se encontravam os rios que abasteciam grandes centros industriais.

Tratar os efluentes significa reduzir seu potencial poluidor através de processos físicos, químicos ou biológicos, adaptando-os aos padrões determinados pela legislação de controle da poluição.

Nos processos físicos se utilizam grades ou caixas de areia para remover materiais grosseiros em suspensão, sólidos flutuantes, areias e outros detritos minerais pesados, podendo depois sofrer processos químicos para aglutinação das partículas e sólidos finos sedimentáveis para facilitar sua remoção.

Os tratamentos biológicos utilizam as bactérias e outros microrganismos capazes de digerirem a carga orgânica presente nos efluentes. Esses microrganismos podem ser desenvolvidos e cultivados em laboratórios, reproduzindo e posteriormente podem ser adicionados aos efluentes. As lagoas de estabilização e aeração e as instalações que empregam lodos ativados são exemplos de tratamento biológico para efluentes líquidos (VALLE, 1994).

As indústrias podem tratar seus efluentes na própria planta, em outro local onde se tenha interesse de aproveitar os rejeitos dos efluentes ou terceirizar os serviços de tratamento. É quando então, vemos a “Microbiologia” sendo aplicada no desenvolvimento de novas técnicas na área de Biotecnologia - técnicas estas, como de tratamento, biorremediação e biotransformação de contaminantes contribuindo na recuperação e preservação ambiental.

2.3. BIORREMEDIAÇÃO

De forma simplificada, SERAFINI et al., 2001 descreve que a Biorremediação consiste no uso de microrganismos naturais ou geneticamente modificados (por técnicas da Biotecnologia) como bactérias, fungos e leveduras para degradar substâncias, muitas vezes perigosas para os seres humanos, transformando-as em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade, principalmente dióxido de carbono e água. Os microrganismos, da mesma forma que os seres humanos, comem e digerem substâncias orgânicas, das quais obtêm nutrientes e energia. Depois de degradar os contaminantes

(combustíveis, solventes, petróleo, etc.), a população de microrganismos volta aos níveis normais, uma vez que se esgota sua fonte de alimentos.

2.3.1. FUNCIONAMENTO DA BIORREMEDIAÇÃO

Os microrganismos devem estar ativos e saudáveis para poderem desempenhar sua tarefa de remediação. As medidas biocorretivas visam aumentar a população microbiana criando condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento. A medida biocorretiva a ser adotada dependerá de vários fatores, dentre eles os tipos de microrganismos presentes, as condições do local como pH, água no solo, quantidade de nitrogênio, potássio, fosfato, a quantidade e a toxicidade dos contaminantes. Diferentes microrganismos degradam diferentes substâncias e alguns sobrevivem em condições extremamente adversas.

Assim como qualquer outro ser vivo, os microrganismos, necessitam de nutrientes (nitrogênio, fosfato e outros minerais), carbono e energia para sobreviverem. Estes microrganismos utilizam o carbono em várias formas para obter energia e matéria prima para seu crescimento, e é justamente esta capacidade que os tornam especiais, pois podem processar os hidrocarbonetos para este fim. Muitas espécies de bactérias do solo por exemplo conseguem metabolizar hidrocarbonetos derivados do petróleo reduzindo a dióxido de carbono, água e outros elementos inertes.

Outro aspecto importante a ser afirmado é que as medidas biocorretivas podem ser aplicadas em condições aeróbicas ou anaeróbicas. Em condições aeróbicas, os microrganismos se desenvolvem usando o oxigênio que, em quantidade suficiente, transforma grande quantidade de contaminantes em dióxido de carbono e água. Em condições anaeróbicas, a atividade biológica acontece na ausência de oxigênio, de tal forma que os microrganismos decompõem os compostos orgânicos do solo para liberar a energia que necessitam. Este processo de degradação é muito mais lento que o aeróbico.

As medidas biocorretivas podem ser usadas para descontaminação não tão somente da água mas também do solo.

O grau de Biodegradação depende principalmente da toxicidade, da concentração inicial de contaminantes, das propriedades do solo e águas

contaminados e do tipo de tratamento aplicado. Os contaminantes passíveis de Biodegradação são compostos orgânicos não halogenados, voláteis e semi-voláteis, petróleo bruto, combustíveis e solventes. A eficácia das medidas Biocorretivas é limitada em locais com alta concentração de metais, compostos orgânicos altamente clorados e sais inorgânicos, pois esses compostos são bastante tóxicos para os microrganismos.

2.3.2. TIPOS BÁSICOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Há dois A "Biostimulation" que fornece nutrientes às populações de microrganismos, aumentando sua população promovendo o crescimento e conseqüentemente o aumento da atividade metabólica na degradação de contaminantes, e a "Bioaugmentation" introduz misturas específicas de microrganismos em um ambiente contaminado ou em um biorreator para iniciar o processo da biorremediação.

Os microrganismos existentes em um determinado local aumentam em quantidade quando uma fonte de alimento (contaminante) está presente. Assim que o contaminante é degradado, a população declina naturalmente alcançando o nível de estabilidade. Os resíduos do tratamento biológico são geralmente produtos inertes. Em vez dos contaminantes serem meramente transferidos de um meio ambiente para outro, (por exemplo, de terra para água) este processo destrói os produtos químicos alvos.

2.3.3. VISÃO BIOLÓGICA DA REMEDIAÇÃO:

Experimentos de tratamento biológico vem sendo praticado por décadas. O uso de microrganismos para degradar hidrocarbonetos foi revisto em 1946 por CLAUDE ZOBELL e tiveram bons resultados "in vitro" desde então, na pratica só recentemente conseguiu-se determinar técnicas eficientes em larga escala.

O principal problema da biorremediação é a determinação de qual microrganismos utilizar para cada caso. A Biofiltração funciona de maneira semelhante a anterior, com a diferença de que a ventilação não é forçada, os fungos são "semeados" na região degradada e as trocas gasosas são feitas

por galerias escavadas no solo. A compostagem é um exemplo de uma prática secular, que consiste na mistura de madeira em decomposição com o solo, onde os fungos presentes se misturam com o solo e se proliferam também degradando os hidrocarbonetos no solo.

2.4. APLICAÇÕES DOS MICRORGANISMOS EM BIORREMEDIAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO

2.4.1. BACTÉRIAS ACELERAM PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE VÁRIAS SUBSTÂNCIAS

Os danos ambientais provocados pelos agrotóxicos não se restringem à contaminação de alimentos. A biodegradação de poluentes orgânicos no solo é um processo que, para algumas substâncias, pode durar anos. O DDT, por exemplo, leva 21 anos para se decompor. Uma alternativa para acelerar esse fenômeno natural é a utilização de microrganismos.

No Brasil, terceiro maior consumidor de pesticidas do planeta, o uso de bactérias e fungos para biorremediar áreas contaminadas é uma atitude recente. Uma das poucas instituições que pesquisam nessa área é a Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna (SP). Em seis anos de estudos, foram obtidos resultados satisfatórios com o emprego de bactérias *Acinetobacter* sp. como degradadora de herbicidas. Presentes no solo, essas bactérias se alimentam dos pesticidas que vão se depositando, multiplicadas em laboratório e devolvidas à terra sob a forma de grânulos compostos de argila e alginato (polímero usado para dar liga na mistura), as bactérias aceleram o processo natural de Biodegradação.

O Diuron é um exemplo de herbicida que pode ter sua vida útil reduzida com o composto da bactéria. "Usado no controle de plantas daninhas nas culturas de citros, cana-de-açúcar e milho, o Diuron, pelos métodos naturais demora em média 90 dias para se degradar. Em solo tratado, esse tempo de biodegradação é reduzido pela metade", outros herbicidas como o Propanil (usado no cultivo do arroz) e a Atrásina (culturas diversas) também têm sua vida útil reduzida pela aplicação de microrganismos no solo.

Para os fungicidas há microrganismos que degradam cerca de 60% do produto absorvido no solo. Um deles, o Benomil, é utilizado contra a podridão

do morango, maçã e uva e para controle de fungos patogênicos que persistem durante meses no solo. Para que esse fungicida não cause mutações nos fungos biodegradáveis, foram isolados fungos e bactérias capazes de degradar o produto em moléculas menos tóxicas, permitindo uma limpeza da área contaminada.

As principais vantagens em se utilizar microrganismos é que eles proporcionam a mineralização, desaparecimento completo do poluente, sem deixar resíduos, possibilitando a rotação de culturas em uma mesma área. Caso o agricultor cultive a mesma lavoura durante anos seguidos, sempre aplicando herbicidas, mais tarde poderá haver dificuldade no cultivo de outras espécies em decorrência dos resíduos desses agrotóxicos. Acelerando a biodegradação com a dispersão do composto, o solo fica apto a receber outras culturas em menos tempo.

Com o tratamento do terreno, os pesquisadores esperam evitar que se verifique com novas áreas o que ocorreu no passado com lavouras tratadas com agrotóxicos hoje proibidos, que já se incorporaram ao solo e tornaram-se indisponíveis para o ataque de microrganismos. Alguns desses poluentes proibidos como o DDT e o dieldrin constam da lista dos "12 sujos" abolidos em recente convenção em Estocolmo, Suécia.

Em matéria de descontaminação, enfim, e limpeza em geral os microrganismos parecem estar ganhando um pouco mais de terreno a cada dia.

Como podemos perceber, estes microrganismos, vem sendo utilizados no tratamento de águas, na transformação do lixo doméstico em metano na compostagem de restos orgânicos e recentemente também começaram a serem utilizados para limpar os ônibus; com um produto em pó contendo sais minerais e bactérias liofilizadas em um suporte vegetal, a Companhia Lionesa de Transportes coletivos (SLTC) procedeu a limpeza das "sanfonas" de seus ônibus articulados e pretendia aplicar o mesmo método para limpar as escadas rolantes do metrô, segundo um artigo publicado na Revista Technologies' France n.º 27, 1998 em sobre Meio Ambiente e novas tecnologias. Ainda no mesmo artigo, o autor JEAN CLAUDE ROUX, 1998 comenta sobre o uso, ainda na França, de bactérias para promoção da limpeza do solo de um terreno industrial da "Gaz de France", uma companhia de gás desativada, onde fora

construído um dos estádios da França a serem utilizados na realização da Copa Mundial de Futebol em 1998. Foram utilizados microrganismos afim de eliminar os hidrocarbonetos existentes no solo.

No mesmo artigo, o autor faz o comentário, sobre o uso de microrganismos como medida de biorremediação de contaminantes do meio ambiente escreve sobre o estudo realizado pela equipe de pesquisadores do Departamento de Biologia Molecular (CEA, Grenoble) onde foram utilizados alguns fungos filamentosos como *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Penicillium* na capturação de metais pesados contidos no solo, e por fim, relata sobre a descoberta pelos mesmos pesquisadores de uma “bactéria surpreendente” a *Pseudomonas halodenitrificans*, apresentando alta capacidade de degradar mais de 40 Kg diários de nitratos / m³.

2.4.2. A BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO ATRAVÉS DE FUNGOS/METABOLISMO FÚNGICO:

Os metabólitos secundários são moléculas sem funções óbvias no organismo que as produz. Alguns destes metabólitos fúngicos são benéficos os antibióticos e outros prejudiciais como as micotoxinas carcinogênicas.

Uma área de pesquisa fascinante envolve aliviar o impacto prejudicial das micotoxinas na saúde e na longevidade dos seres humanos e dos animais. Mais de 100 micotoxinas foram descobertas e muitas delas contaminam os alimentos. Investigando a regulação da biossíntese de micotoxinas, podemos determinar fatores que influenciam a extensão da contaminação.

Algumas destas micotoxinas podem reverter em benefícios para os seres humanos, metabolizando ou desintoxicando poluentes ambientais. Alguns fungos produzem enzimas capazes de degradar compostos orgânicos prejudiciais tais como o DDT e o PCP. Além disto, sua morfologia dá aos fungos vantagens sobre outros microrganismos.

Por muitos anos os fungos da "podridão branca" vem sendo avaliados para a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH). Mais tarde pesquisas demonstraram que as enzimas degradadoras de lignina, MnP e laccase, poderiam diretamente realizar a oxidação de compostos de antraceno e de benzo[a]pyrene do PAH. Para melhorar a taxa de PAH-oxidase

foi acrescentado uma fonte adicional de peróxido de hidrogênio (por exemplo adicionando a oxidase de glicose)

O sistema de enzimas da degradação da lignina dos fungos da "podridão branca" atua extracelularmente e raramente não específica. As peroxidases e o peróxido de hidrogênio, secretado pelos fungos, catalisa reações dos radicais livres, tendo resultados na despolimerização e degradação da lignina.

A lista crescente dos produtos químicos que os fungos da "podridão branca" são capazes de degradar inclui muitos pesticidas, hidrocarbonetos poliaromáticos, PCBs e outros compostos aromáticos halogenados, TNT e outros explosivos nitro, pentaclorofenol, e outros compostos tóxicos.

2.5. POTENCIAL MICROBIANO

Os microrganismos nos sistemas biológicos de tratamento de rejeitos podem atuar de maneira particular, ou seja, realizando reações de transformação de certas moléculas por mecanismos específicos de seu metabolismo.

Assim, bioreatores podem ser operados de modo a selecionar a atividade de uma bactéria em particular. Alguns exemplos são os sistemas biológicos que favorecem prioritariamente a nitrificação, ou aqueles que conduzem a desnitrificação. A composição dos resíduos poluentes, somada às modificações na operação ou construção dos bioreatores constituem a base para a seleção do microrganismo em questão.

Outro importante exemplo nesse sentido, é o sistema de Lodos Ativados modificado, operado para a remoção de nutrientes. Os esgotos domésticos, por exemplo, possuem quantidades em excesso de fósforo e nitrogênio, que nos processos biológicos de tratamento não são consumidas pelo crescimento microbiano. Portanto, o residual não utilizado pode ser lançado diretamente nos corpos d'água receptores, ocasionando eutrofização do meio, toxicidade pela amônia e prejuízos aos sistemas de abastecimento. O sistema desenhado para a remoção de nutrientes seleciona em bioreatores, seqüencialmente operados sob aerobiose e anaerobiose, bactérias capazes de remover fosfatos do meio, bem como promove a nitrificação e desnitrificação. Os compostos poluentes sintéticos possuem estruturas bastante complexas e desconhecidas para o

metabolismo bacteriano. A biodegradação de algumas moléculas orgânicas xenobióticas pode ocorrer pelos processos biológicos aeróbios e anaeróbios, e sua completa estabilização depende das velocidades das reações realizadas pelos microrganismos. Este potencial microbiano tem sido ilustrado pela capacidade de espécies bacterianas, presentes nos bioreatores aeróbios e anaeróbios, em degradar detergentes como os alquilbenzenos sulfonados lineares (LAS) e ramificados (BAS). O passo limitante da degradação microbiana desses detergentes é a separação do radical alquila do anel benzeno sulfonado, pois a reação de degradação dos ácidos graxos resultantes ocorre pela via microbiana comum de β -oxidação. O anel aromático sulfonado é degradado posteriormente, a dióxido de carbono, água e sulfato).

Mais recentemente, a atenção de vários pesquisadores no mundo está voltada para a problemática de compostos xenobióticos altamente tóxicos ao meio ambiente.

A atividade combinada de bactérias nos biotratamentos, através de reatores aeróbios e anaeróbios alternados, resulta na estabilização de poluentes aromáticos halogenados e nitroaromáticos. Os microrganismos responsáveis pela biodegradação de tais compostos podem ser selecionados de diferentes fontes naturais, ou dos tanques de aeração e biodigestão anaeróbia. Esta ação microbiana é de extrema importância para as tecnologias da biorremediação. A grande questão em discussão está em como os microrganismos se adaptam à utilização de moléculas xenobióticas, afim de suprir suas necessidades de carbono e energia. Existem grandes evidências de que os compostos halogenados não são incomuns a vida microbiana. Foram identificados cerca de 1.500 organohalogenados naturais, e alguns cloroaromáticos são produzidos por fungos. A adaptação das bactérias a esses poluentes ambientais tem sido verificada em vários estudos sobre as comunidades microbianas, que após longos períodos de incubação, são capazes de degradar compostos como as bifenilas policloradas (PCBs).

Autores como VAN DER MEER et al. (1994) preconizaram duas possibilidades para a adaptação dos microrganismos às moléculas sintéticas: - existência de enzimas nas células microbianas que reconhecem a estrutura do composto como substrato, conduzindo a uma "adaptação bioquímica" celular; - alteração dos sistemas enzimáticos, pelo estímulo na expressão de novos

genes necessários a conversão do composto, conduzindo a uma "adaptação genética" celular.

As vantagens da biotransformação dos compostos aromáticos pelas células está nos mecanismos de produção de energia celular, uma vez que a variação de energia livre disponível durante a oxidação de certos aromáticos é alta. Alguns trabalhos sugerem que as reações microbianas favorecem a destoxificação do próprio meio pelos microrganismos. É certo contudo, que a disponibilidade energética evidencia "o interesse real das células" na utilização de um aromático poluente.

A existência de materiais poluentes antropogênicos tem favorecido o desenvolvimento de tecnologias que adotam biorreatores com células microbianas especializadas na degradação eficiente de um composto. Além disso, estimula o uso da biologia molecular na engenharia de novas células com o objetivo de alterar as propriedades enzimáticas celulares, modificar os mecanismos regulatórios e reunir em um único organismo os sistemas enzimáticos de interesse, encontrados em espécies microbianas filogeneticamente distintas. Um exemplo descrito por GLAZER & NIKAIDO (1995), é a bactéria *Pseudomonas putida* modificada, e assim, hábil na degradação de uma gama de alquilbenzoatos.

Dentro das diversas enzimas que são produzidas por bactérias, fungos e leveduras em decorrência de seu metabolismo, a literatura dá um maior destaque as bactérias que em particular possuem a propriedade de produção da enzima "lipase".

Em aspectos gerais, as lipases, fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, que catalisam a quebra de ligações ésteres de acil gliceróis. Elas não requerem cofatores, são de baixo custo, regioespecíficas, e atuam em uma larga faixa de pH e, além de efetuar reações de hidrólise, podem também exercer atividade catalítica (LENNIGNER, 1998).

As lipases são dotadas de uma especificidade pelo substrato que supera todas as outras enzimas conhecidas. Isso lhes confere uma aplicação sem fronteiras, elas podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnóstico médico, síntese de compostos opticamente ativos, resolução de racematos, produção de aromas e

fragrâncias, modificações de gorduras e tratamentos de couros (BASHERR, 1995; BON e PEREIRA, 1999 e FABER, 1997).

Considerando-se as transformações de óleos e gorduras em derivados ou matérias-primas industriais, o potencial de aplicações de enzimas nesse seguimento ainda não está suficientemente difundido (BON e PEREIRA, 1999). Segundo alguns trabalhos, que fazem parte da literatura, as lipases têm sido empregadas em processos de extração de óleos, melhoramentos das propriedades físicas e nutricionais de gorduras por interesterificação (MACRAE, 1983; PECNIK, 1992; KONISHI, 1995, HAYES, 1996, GLOSH, 1997; FACIOLI, 1998), limpezas de tripas em abatedouros bovinos (BURIN, 1994), hidrólise e degomagem de óleos vegetais na indústria (BON e PEREIRA, 1999), bem como também na obtenção de biocombustíveis (biocombustíveis alternativos para o óleo diesel, provenientes de óleos vegetais brutos).

Este estudo foi realizado por pesquisadores da Universidade do Estado de Santa Catarina (NASCIMENTO *et al*, 1999) onde as lipases foram utilizadas para obtenção de biocombustível de melhor rendimento. O biocombustível alternativo foi obtido através de óleos vegetais brutos. Apesar de favorável energeticamente, o uso direto desse produto em motores apresentou-se problemático devido à sua alta viscosidade (11 a 17 vezes maior que a do óleo diesel) e baixa volatilidade, o que impedia sua queima completamente, formando depósitos nos bicos injetores dos motores, uma solução encontrada foi então, a adição ao combustível de lipases obtidas através do metabolismo microbiano, aumentando em muito o rendimento do mesmo. Em um trabalho semelhante, citam os pesquisadores da Universidade de Santa Catarina, a ação da enzima lipase fora investigada por MITTELBAACH (1990), que acabou utilizando três lipases obtidas de diferentes fontes, onde constatou que os melhores rendimentos foram obtidos com a lipase provenientes do metabolismo bacteriano – *Pseudomonas* sp. Baseados nesta informação então, obteve-se o combustível de melhor rendimento utilizando lipases produzidas por várias espécies de bactérias *Pseudomonas* sp (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*), associada as lipases produzidas por *Mucor mirhei* e *Candida* sp, sendo este último um fungo.

Não somente o gênero *Candida* sp., mas também outros fungos possuem a propriedade de secretar a enzima lipase, como por exemplo: *Aspergillus niger* e *Penicillium roquefortii* que produzem ao mesmo tempo lipases intra e extracelulares segundo CRUZ, 1985.

Hoje vê-se uma intensa gama de pesquisas e publicações realizadas com diversas espécies de *Pseudomonas*, entre elas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* entre outras, sendo isoladas do meio ambiente (em geral provindas de águas de esgoto), comprovando em laboratório a bioprodução de enzimas lipolíticas (lipases) e substâncias biosurfactantes que possam ser empregadas como uma estratégia inovadora na recuperação de áreas e águas poluídas .

A família Pseudomonadaceae, segundo KONEMANN, 2001, caracterizam-se por apresentar bacilos Gram-negativos não-fermentadores, com forma reta ou ligeiramente curvos, aeróbicos estritos, e em sua grande maioria apresentando cepas com motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, utilizam a glicose entre outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo oxidase-positiva. Dentro dos diversos Gêneros constituintes desta família, temos em especial, o Gênero *Pseudomonas*, entre os quais se encontram as espécies *P. aeruginosa*, *fluorescens* e *putida*. Todas essas espécies caracterizam –se pela produção de um pigmento hidrossolúvel, a pioverdina, que aparece como uma fluorescência branca a azul-esverdeada sob luz ultravioleta de onda longa (400nm). Embora as 3 espécies sejam produtoras deste pigmento, apenas a espécie *P. aeruginosa* é a capaz de produzir o característico azul hidrossolúvel, a Piocianina. A *P. aeruginosa* em especial é o pseudomonídeo de maior interesse médico, e mais freqüentemente isolado em amostras clínicas, por apresentar o caracter patogênico, entretanto neste trabalho, preocupou-se apenas em estudar a *P. aeruginosa* e demais espécies sob o caracter remediativo na produção de enzimas e seu emprego no tratamento de poluentes no meio ambiente.

Em TAKASHIMA et al., 1998, tem-se a obtenção de uma substância biosurfactante provinda do metabolismo microbiano sendo utilizada como uma das estratégias mais inovadoras no tratamento de resíduos lipídicos. Neste artigo, o autor afirma que a bactéria *Pseudomonas putida* BH, fora capaz de produzir uma substância emulsificante de “gorduras”, utilizando querosene

como objeto para a degradação. Constatou ainda, que a ação desta substância surfactante é capaz de atacar vários hidrocarbonetos em especial os que possuem a cadeia aromática. Descreve que extraída da bactéria com a utilização de componentes químicos (o componente químico citado seria o hidrocarboneto solvente – benzeno), e posteriormente adicionado a 50 mg/L em um meio rico em querosene obtêm-se quase que total degradação da querosene. TAKASHIMA, termina seu trabalho sugerindo a aplicação desta substância como uma técnica a ser utilizada na biorremediação de compostos lipídicos.

HEALY et. al. 1996, também constaram em seus experimentos a produção de uma substância surfactante produzida agora pela *Pseudomonas fluorescens*, este descreve que uma vez adicionada a um meio contendo óleo de oliva virgem, tal substância produzida serviu como uma espécie de detergente, e que tal substância vem sendo então largamente utilizada principalmente pela indústria de cosméticos.

BRAHIMI-HORN et. al., 1991, confirma a atividade lipolítica que os microrganismos possuem. De um “pool” de microrganismos, o pesquisador conseguiu isolar 2 microrganismos em especial, dos quais pode constatar a produção da ação lipolítica, confirma que *P. aeruginosa* e *Acinetobacter calcoaceticus*, foram capazes de produzir enzimas lipolíticas, de origem extracelular, que hidrolizaram vários compostos lipídicos, dentre eles cita na sua literatura: p-nitropentil palmitato, α -naftil acetato, α -naftil palmitato, colesterol etc.

Em um estudo promovido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela Universidade de Campinas, em São Paulo, MENEZES e BARANAUSKAS (1995), descrevem em um artigo que Cento e sessenta linhagens de microrganismos foram isoladas de diversos produtos alimentícios de origem animal, estes quando cultivados em placas com meios de cultura contendo colesterol, exibiram a formação de um halo transparente demonstrando a capacidade de degradar o composto.

Em seu trabalho, MENEZES e BARANAUSKAS (1995), cita que compostos intermediários provenientes da biotransformação do colesterol por bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. foram identificados, explicando assim, o fato de algumas linhagens não terem formados os compostos originários da

bioconversão do colesterol, mas sim, compostos intermediários, porém, produzidos em menor concentração para serem detectados na metodologia empregado no experimento.

Encontramos ainda, na literatura, a descrição de trabalhos envolvendo experimentos onde há o uso de enzimas lipolíticas provenientes do metabolismo microbiano no tratamento de águas de esgoto domésticos.

DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998, conseguiram isolar de uma amostra de água de esgoto doméstico (restaurante), uma cepa bacteriana da *Pseudomonas aeruginosa* LP602, da qual extraiu-se uma enzima a Lipase. A Enzima, segundo os autores, mostrou atividade lipolítica máxima em pH 8.0 em temperatura de 55°C, porém essa atividade não apresentou-se de forma estável. A enzima, fora sensível ao EDTA, e a muitos outros íons testados, com exceção ao ZN^{+2} . Descrevem ainda, a metodologia usada no experimentos, onde utilizaram recursos como: meios de culturas enriquecidos (a fórmula do meio adequada para a produção da lipase foi de MMP contendo 6,25% de soro como uma fonte de carbono, 1% de óleo de soja como indutor e 0,5% de suplemento de extrato de fermento, a cultura fora também alimentada com glucose em uma concentração final de 0,1%), além do uso de temperaturas específicas oscilando entre 30 à 55°C, o uso de Shakers e de diferentes pontos de pHs. Dentre os resultados obtidos, podemos citar que: a atividade lipolítica mostrou-se diferenciada quando testada em diferentes pontos de pHs, onde os pesquisadores constataram que o melhor resultado obtido foi em pH 8.0, onde a eficiência da atividade lipolítica chegou a cerca de 90%, observaram também que em pHs menores como 7.0 e 5.0 a eficiência decaí, respectivamente para 75% e 50%, e concluíram que em pHs muito altos, como 11 e 13 a atividade chega a sua eficiência mínima, apresentando apenas 35% da sua propriedade lipolítica.

No mesmo experimento ainda, expuseram a enzima a diferentes condições de temperatura: o descoberto foi que a maior eficácia da propriedade lipolítica seria alcançada a temperatura de 55°C (90%), porém de forma instável, foram testados ainda as temperaturas de 45 e 37°C, onde obtiveram se os seguintes resultados respectivamente, 60% e 50% de eficácia. Como informações adicionais os autores complementam o estudo,

descrevendo que a “enzima ativa” fora testada, em vários tipos de lipídios, apresentando um melhor resultado quando usada em manteiga derretida (composto lipídico de origem animal). Subseqüentemente temos os óleos de oliva, soja e atum como os compostos que secundariamente observou-se a eficiência da degradação lipídica pela enzima.

Por fim, concluem seu trabalho descrevendo que o potencial lipolítico conseguido através da indução da produção de enzima lipolítica desenvolvida pelo metabolismo microbiano em laboratório (em condições especiais de cultivo, pH e temperatura), se mostra altamente eficiente na utilização como um recurso para limpeza de águas de esgotos, falam dessa eficiência comparando a alta taxa de degradação lipídica conseguida em apenas 48 horas (quando utilizada a enzima produzida em laboratório) em relação a taxa de degradação lipídica ambiental (quando a mesma quantidade de lipídios é deixada a condição ambiental para a degradação) esta também ocorre, porém de maneira muito mais lenta em relação a degradação lipídica conseguida com a produção de uma enzima no laboratório.

Ainda envolvendo estudos com a *P. aeruginosa*, vemos em STUER et al., 1986, o trabalho que consistiu na purificação da enzima lipase extracelular proveniente de uma cepa de *P. aeruginosa*, produzidas em laboratório em condições especiais de cultivo – meios de cultura enriquecidos, temperatura e pH específicos. STUER, afirmou em seu trabalho que a *P. aeruginosa* excretou várias enzimas, e completou a informação de que três das quais possuem atividade lipolítica – fosfolipase C extracelular, uma esterase que limita a membrana – uma delas é a lipase extracelular. Ele também complementa o estudo com a informação de que obteve a excreção da lipase durante a fase de desenvolvimento chamada de logarítmica tardia. Descrevem ainda, os processos de produção, identificação, isolamento e análise das propriedades da lipase, utilizando técnicas laboratoriais como: ultrafiltração, uso de gel, eletroforeses, ultracentrifugação diferencial e análise fotométrica.

E por fim, vemos em HABA et al., 1999, um outro trabalho no qual conseguiram também constatar a produção e a ação lipolítica (Lipase), onde isolaram várias cepas em laboratório provindas de amostras de águas de esgoto, dentre os quais os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus* e *Staphylococcus* se desenvolveram nos óleos consumidos (oliva

e girassol). HABA, descreve em sua metodologia que, meios de culturas enriquecidos foram utilizados para a manutenção dos organismos, além de usaram metodologias como por exemplo a difusão do ágar – Tween 80, Rodamina – e cromatografia gasosa foram utilizadas na análise da atividade lipolítica da enzima. HABA, conclui seu trabalho descrevendo que os melhores produtores da lipase são os microrganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp., em especial ele cita a *P. aeruginosa*.

3. OBJETIVOS

- ✓ Isolamento e cultivo de microrganismos degradadores de compostos lipídicos (origem vegetal) em laboratório;
- ✓ Adaptação metabólica dos mesmos, condicionando-os apenas ao consumo de lipídio, servindo este, como única fonte de carbono, em temperatura ambiente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Na coleta das amostras de água (gentilmente fornecidas pela companhia de tratamento de Água do Estado do Paraná – SANEPAR) foram utilizados galões de plástico (com a capacidade para 1 litro), etiquetados, constando informações sobre dia, hora e local em que a coleta foi realizada, posteriormente foram levados ao laboratório e acondicionados em refrigerador até o momento da análise.

A coleta das águas foi realizada em 3 pontos distintos da Barragem do Passaúna, sendo coletados então, um galão de água (1L) para cada um dos pontos respectivamente:

- ponto n.º 1 – Extravasador;
- ponto n.º 2 - Vila Conquista;
- ponto n.º 3 - Parque Passaúna.

4.1.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas* sp. SUPOSTAMENTE DEGRADADORAS DE COMPOSTO LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL

Do galão plástico contendo água proveniente do ponto n.º 3, foram separados 500 mL da amostra, para serem utilizados neste experimento, a escolha em se usar a água do Parque Passaúna (ponto n.º 3) foi devido a informação cedida pela própria SANEPAR, em se tratar do local de maior “contaminação “ e “concentração “ de resíduos domésticos e industriais. As amostras de águas dos demais pontos (1 e 2) não foram utilizados para este experimento.

O experimento resumiu-se em promover o isolamento de algumas bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp., em especial a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que este isolamento, foi efetuado através de cultivo em meios seletivos (asparagina, acetamida e cetrimide), e confirmados pela elaboração de provas bioquímicas (catalase e oxidase positivas). Uma vez isoladas, estas bactérias foram metabolicamente adaptadas, utilizando como

única fonte de carbono, um substrato lipídico (óleo de soja comum - virgem e não virgem, utilizado na culinária), a este substrato, foi adicionado um caldo específico, denominado de caldo adaptador. Pretendeu-se assim, promover o desenvolvimento destes microrganismos específicos, ou seja, de bactérias lipolíticas (degradadoras de compostos lipídicos de origem vegetal), supostamente pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp.

4.1.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS SUPOSTAMENTE DEGRADADORES DE COMPOSTOS LIPIDICOS DE ORIGEM VEGETAL

Concomitantemente ao experimento acima descrito foi realizado um outro experimento, onde foram adicionados 10 mL de cada amostra coletada em Erlenmeyer (250 mL) contendo um meio específico, já anteriormente denominado de Caldo Adaptador, foram adicionados aos frascos também o substrato lipídico, ou seja, óleo de soja comum virgem e a outros frascos contendo óleo de soja comum, porém já utilizados na culinária. Neste experimento não houve o interesse em selecionar microrganismos específicos, mas sim, o de proporcionar que “todos” os microrganismos ditos degradadores de lipídios pudessem vir a se desenvolver.

4.2. MEIOS DE CULTURA

4.2.1 CALDO ASPARAGINA DE CONCENTRAÇÃO DUPLA - MEIO SELETIVO PARA *P. aeruginosa*

✓ Fosfato Dipotássico Anidro	2,0g
✓ Sulfato de magnésio	1,0 g
✓ Asparagina	6,0 g
✓ Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 7,0 antes da autoclavar para não precipitar.

4.2.2. CALDO ACETAMIDA MEIO SELETIVO PARA *P. aeruginosa*

✓ Acetamida	10 g
✓ NaCl	5g
✓ K ₂ PO ₄	1,39g
✓ MgSO ₄ . H ₂ O	0,5g
✓ Vermelho de Fenol	0,012g
✓ Água Destilada	1000mL

OBS: Aquecer agitando freqüentemente, até a completa dissolução, tomando o cuidado para que não seja alcançado a temperatura de ebulição.

Ajustar o pH após a esterilização entre 6,9 - 7,2.

4.2.3. ÁGAR CETRIMIDE

✓ Ágar Cetrimide	45,3 g
✓ Água destilada	1000 mL
✓ Glicerina líquida	10 mL

4.2.4. CALDO ADAPTADOR

✓ Substrato lipídico - óleo de soja comum (virgem e não virgem)	10 mL
✓ Cloreto de sódio	5,0 g
✓ Fosfato Dipotássico anidro	1,3g
✓ Fosfato monopotássico anidro	0,73 g
✓ Sulfato de magnésio	0,5 g
✓ Vermelho de Fenol	0,012 g
✓ Água destilada	1000 mL
pH - 7,2	

4.2.5. ÁGAR SABOURAUD

✓ Neopeptona	10 g
✓ dextrose	40 g
✓ ágar	15 g
pH 5,6 ±0,2	

Suspender 65 g do pó em 1 L de água purificada. Misturar bem e aquecer com agitação freqüente até que ferva e dissolva o pó completamente. Autoclavar o meio e distribuir em placas Petri.

4.2.6 ÁGAR MACCONKEY – ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS – BACILO GRAM NEGATIVO LACTOSE POSITIVA

✓ Peptona caseína	1,5 g/L
✓ Peptona carne	1,5 g/L
✓ Peptona gelatina	17,0 g/L
✓ Sais biliares	1,5 g/L
✓ Lactose	10,0 g/L
✓ Cloreto de sódio	5,0 g/L
✓ Vermelho neutro	0,03g/L
✓ Cristal violeta	0,001 g/L
✓ Ágar	13,5 g/L
pH 7,1 ±0,2 à 25 °C	

Dissolver 50 g em 1L de água destilada, deixar hidratar por 10 min, aquecer agitando e ferver por 1 min. Esterilizar, esfriar até 45 °C e distribuir em Placas Petri.

4.2.7 ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA) – MEIO SELETIVO PARA ISOLAMENTO DE BOLORES E LEVEDURAS

✓ Infusão de batatas	200 g
✓ Dextrose	20 g
✓ ágar	15 g
✓ Água destilada	1L

Preparar o meio e esterilizar a temperatura de 121°C, por 15 min.

4.2.8 SOLUÇÃO DE ÁGUA PEPTONADA

✓ Peptona	1g/100mL
✓ Cloreto de sódio	0,5 %
✓ Glicerina líquida	0,75 mL
pH 7,0	

Preparar a solução, esterilizar e distribuir em tubos de 5 mL, inocular as bactérias e deixar por 24 h em estufa à 36 °C, no dia seguinte adicionar ao tubos 0,75 mL de glicerina, agitar, identificar e guardar os mesmos no freezer a temperatura de - 18°C.

4.3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Os meios de cultura, materiais e vidrarias em geral utilizados no experimentos foram sempre previamente esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atm. e temperatura de 120 °C por 20 minutos.

As inoculações e repiques dos microrganismos que foram feitas nas etapas da elaboração do experimento sempre feitas seguiram as normas de assepsia realizadas dentro de um laboratório de microbiologia (uso de álcool 70% para limpar bancadas, alças descartáveis, manipulação do material dentro de uma da sala contendo filtros para a purificação do ar e do bico de Bunsen) na tentativa de diminuir o risco de contaminantes no experimento.

4.4. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas* sp. SUPOSTAMENTE DEGRADADORAS DE COMPOSTOS LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL

Em uma primeira etapa o caldo Asparagina foi distribuído em 10 tubos de ensaios previamente esterilizados e, enumerados. Juntamente com os 10 mL do meio em cada tubo foram adicionado 10 mL da água da amostra colhida (ponto n.º 3), sendo levados a estufa de 36 °C e deixados por um período de 96 horas.

Este teste presuntivo, consistiu na semeadura de volumes determinados da amostra em caldo Asparagina, que foram inoculados à 36° C, durante 96 horas. A observação de fluorescência sob a luz negra é uma prova presuntiva da presença de *P. aeruginosa*, podendo produzir pigmento, de cor esverdeado ou azulada, denominados de Pioverdina ou Piocianina.

Numa segunda etapa, foi feito então, o que chamou-se de teste confirmativo, consistindo na transferência de todas as culturas presuntivas positivas após 96 horas de incubação, para tubos de ensaio contendo Caldo Acetamida (10 tubos de ensaio contendo 10 mL do meio), incubando-os por 48 horas em estufa a temperatura de ± 36 ° C visando testar a habilidade dessas culturas na utilização deste composto orgânico como única fonte de Carbono e Nitrogênio. O resultado confirmativo positivo é dado pela alcalinização do meio o tornando com uma coloração avermelhada mais forte.

Posteriormente estas cepas, foram submetidas a um novo isolamento, onde foi utilizado como meio seletivo para *Pseudomonas aeruginosa* o Ágar Cetrimide. Através da "Técnica de esgotamento da alça", foram inoculados os tubos positivos para *P. aeruginosa* do teste confirmativo para placas contendo o Ágar Cetrimide, novamente sendo incubadas a temperatura de ± 36 ° C, no período de 48 horas. Para aumentar ainda mais a confiabilidade do experimento e servindo como ferramenta confirmativa, foram realizadas provas bioquímicas Catalase e Oxidase (Catalase – adicionando aos tubos a quantidade de um 1mL de água Oxigenada, a ocorrência da efervescência do cultivo aponta como resultado + para a prova da Catalase e Oxidase - com auxílio de uma e pinça mergulham- se fitas indicadoras em cada tubo de ensaio

contendo o cultivo, estas tornam-se arroxeadas na presença de bactérias Oxidase +), para a constatação da utilização neste experimento de bactérias consideradas axênicas (cultura pura) – *Pseudomonas aeruginosa* .

Uma vez isolada as cepas de *P. aeruginosa* estas foram repicadas para um novo meio, para o Caldo Adaptador, onde, o principal objetivo foi o de promover a adaptação destas cepas axênicas ao metabolismo de degradação de compostos lipídicos (origem vegetal), conforme a seqüência abaixo:

Distribuiu-se o meio em 20 tubos de ensaio – 2 baterias de contendo 10 tubos cada, com aproximadamente 10ml do meio e adicionados também 10mL de óleo de soja para cada tubo.

Na primeira bateria formada por 10 tubos foi utilizado óleo de soja virgem como substrato lipídico, já na segunda bateria de tubos foi utilizado óleo de soja não virgem, mas sim, utilizados na culinária.

Os tubos (enumerados de 1 à 10 para cada bateria) foram inoculados com auxílio de uma alça de níquel cromo adaptada ao cabo de Kolle, com uma das colônias morfológicamente típicas de *Pseudomonas aeruginosa*, crescidas no meio Cetrimide (item 4.2.3) escolhida de forma aleatória (Placa de n.º 5). Por fim os tubos foram incubados a temperatura ambiente para posterior observação da degradação do substrato lipídico.

4.5. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS SUPOSTAMENTE DEGRADADORES DE COMPOSTOS LIPÍDICOS DE ORIGEM VEGETAL

Concomitantemente ao experimento descrito acima, foram feitos 12 ensaios, utilizando Erlenmeyers (250 mL), contendo cada um deles 50mL do meio (Caldo Adaptador), 40 mL da água das amostras e 10 mL de óleo de soja (virgem e não virgem) comum.

Cada amostra de água (ponto n.º 1,2 e 3) foram distribuídas da seguinte maneira:

- 4 frascos contendo meio (50 mL/cada)+ amostras da água do ponto n.º 1 (40 mL/cada), onde em 2 destes frascos foram adicionados óleo de soja virgem (10mL/cada) e nos outros 2 restantes óleo de soja já utilizado (10mL/cada);

- 4 frascos contendo meio (50 mL/cada)+ amostras da água do ponto n.º 2 (40 mL/cada), onde em 2 destes frascos foram adicionados óleo de soja virgem (10mL/cada) e nos outros 2 restantes óleo de soja já utilizado (10mL/cada);

- e por fim, mais 4 frascos contendo meio (50 mL/cada)+ amostras da água do ponto n.º 3 (40 mL/cada), onde em 2 destes frascos foram adicionados óleo de soja virgem (10mL/cada) e nos outros 2 restantes óleo de soja já utilizado (10mL/cada).

Foram feitos também, 2 frascos ditos controle, cada um deles contendo 50 mL do caldo adaptador adicionados à 40 mL de água destilada (previamente esterilizada) e a um dos frascos fora adicionado 10 mL de óleo de soja virgem (Frasco C) enquanto que ao outro adicionou-se 10 mL de óleo de soja não virgem (Frasco C').

Os 12 frascos juntamente com os controles foram incubados em temperatura ambiente, para posteriormente promover a observação da degradação do substrato lipídico.

Após o período de 2 meses de incubação, os frascos foram levados para análise da degradação lipídica, antes disso, foram feitos alguns ensaios com meios específicos para a identificação de microrganismos como por exemplo: o uso de placas contendo Ágar Cetrimide, para a confirmação da presença da *Pseudomonas aeruginosa* no “pool” de microrganismos que ali se desenvolveram. O uso ainda de meio MacConkey evidenciando a proliferação de bactérias do grupo Gram Negativo e o meio Saboraud, utilizado para o cultivo de fungos, bolores e leveduras.

Estes microrganismos foram “isolados e armazenados” em meios específicos para a sua conservação – bactérias (armazenadas em freezer em solução aquosa de água peptonada e glicerina líquida) e fungos foram repicados e armazenados em meio BDA.

4.6. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DA ANÁLISE DE ÓLEOS E GRAXAS PARA AVERIGUAÇÃO DA DEGRADAÇÃO OBTIDA

O objetivo principal deste teste foi determinar quantidades de óleos e graxas em amostras de águas naturais em geral, efluentes domésticos/industriais. A análise foi realizada pelo Laboratório de Físico-Química de Águas e Efluentes, do CEPPA. - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos.

4.6.1 METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS

Sabões metálicos solúveis foram hidrolizados por acidificação. Qualquer óleos e sólidos ou graxas viscosas presentes foram separados das amostras líquidas por filtração. Após extração num aparelho Soxhlet com solvente, o resíduo remanescente depois da evaporação do solvente, foi pesado para determinar o óleo e graxa contido. Componentes volatilizados abaixo de 103°C se perderão quando o filtro for seco.

Os resultados obtidos na análise das amostras foram calculados de acordo com os critérios utilizados na fórmula abaixo descrita:

4.6.2 CÁLCULOS

$$\text{Óleo e Graxa (mg/L)} = \frac{(P_1 - P) \times 1.000.000}{V_{\text{amostra}} \text{ (mL)}}$$

Onde:

P = Peso (g) do balão tarado

P1 = Peso (g) do balão com resíduo

4.6.3 PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

1) Solução de ácido clorídrico-1:1: Colocar em um copo de becker 250 mL de água destilada. Adicionar, lentamente e com agitação, 250 mL de ácido clorídrico concentrado, HCl, p.a.

2) Solução de ácido sulfúrico-1:1: Colocar em um copo de becker 250 mL de água destilada. Adicionar, lentamente e com agitação, 250 mL de ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 , $d = 1,84$, p.a.

3) n- Hexano, C_6H_{14} , p.a.: ponto de ebulição de 69°C . NOTA: O solvente não deverá deixar resíduo medido na evaporação; destilar se necessário. Não usar nenhuma pipeta plástica para transferir solvente entre os frascos.

4) Suspensão auxiliar de filtração: Pesar 10 g de auxiliar de filtração celite, p.a., e 5 g de caolim, p.a., do tipo usado para cromatografia em camada delgada. Dissolver e avolumar para balão volumétrico de 1000 mL.

5) Solução sulfocrômica: Dissolver 200 g de bicromato de potássio, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, e 170 mL de ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 , $d = 1,84$, em água e levar a 1000 mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS E DEGRADAÇÃO LIPÍDICA

A primeira instância o objetivo do experimento descrito no item 4.1.1 – isolamento de bactérias do Gênero *Pseudomonas* sp., foi o de conseguir através da utilização de vários meios seletivos o isolamento do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria pertencente a Família Pseudomonadaceae, gram negativa. Uma vez isolada as cepas de *P. aeruginosa* seriam então, repicadas para um novo meio, ou seja, para o Caldo Adaptador, afim de promover a adaptação destas cepas axênicas ao metabolismo de degradação de compostos lipídicos (origem vegetal).

A hipótese de que a *P. aeruginosa*, uma vez isolada e adaptada ao metabolismo de consumo apenas lipídico surgiram nos resultados obtidos por HABA, 1999 que aponta este gênero como um dos microrganismos que melhor se mostram capacitados a produção através de seu metabolismo de enzimas lipolíticas, capazes de “digerir” óleos e gorduras em geral. Houve então, a tentativa de se isolar em especial a *P. aeruginosa*, e o resultado foi positivo. Para tal, foram utilizadas técnicas laboratoriais de isolamento e identificação de águas contaminadas pelo gênero *Pseudomonas* sp., através o uso do meio líquido Asparagina (itens 4.2.1, 4.3 e 4.4). Como resultado após a incubação dos tubos de ensaio, por um período de 96 horas, em estufa a temperatura média de 36 ° C, obteve-se a turvação do meio confirmando assim proliferação bacteriana, bem como, a evidenciação da formação do pigmento de cor azul - esverdeada, a Píocianina ou Pioverdina, apontada por OLIVEIRA (1999) como um fator presuntivo da proliferação da *P. aeruginosa*, capaz de produzir este pigmento. (figura1)

Por conseguinte, promoveu-se o que chamamos de teste confirmativo procurando utilizar meios seletivos para o isolamento eficiente do gênero *Pseudomonas*, em especial a *P. aeruginosa*. Para tal, as amostras obtidas como o resultado positivo no primeiro teste Asparagina (item 4.2.1), foram submetidas novamente a uma bateria de ensaios, dessa vez utilizando o meio Acetamida (itens 4.2.2, 4.3 e 4.4). Este teste confirmativo Acetamida, teve como objetivo testar a habilidade dessas culturas na utilização deste composto

orgânico como única fonte de carbono e nitrogênio. O resultado confirmativo para este teste positivo foi dado pela alcalinização do meio o tornando com uma coloração avermelhada mais forte. Pode-se observar então, através deste teste, o resultado positivo para o isolamento dos microrganismos pertencentes ao Gênero *Pseudomonas* (Figura 2).

Figura 1- A foto mostra um tubo de ensaio Controle para Asparagina e ao lado um tubo de ensaio positivo à presença da proliferação bacteriana de *P. aeruginosa*, com a turvação do meio e produção do pigmento específico.

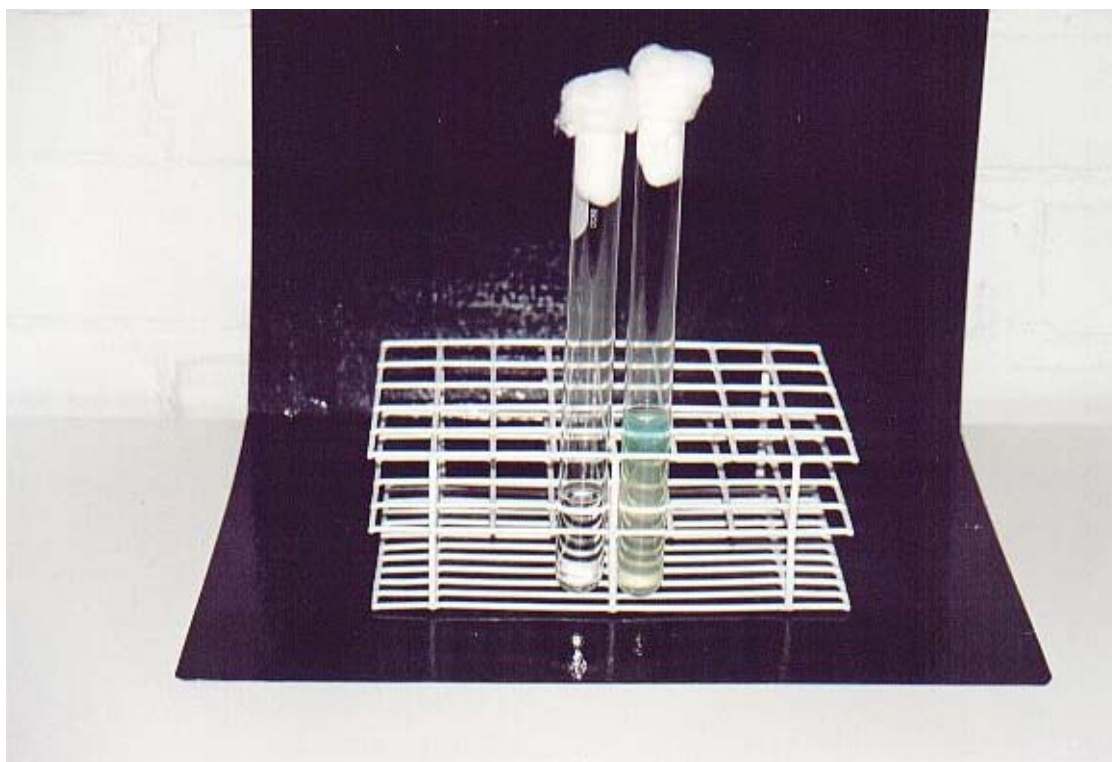
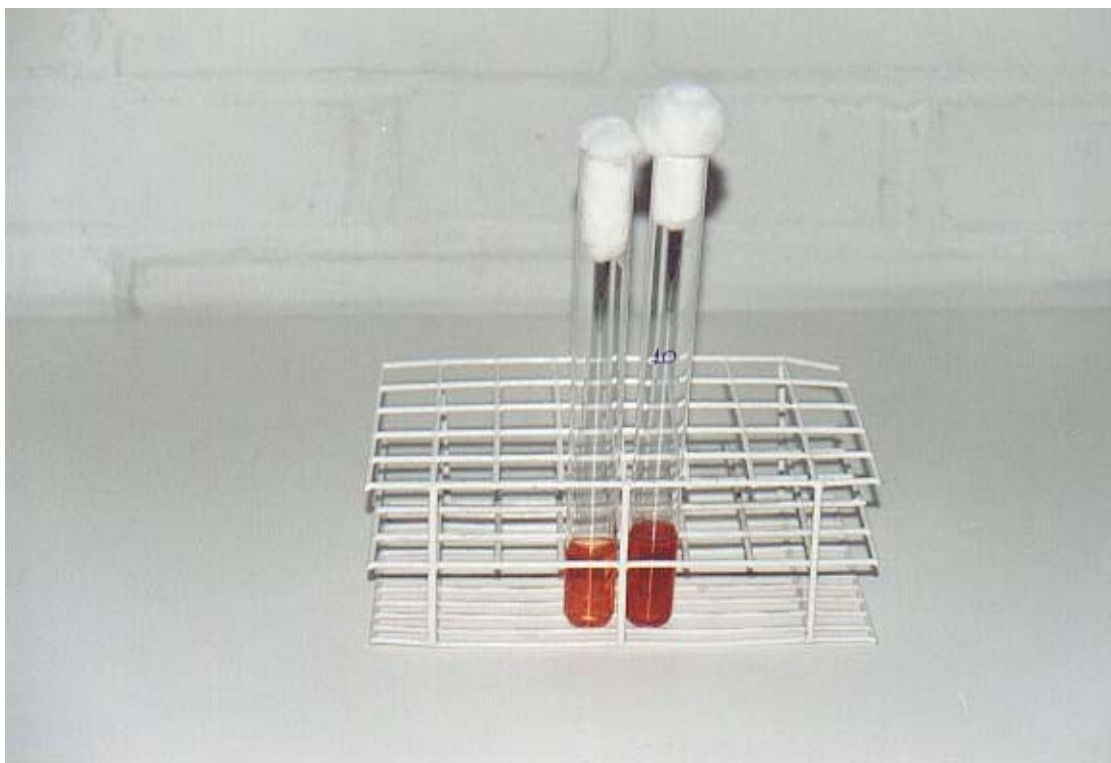


Figura 2 – Teste confirmativo da proliferação bacteriana de *Pseudomonas* sp, há uma modificação da coloração do meio.



Em uma etapa posterior as amostras foram repicadas, para o Ágar Cetrimide, específico para o isolamento de bactérias *P. aeruginosa* (itens 4.2.3, 4.3 e 4.4), o resultado encontrado foi positivo. Após o período de incubação houve o desenvolvimento de colônias morfolologicamente típicas de *Pseudomonas* sp, crescidas no meio Cetrimide

Foi escolhido de forma aleatória uma colônia típica (Placa n.º 5) para a inoculação nos tubos contendo o Caldo Adaptador e para a realização das Provas Bioquímicas – Catalase e Oxidase.

Esta colônia foi transferida para um meio Simples (5 tubos de ensaio + inóculo), apenas para a o crescimento da cultura de *P. aeruginosa*, após 24 horas de incubação em estufa à 36 ° C, este mesmo cultivo foi submetido a Provas Bioquímicas: a Oxidase, onde os resultados foram positivos, assim como foi positivo também o resultado para a Prova Bioquímica Catalase, confirmando juntamente com o uso de meios seletivos e provas Bioquímicas a presença de colônias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. em especial o uso de *P. aeruginosa*.

Sendo assim, foram feitas as baterias de inóculos em tubos de ensaio contendo o Caldo adaptador e o substrato lipídico, conforme descrito nos itens 4.2.5, 4.3 e 4.4.

Pode-se observar que nas baterias de tubos inoculados, deixados à adaptação e degradação do substrato lipídico, houve a turvação do meio em consequência da proliferação bacteriana do mesmo, mas, mesmo assim, não houve de forma alguma, a evidência da degradação do substrato lipídico adicionado ao meio (nem em relação ao óleo de soja virgem e nem em relação ao óleo de soja utilizado).

Baseado neste resultado, podemos concluir que apesar de MITTELBACH, 1990, TAKASHIMA *et al.*, 1998, DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998, HABA *et al.*, 1999, BRAHIMI-HORN *et al.*, 1991 citarem em seus trabalhos que a *P. aeruginosa*, e em geral os microrganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. apresentam uma maior eficiência na produção da enzima lipase, não lhe garante a propriedade de que será sempre ela “o microrganismo” capaz de produzir a enzima de melhor atividade lipolítica, quando cultivada isoladamente.

Outro fator importante a se salientar é a tendência dos trabalhos escritos por DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998 e também HABA *et al.*, 1999, em promover a extração e experimentação das enzimas conseguidas através de cepas isoladas, porém, sendo cultivadas em meios enriquecidos (sejam eles com sais minerais, glucose, fermentos etc) além do controle constante de temperatura e pHs específicos (ditos ótimos para a atividade lipolítica). No trabalho apresentado por DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998, os pesquisadores conseguiram isolar de uma amostra de água de esgoto doméstico (restaurante), uma cepa bacteriana da *Pseudomonas aeruginosa* LP602, da qual extraiu-se uma enzima a lipase. A enzima, segundo os autores, mostrou atividade lipolítica máxima em pH 8.0 à temperatura de 55°C, a lipase mostrou-se também altamente eficiente. HABA *et al.*, 1999, isolou várias cepas em laboratório providas de amostras de águas de esgoto, dentre os quais os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus* e *Staphylococcus* se desenvolveram nos óleos consumidos (oliva e girassol). HABA, descreve em sua metodologia que, meios de culturas enriquecidos foram utilizados para a manutenção dos organismos, porém neste experimento, que consistia em

promover o isolamento e proliferação de microrganismos possivelmente degradadores de compostos lipídicos através de amostras de águas da Barragem do Passaúna, procurou-se em especial, buscar condições ambientais muito próximas do que acontece realmente no meio ambiente, onde o meio utilizado para o experimento ofereceu apenas como recurso nutritivo o substrato lipídico (óleo de soja virgem e utilizado), além de incubar o experimento a temperatura ambiente, onde realmente o organismo estaria sujeito a variações de temperaturas.

Conclui-se então, que a *Pseudomonas* sp. pode ser sim, um dos microrganismos que apresentam a excreção de lipase com uma alta atividade lipolítica, quando cultivada em meios enriquecidos e com total controle de temperatura e pH ótimos para a atividade lipolítica da enzima, porém quando esta, é primordialmente isolada e inoculada para promover a degradação lipídica em um meio “pobre” em nutrientes e sujeito a variações de temperatura ambiental a eficácia da produção da enzima lipolítica – lipase, pode ser afetada.

Outro ponto importante que podemos destacar na discussão dos resultados seria o fato de que a *P. aeruginosa* e as demais espécies pertencentes a este gênero, apresentam na maioria das vezes uma tendência de uma maior eficiência em suas propriedades de produção da enzima e degradação lipolítica quando associadas a um “pool microbiano”, BRAHIMI-HORN et. al., 1991 cita que não são apenas os microrganismos do gênero *Pseudomonas* a serem os únicos responsáveis pela produção de enzimas lipolíticas e degradação de lipídios, mas também, a de outros gêneros de bactérias, além de comentar que estas fazem associações quase que freqüentemente com alguns gêneros de fungos e leveduras; afirma ainda que de um “pool” de microrganismos, conseguiu isolar dois organismos dos quais pode constatar a produção de uma enzima de ação lipolítica, seriam os gêneros *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*.

NASCIMENTO et al, 1999 trabalhando na obtenção de um biocombustível mais eficiente, concluíram que obtiveram o combustível de melhor rendimento utilizando lipases produzidas por bactérias *Pseudomonas* sp associadas as lipases produzidas por *Mucor mirhei* e *Candida* sp, sendo este último um fungo.

Tal tendência foi confirmada através dos resultados obtidos com o experimento onde não houve o isolamento prévio de nenhum microrganismo, onde as amostras de águas coletadas da Barragem do Passaúna, foram acondicionadas em frascos de Vidro Erlenmeyer (250 mL) contendo o meio específico (caldo Adaptador) e substrato lipídico (óleo de soja comum virgem e utilizado) com o objetivo de fazer com que “todos” os microrganismos ditos degradadores de lipídios pudessem vir a se desenvolver, promovendo assim, a proliferação do “pool microbiano” lipolítico (item 4.5). Após o período de incubação de dois meses em laboratório, estes microrganismos, submetidos apenas ao consumo do substrato lipídico e a temperatura ambiente, foram levados para análise da degradação lipídica feita através da Técnica descrita no item 4.6.

Os resultados obtidos neste experimento, podem ser observados na tabela abaixo e nas figuras 3 e 4 a seguir.

Tabela 1- Resultados do teste da degradação de Óleos e Graxas relativo aos microrganismos isolados das amostras de águas coletadas na Barragem do Passaúna

Identificação	Descrição	Resultado
Branco	Ver item 4.6	0,30 mg/L
Controles		
Frasco Controle C	10 mL óleo soja virgem + 50mL meio + 40 mL de água destilada Taxa de degradação %	11.532,00 mg/L (0%)
Frasco Controle C'	10 mL óleo soja utilizado + 50mL meio + 40 mL de água destilada Taxa de degradação	204.330,00 mg/L (0%)
Ponto n.º 1 – Extravasador		
Frasco 1	10 mL óleo soja virgem + 50mL meio + 40 mL de água ponto 1 Taxa de degradação %	10.824,00 mg/L (7%) 10.208,25 mg/L (12%)
Duplicata do Frasco 1		
Frasco 1'	10 mL óleo soja utilizado + 50mL meio + 40 mL de água ponto 1 Taxa de degradação %	202.062,35 mg/L (1,1%) 200.306,67 mg/L (1,8%)
Duplicata do Frasco 1'		
Ponto n.º 2 –Vila Conquista		
Frasco 2	10 mL óleo soja virgem + 50mL meio + 40 mL de água ponto 2 Taxa de degradação %	9.745,88 mg/L (15%) 9.694,12 mg/L (15%)
Duplicata do Frasco 2		
Frasco 2'	10 mL óleo soja utilizado + 50mL meio + 40 mL de água ponto 2 Taxa de degradação %	200.578,94 mg/L (1,8%) 200.468,89 mg/L (1,8%)
Duplicata do Frasco 2'		
Ponto n.º 3 – Parque do Passaúna		
Frasco 3	10 mL óleo soja virgem + 50mL meio + 40 mL de água ponto 3 Taxa de degradação %	9.628,00 mg/L (16%) 9.596,84 mg/L (16%)
Duplicata do Frasco 3		
Frasco 3'	10 mL óleo soja utilizado + 50mL meio + 40 mL de água ponto 3	165.064,70 mg/L (19%) 120.025,64 mg/L (41%)
Duplicata do Frasco 3'		

Figura 3 – Frasco controle com Caldo adaptador e óleo de soja não virgem a esquerda e ao lado frasco com inóculo, caldo adaptador e óleo de soja não virgem, onde pode-se observar uma certa taxa de degradação.



Figura 4 - Frasco controle com Caldo adaptador e óleo de soja virgem a esquerda e ao lado frasco com inóculo, caldo adaptador e óleo de soja virgem, onde pode-se observar a taxa de degradação.



Conforme os dados obtidos na análise de óleos e graxas, houve então, a confirmação da tendência acima citada, ou seja, a degradação do substrato lipídico (óleo de soja virgem comum e utilizado) por parte dos microrganismos cultivados no experimento. Ao compararmos os resultados dos frascos controles para o óleo de soja virgem (C) e utilizado (C') com os demais frascos dos pontos 1 (1 e 1'), 2 (2 e 2') e 3 (3 e 3'), percebemos uma pequena variação e diminuição das quantidades de óleos e graxas achados em cada amostra, comprovando assim que houve a degradação dos mesmos.

Vale a pena salientar que a maior taxa de degradação do substrato lipídico foi obtida nos frascos que continham as amostras do ponto n.º 3, denominado de Parque do Passaúna. Supõem-se que tal tendência se dê em decorrência deste ser o ponto onde se tinha a maior proliferação de microrganismos, descrito pelos técnicos da Sanepar, como a área de maior foco de poluição.

Em números os resultados podem ser comparados da seguinte forma: Frasco C apresentando a quantidade de óleos e graxa de 11.532,00 mg/L, frasco em duplicata 3, apresentam como resultados os seguintes números - 9.628,00 mg/L e 9.596,84 mg/L, onde observa-se a diminuição da quantidade de óleos e graxas encontradas nas amostras, já em relação ao frasco controle C' contendo a quantidade de 204.330,00 mg de óleo de graxas por L, encontramos nos frascos ditos 3' os seguintes resultados: 165.064,70 mg/L e 120.025,64 mg/L, confirmando a degradação do substrato lipídico.

Como dado complementar, NASCIMENTO et al., 1999, comenta que o óleo uma vez queimado (queima do óleo na fritura) produz na decomposição do glicerol, uma substância considerada altamente tóxica denominada de Acroleína, que podem vir a prejudicar, por assim dizer, o metabolismo microbiano como um todo; porém o que se observou foi que houve a degradação tanto dos óleos virgem, como também dele já utilizado de maneira eficaz, principalmente em relação ao ponto 3. O que supõem-se como uma hipótese a ser confirmada, é a de que talvez neste ponto número 3, considerado altamente poluído, houvesse um ambiente propício ao desenvolvimento de cepas microbianas que se mostram resistentes a algumas substâncias tóxicas, dentre elas a Acroleína; fato este que se for confirmado

através de mais investigações, viria contribuir em muito para o desenvolvimento de novas técnicas de biorremediação.

Como resultados complementares do estudo, foram feitas as análises através da utilização de outros meios de cultura para a averiguação dos microrganismos componentes do “pool microbiano” – do frasco denominado duplicata 3’, como por exemplo: o uso do meio MacCkonkey para a constatação de outros gêneros de microrganismos que não somente a *Pseudomonas* sp.(figura 5).

Além disto, foi confirmada a presença da *P. aeruginosa* através do uso do meio seletivo Cetrimide (figura 6) e por fim, utilizando como meio seletivo o Sabouraud, constatou – se a proliferação de vários gêneros de fungos, leveduras e bolores (figura 7).

Sugere-se que em um próximo estudo faça-se a identificação dos microrganismos encontrados neste “pool”, através do uso de meios seletivos e provas bioquímicas podendo identificar assim, algumas espécies.

Figura 5 – Placas com meio MacCkonKey formando colônias vermelhas, evidenciando a presença de outros gêneros bacterianos Gram –negativos além da *Pseudomonas* sp (selecionada pelo meio Cetrimide) sendo encontradas no “pool microbiano”.

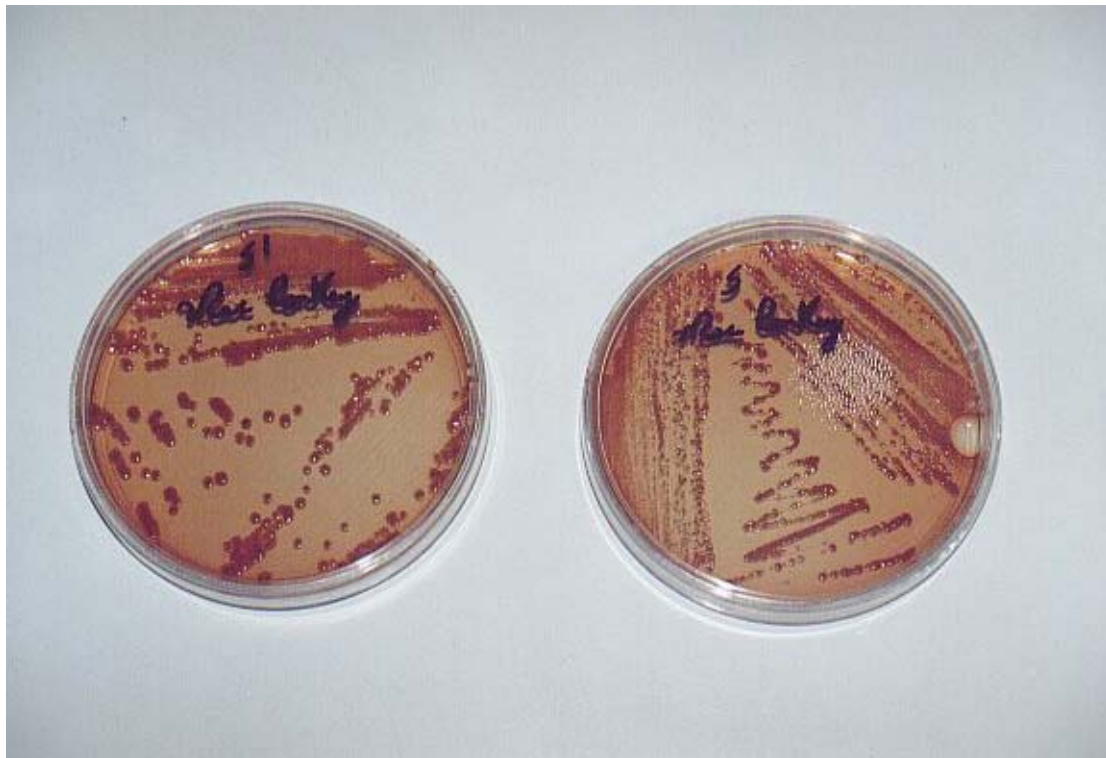
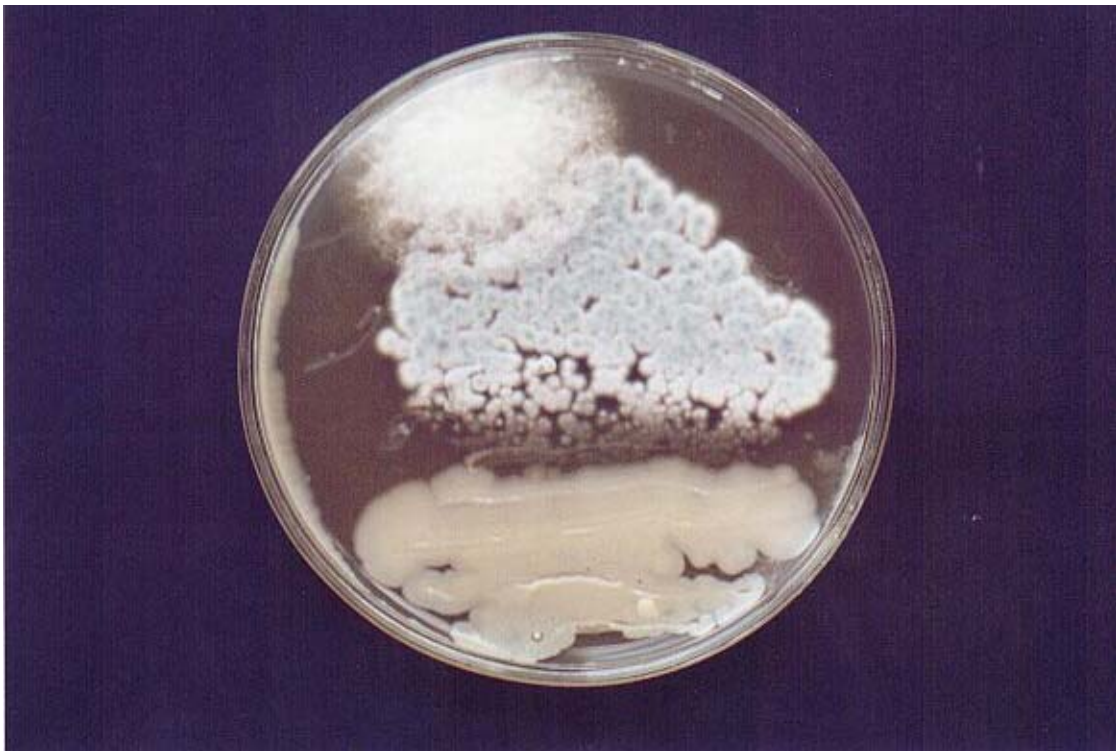


Figura 6 - Placa a esquerda com a proliferação de colônias pertencentes a *P. aeruginosa*, ao lado uma Placa Controle contendo apenas o Ágar Cetrimide.



Figura 7 – Colônias de fungos filamentosos e leveduriformes, obtidas em cultivo em meio seletivo – Sabouraud encontrados no “pool microbiano”.







6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos chegar as seguintes conclusões:

- Bactérias do Gênero *Pseudomonas* sp, em especial *P. aeruginosa*, neste experimento, uma vez isoladas e inoculadas em meio pobre em nutrientes, sem o controle de temperatura e pHs específicos, não apresentou eficiência na produção metabólica de enzimas ditas lipolíticas para a degradação de substratos lipídicos. Sugere-se assim, que novas pesquisas sejam feitas na tentativa de confirmar tal fato, descartando a possibilidade de que a produção da enzima talvez tivesse sido prejudicada devido a camada de óleo depositada nos tubos de ensaio ter provocado o efeito de anaerobiose;
- De um “pool microbiano”, onde encontramos vários gêneros de bactérias, dentre elas o gênero *Pseudomonas*, e demais microrganismos, como por exemplo: fungos e leveduras, mantidos em meio pobre em nutrientes, sem a preocupação de controle de temperatura e pHs específicos, é possível que se consiga, mesmo que seja em um período de tempo mais prolongado, a degradação de compostos lipídicos de origem vegetal de forma eficiente, através da produção metabólica destes microrganismo de enzimas ditas lipolíticas;

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo teve como principal objetivo o de promover o isolamento e cultivo de microrganismos ditos degradadores de compostos lipídicos, evidenciando sua propriedade lipolítica, utilizando para tal, recursos e técnicas de cultivos e análises laboratoriais simplificadas, caracterizando assim, o experimento o mais próximo do que acontece na realidade, ou seja, proporcionando aos microrganismos um ambiente próximo ao do real, estando eles, sujeitos as variações de temperatura, pH e as relações de competitividade pelo substrato nutritivo que acontece entre os mais diversos tipos de microrganismos (fungos, bactérias, protozoários etc.).

Sendo assim, podemos citar algumas observações:

- o estudo corrobora com a idéia de que microrganismos apresentam sim, as propriedades de produção, excreção e degradação de compostos considerados xenobiontes, removendo os poluentes e produzindo moléculas com menor toxicidade e poluição, como por exemplo a de compostos lipídicos expostos ao meio, evidenciados através da produção de enzimas lipolíticas, em especial, a Lipase, decorrente de seu metabolismo microbiano;
- além disso, o estudo nos proporciona o questionamento e discussão em relação ao uso prático de tais microrganismos que vem sido rotineiramente empregados como um dos recursos mais eficientes na limpeza de resíduos industriais e domésticos lançados ao meio ambiente. Pergunta-se quais seriam as vantagens e desvantagens em se usar “microrganismos ditos eficazes na produção da lipase”, uma vez que estes primariamente são estudados e condicionados a produção de tal enzima em total controle de temperatura, meio nutritivo e pH? Uma vez, condicionados a esta situação apresentariam a mesma eficiência quando sujeitos as mais variadas situações ambientais?
- Este experimento permite nos concluir que a longo prazo a utilização dos microrganismos como uma das medidas remediativas na limpeza de compostos xenobiontes ao meio é de todo válida.

- Por se tratar de um trabalho pioneiro na utilização de certas metodologias e técnicas de análises propõem-se que haja futuramente um estudo mais detalhado dos microrganismos encontrados no “pool “lipolítico, além de um enfoque maior as propriedades e análises bioquímicas da enzima lipase e por fim, a utilização de “biotécnicas” que possam vir a modificar geneticamente tais microrganismos aumentando assim a sua produção enzimática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHEER, S.; MOGI, K; ; NAKAJIMA, M. Interesterification Kinetics of Triglycerides and Fatty Acids with modified Lipase in n-Hexane, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72, 1995, p. 551-518.

BON, E. P.S. e PEREIRA Jr, N. **Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro, 1999, 113p.

BRAHIMI-HORN, M. C. *et al.* Lipolytic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter calcoaceticus* strains grown in wool-sour effluent. **Enzyme Microbial Technology**. 1991.v.13, p. 740-746

BURIN, A. M. e Fontoura, P. S. G. Extração da gordura intestinal de bovinos por meio enzimático. **Bol. CEPPA**, v. 12, 1994, p. 89-94.

CLESCERI, L.S.;GREENBERG,A E.; EATON,A D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th Edition,1997.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. **Produção de Biocombustíveis Alternativo ao Óleo Diesel através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras**. Química Nova. v. 23, 2000, p. 531-537.

CRUZ, L.C.H. da. **Micologia Veterinária**. Itaguaí, Rio de Janeiro, Imprensa Universitária – UFRRJ, 1985.

DHARMSTHITI, S. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: bioquimical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 21, n.º 1-2, p.75-80, 1998.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**. 3a. ed., Springer, 1997, 402 p.

FACIOLI, N. L. ;GONÇALVES, L. A. G. **Modificação por via Enzimática da Composição Triglicéridica do Óleo de Piqui**, Química Nova, 21(1), 1998, p.16-19.

FRANÇA, H. **Consciência Net**. A Evolução da Questão dos Resíduos, Efluentes Líquidos Industriais e Domésticos, Histórico, Riscos para o Ambiente, Soluções para o Problema dos Efluentes Líquidos Industriais e Domésticos. Disponível em : < Fonte: <http://www.radiobras.gov.br> > acesso em: jan. 2002.

GRAÇA NASCIMENTO, M.^a da ; COSTA NETO, P. da; MAZZUCCO, L. M.^a **Biotransformação de Óleos e Gorduras**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br> > Acesso em: 18 jun.2001.

GHOSH, S. BHATTCHARYYA, D. K. Utilization of High-Melting Palm Stearin in Lipase-Catalyzed Interesterification with Liquid Oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 74, n.º 5, p. 589-592, 1997

HABA, E. *et al.* Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.º 1, p. 40-44, 2000

HAYES, D. G. The Catalytic of Lipases Toward Hydroxy Fatty Acids Æ A Review. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 73, n.º 5, 1996, p. 543-549.

HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. **Microbial production of biosurfactants. Global Environmental Biotechnology.** Wise, D.L. v.18, n.º 1-4 p. 41- 57, 1996

IKE, M. *et al.* Biosurfactant production from acetic acid as a strategy for waste sludge utilization - Bioremediation; oil -*Pseudomonas putida*. **Journal - Biocontrol- Sci.** v.3, n.º 1, p.31-38, 1998

KONEMAM, E.W. **Diagnóstico Microbiológico.** 5.ed., 2001. MEDSI/Editora Médica e Científica LTDA

KONISHI, H.; NEFF, W. E. ; MOUNTS, T. L Oxidative Stability of Soybean Oil Products Obtained by Regioselective Chemical Interesterification. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72, n.º 11, p.1393-1398, 1995

LEHNINGER, A . L. **Princípios de Bioquímica.** 2.ed., 1995

MACRAE, A. R. Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **J.Am. Oil Chem. Soc.** v. 80, n.º 2, p. 291-294, 1983

MENEZES, T. J.B de; BARANAUSKAS, M. Isolamento e seleção de microrganismos que degradam o colesterol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.220- 224, 1995

MITTELBAACH, M. Lipase Catalyzed Alcoholyses of Sunflower Oil, **J. Am. Oil .Chem.Soc.** v.67,n.º 3, p. 168 – 170, 1990

OLIVEIRA, F.R. **Análise Microbiológica.** Apostila do Curso Técnico de Saneamento - Centro Integrado de Tecnologia e Educação Profissional da CIC -SENAI-CIC, 1999

PECNIK, S. and KNEZ, Z. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.69, n.º 3, p. 261-265, 1992

ROUX, J. C. Despoluição: os microrganismos ganham terreno. **Technologies France**, n.º 27, 1998

SERAFINI, L.; BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Editora Agropecuária, 2001.

STUER, W. ; JAEGER, K. E. e WINKLER, U. K. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, p. 1070 – 1074, 1986

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Setor de Ciências Biológicas. **Bioquímica: aulas práticas**. Curitiba: Scientia et Labor, 1988.

VOGEL. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4ª. Edição. Rio de Janeiro, 1981. p. 300

Aplicações dos Microrganismos em Biorremediação e Biotransformação.

Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/workshop>> Acesso em: jan. 2002

O que é biorremediação

HYPERLINK . Disponível em:

<<http://www.envirotur.com/whatisbi.htm>,<http://www.envirotur.com/whatisbi.htm>>

Acesso em: jan. 2002

Visão biológica da Remediação:

HYPERLINK. Disponível em:

<<http://www.cfr.msstat.edu/fwrc/forestp/bioremediation/biorremediation.htm>,<http://www.cfr.msstat.edu/fwrc/forestp/bioremediation/biorremediation.htm>>

<<http://www.usedi.com/biorem.htm>,<http://www.usedi.com/biorem.htm>>

Acesso em: jan. 2002

Metabolismo fúngico:

HYPERLINK Disponível em:

<<http://clu.in.org/products/intem/bioremed.htm>> Acesso em: jan.2002

Fungos da "Podridão Branca":

Disponível em:

<<http://www.ftns.wau.nl/imb/research/wrf/xeno.html>,<http://www.ftns.wau.nl/imb/research/wrf/xeno.html>>

<<http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/1993/101-3/innovations.html>.> Acesso em: jan. 2002