

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE FLUENTES INDUSTRIAIS

Daniel Pereira Borges Junior¹, Joel Alexandre Meira², Elisa Esposito³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: daniel_biologia@yahoo.com.br¹

Estudante do Curso de Doutorado da UMC; e-mail: joeltdf@gmail.com²

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes, e-mail: elisa@umc.br³

Área do Conhecimento: Microbiologia Aplicada

Palavras-chaves: Identificação; Biosurfactantes; Lipases; Efluentes

INTRODUÇÃO

Os efluentes de indústria de alimentos são caracterizados por altas concentrações de óleos, graxas, sulfatos, nitratos, fosfatos e conseqüentemente, possuem elevados valores de demanda química de oxigênio (DQO), apresentando baixa biodegradabilidade (CAMMAROTA & FREIRE, 2006). Processos alternativos que têm por objetivo a recuperação ou diminuição da carga orgânica de efluentes são de extremo interesse para a indústria. Neste contexto a técnica de Biorremediação pode ser empregada a fim de hidrolisar sólidos solúveis, principalmente gorduras, que interferem de forma negativa no Sistema de Tratamento de Efluentes (DORS, 2004). Biosurfactantes são moléculas anfifílicas consistindo de um domínio hidrofóbico e outro domínio hidrofílico. Estes compostos são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, o que permite misturar ou dispersar facilmente as emulsões em água ou outros líquidos. Compostos microbianos que são capazes de exibir particularmente elevada atividade emulsificante de superfície são classificados como biosurfactantes (HARROP *et al.*, 2003). Técnicas como instalação de caixas de gordura, flutuadores e tratamentos com adição de álcalis são utilizadas embora com baixa eficiência. A utilização de enzimas específicas como as hidrolases, lipases, pode ser de grande interesse para correções no sistema biológico causados pelo alto teor de lipídios. Este tipo de tratamento vem sendo pesquisado e apresenta algumas vantagens, tais como controle de produtos, a não geração de subprodutos tóxicos, condições moderadas de operação, redução de custos em termos de energia, além de enzimas imobilizadas poderem ser reutilizadas, tornando o processo atrativo do ponto de vista econômico e ambiental (RIGO, 2004).

OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi isolar e identificar bactérias de efluentes de indústrias frigoríficas com interesse biotecnológico. Como objetivos específicos foram avaliadas a produção de biosurfactantes por fermentação submersa e com base nos resultados, selecionadas as linhagens com maior produção de biosurfactantes para posterior aplicação na área de tratamento de efluentes.

METODOLOGIA

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram isolados de efluentes frigoríficos e cultivados em meio LB suplementado com 10 % de efluente e em meio TSA (Tryptic Soja Agar). Os isolados foram avaliados quanto a produção de biosurfactante e lipase como um método de seleção. O teste qualitativo do colapso da gota, que indica a

produção de biosurfactantes, foi realizado em tampas de microplacas com 96 poços, que foram untadas com 2 μL de óleo de motor 10 W-40 e deixadas em repouso por 24 h. Em seguida, 5 μL dos sobrenadantes das culturas foram colocados em cada um dos poços rasos e o espalhamento das gotas será avaliado após 2 min. O resultado será considerado positivo quando se percebeu visualmente o espalhamento da gota (YOUSSELF *et al.*, 2004). A medida da tensão superficial será realizada nos sobrenadantes de cultura utilizando-se o tensiômetro. As análises serão feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de *Du Nouy*. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel no momento no qual a lâmina do líquido vai se romper e é então determinada a tensão superficial (KRÜSS, 1994). A dosagem de proteínas no extrato bruto foi feita de acordo com o método proposto por Bradford (1976). Este método utiliza o Comassie Brilliant Blue G-250, que existe em duas colorações diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida a forma azul, funcionando como um corante para a proteína. A concentração de proteínas será calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA). Os isolados foram crescidos em 5 mL de meio LB a 28°C por 24 horas. Ao precipitado obtido foram adicionadas 500 μL de tampão TE, seguido de ressuspensão e centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm; em seguida serão adicionados mais 500 μL de TE mais 40 μL de SDS 10% e cerca de 0.5 g de sílica; após isto a suspensão foi agitada no Homogenizador de células por 60 segundos a 5000 rpm. Foram adicionado 500 μL de fenol misturado por inversão, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 250 μL de fenol e 250 μL de clorofórmio. Novamente os tubos foram misturados por inversão e centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm, adicionando mais duas vezes 450 μL de clorofórmio e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, ao sobrenadante foi acrescentando 450 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), em seguida feita a homogeneização da amostras e centrifugação nas mesmas condições anteriores; ao sobrenadante foi adicionado 0,1 do volume de NaCl (5 M) e 0,6 do volume de isopropanol gelado, esta mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12000 rpm. Após o descarte do sobrenadante o DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 40°C por 20 minutos e ressuspendido em 50 μL de água Milli-Q autoclavada, em seguida a integridade do DNA será observada em um gel de agarose 0,8%, a 70 volts; após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg mL⁻¹) e fotografado. Com a obtenção de DNA de boa qualidade, foi realizada a amplificação do gene 16S rDNA, com o uso dos primers R1387 e PO27F (TABELA 2). As reações de PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação de Cadeia da Polimerase) foram realizadas para um volume de 49 μL , contendo 31,75 μL de água Milli-Q autoclavada, 5 μL de PCR buffer (10X) (Invitrogen), 7,5 μL de MgCl₂ (25mM) (Fermentas), 4,0 μL de dNTP (2,5 mM), 0,1 μL de cada primer, 0,5 μL de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 1 μL de DNA molde (0,5 a 10 ng). As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; um minuto a 62,5°C; um minuto a 72°C, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 100 volts.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder para a observação do fragmento de aproximadamente 1400 pb amplificado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg. mL⁻¹) e fotografado. Com a amplificação do gene que codifica a região 16SrDNA, será feita a análise da variabilidade genética por ARDRA. Para isso, 10 μl do produto

amplificado será digerido com 0,21 μL da enzima de restrição HhaI (10U. μL^{-1}) (Invitrogen), 2,5 μL de tampão REact₂ (10X) (Invitrogen) e 5,04 μL de água Milli-Q autoclavada. O produto de digestão será separado em gel de agarose a 2 % a 5 V.cm⁻¹. O tamanho do produto amplificado será estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Após a eletroforese, o gel será corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg. mL⁻¹) e fotografado. Após o término das reações de clivagem por ARDRA, as fotos serão analisadas de acordo com o perfil de bandas de cada amostra, obtendo-se, deste modo, diferentes tipos de ribótipos. Os ribótipos serão então, submetidos ao seqüenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolamentos bacterianos foram obtidos a partir de quatro amostras de efluentes em diferentes lagoas de tratamento identificadas como RA, RB, RC e RD, utilizando como meios de cultura TSA (Tryptona Soja Ágar) e LB (Luria Bertani). Quinze linhagens foram obtidas (Tabela 1) com predominância de bactérias Gram positivas (10). Cinco isolados foram capazes de formar biofilmes (RC-A2, RC-A3, RB-A2, RD-A4 E RD-A5). Todos os isolados foram preservados em glicerol 40% à -18°C, para posteriormente serem realizadas as técnicas de extração de DNA, amplificação do gene 16s rDNA, ARDRA e o sequenciamento. A extração de DNA das linhagens e injeção no gel de agarose foi realizada, entretanto não houve a formação de bandas para todas as amostras, apenas para quatro delas, RB-A2, RD-A4, RD-A5, RA-2A1. O ensaio para identificação molecular segue em andamento, provavelmente a quantidade de DNA extraído das linhagens que não apresentaram bandas, tenha sido insuficiente.

Quadro 1. Caracterização bioquímica das linhagens bacterianas isoladas dos efluentes de frigoríficos.

Linhagens	ABS	Proteínas (mg/mL)	Biosurfactante	Lipases (rodamina b)	Gram
1.RC-A1	0,222	4,18E-03	+	+	-
2.RC-A2	0,155	3,37E-03	-	+	+
3.RC-A3	0,182	3,69E-03	+	+	+
4.RA-A1	0,233	4,31E-03	-	++	-
5.RA-A2	0,224	4,20E-03	-	++	+
6.RA-A3	0,225	4,21E-03	-	++	+
7.RA-2A1	0,139	3,18E-03	-	+	+
8.RA-2A2	0,237	4,36E-03	-	+	-
9.RA-2B	0,209	4,02E-03	-	+	+
10.RB-A2	0,149	3,30E-03	++	+	-
11.RD-A1	0,166	3,50E-03	-	+	+
12.RD-A2	0,187	3,75E-03	-	+	-
13.RD-A3	0,177	3,63E-03	-	+	+
14.RD-A4	0,201	3,92E-03	++	+	-
15.RD-A5	0,105	2,42E-03	-	+	+

++ maior produção / + menor produção

CONCLUSÕES

A partir de quinze linhagens de bactérias obtidas do isolamento de efluentes de frigorífico, foram selecionadas cinco, RA-A1, RA-A2, RA-A3, RB-A2, RD-A4. As três primeiras devido a expressiva produção de lipase e as duas últimas pela produção de lipase e biosurfactantes. A identificação molecular das linhagens segue em andamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMMAROTA, M.C; FREIRE D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Biores. Technol*, p. 2195-2210, 2006.

DORS, Gisanara. Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas. Dissertação (Mestrado), UFSC, Florianópolis, SC 2006.

RIGO, Elisandra. Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos. Dissertação (Mestrado), URI, Erechim, RS, 2004.

VANCE-HARROP, Mabel H.; GUSMAO, Norma B. de; CAMPOS-TAKAKI, Galba Maria de. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, 34 (2), 2003.

YOUSSELF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detected biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 56, 339-347, 2004.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a Deus em primeiro lugar; a minha orientadora professora Dr. Elisa Esposito e ao meu Co-orientador Joel Alexandre Meira pela orientação, paciência, amizade e os ensinamentos; a Universidade de Mogi das Cruzes por ter fornecido a bolsa e as condições para que tal projeto fosse realizado; ao Caio colaborador neste projeto; ao professor Wellington por permitir que eu realize parte dos experimentos no seu laboratório (LABMEM); ao Almir por todo apoio concedido na parte de identificação molecular a família e amigos.