

XI-106 – ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS VISANDO SUA UTILIZAÇÃO NA GERAÇÃO DE BIODIESEL

Celson Rodrigues⁽¹⁾

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal do Espírito Santo. Mestre em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa (1985). Doutorando em Engenharia Ambiental na Universidade Federal do Espírito Santo. Professor Adjunto do DPV-UFES.

Sérvio Túlio Alves Cassini

Biólogo pela Universidade Federal de Minas Gerais (1975). PhD. Microbiologia pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSSU) - EUA - 1988. Pós-Doutorado em Microbiologia Ambiental na Universidade do Tennessee - EUA - 1997. Prof. Adjunto do DHS e do PMEIA - UFES.

Ricardo Franci Gonçalves

Engenheiro Civil pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (1984). Doutor em Engenharia do Tratamento de Águas pelo Instituto Nacional de Ciências Aplicadas de Toulouse – França (1993). Prof. do DEA e do PMEIA - UFES.

Junko Tsukamoto

Engenheira Química (Universidade Presbiteriana Mackenzie). Mestre em Engenharia de Alimentos (UNICAMP). Doutora em Química (UNICAMP). Pós-Doutoranda em Engenharia Ambiental (UFES)

Emília Brito

Graduanda em Engenharia Ambiental na Universidade Federal do Espírito Santo. Graduada em Tecnologia de Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal de Tecnologia do Espírito Santo (IFES). Estagiária da Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustível (ANP).

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Saneamento – LABSAN. Av. Fernando Ferrari sn. - Goiabeiras – Vitória – ES – Brasil. CEP: 29060-970. Telefax.: (027) 3335-2165. E-mail: celsonrodrigues@yahoo.com.br

RESUMO

O biodiesel (ésteres etílicos de ácidos graxos) não produz óxido de enxofre e minimiza em 1/3 a emissão de particulados em comparação com o óleo diesel de petróleo, além de ser biodegradável, e não exigir modificação dos motores para sua utilização, o que o credencia como substituto daquele, em todos os países do mundo. As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas produzidas por animais, plantas e microrganismos, que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos, porém, na presença de baixas concentrações de água catalisam reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação, o que as credenciam a um vasto leque de aplicações industriais. Como alternativa tecnológica enzimática na produção de biodiesel, sua utilização não se encontra consolidada, apesar do potencial quando se pretende, por exemplo, utilizar resíduos oleosos do saneamento ambiental (OGR), como matéria prima. O objetivo deste trabalho foi o isolamento de microrganismos com alto potencial lipolítico, a partir de amostras ambientais, representadas por tecidos vegetais necrosados e insetos-pragas de plantas, solo e resíduos oleosos oriundos de atividades do saneamento (escumas de caixas de gordura residencial e de restaurante e, espuma de caixa de gordura e lodo de esgoto sanitário, visando sua utilização em uma rota etanólica enzimática para a geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento. Foi obtido um total de 113 isolados microbianos, com a utilização dos meios de cultura MB e MMOS_R. Destes, os fungos filamentosos totalizaram 100 isolados, pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Verticillium* sp. Outros treze (13) isolados foram de fungos leveduriformes. Foi testado o crescimento e a atividade lipolítica no meio de cultura MMOS_R, contendo óleo de soja comercial como única fonte de carbono. Características dos gêneros fúngicos citados são apresentadas de acordo com os resultados e, com as observações microscópicas e descrições da literatura.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiesel, Transesterificação Enzimática, Lípases, Resíduos Oleosos do Saneamento, Microrganismos, Isolamento.



INTRODUÇÃO

O biodiesel (ésteres etílicos de ácidos graxos) produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias primas oleosas, não produz óxido de enxofre e minimiza em 1/3 a emissão de particulados em comparação com o óleo diesel obtido do petróleo, além de ser biodegradável. Em função destas e de outras vantagens ambientais e, ao fato de não exigir modificações dos motores movidos a diesel para a sua utilização, podendo ser misturado ao mesmo ou utilizado exclusivamente, o biodiesel é considerado como um substituto para o óleo diesel convencional, em todos os países do mundo. Para a sua produção ainda é mais utilizada a catálise básica, vantajosa sob os pontos de vista de rapidez reacional e rendimento do processo, mas desvantajosa em função da inconveniência para matéria prima ácida e ou com teores elevados de água, bem como pelos resíduos do catalisador no final do processo, dificultando o aproveitamento do glicerol, subproduto do processo de produção.

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolases triacilgliceróis produzidas por animais, plantas e microrganismos, que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos, porém, na presença de baixas concentrações de água catalisam reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação, o que as tornam interessantes para uso industrial, com um vasto histórico de aplicações. As de origem microbiana são as mais utilizadas industrialmente, por sua relativa facilidade de produção, sendo na maioria extracelulares, pela maior estabilidade à variação térmica e de pH, pela alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enâncioseletividade e, pela diversidade de microrganismos capazes de sintetizá-las com potencial para exploração comercial. Como alternativa tecnológica enzimática na produção de biodiesel, sua utilização ainda não se encontra devidamente consolidada, apesar do seu potencial quando se pretende utilizar resíduos oleosos e ou gordurosos (OGR) do saneamento ambiental, como matéria prima, dada a elevada acidez, como no caso do óleo de fritura, e a presença de elevados teores de água que dificultam a catálise básica, no geral.

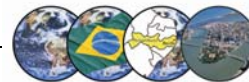
Lípases agem na interface e catalisam a hidrólise de gorduras e mono e diglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol, com vantagens de obtenção de produtos de alta qualidade e baixo consumo de energia. A principal desvantagem do processo de hidrólise lipolítica é o custo da enzima e, além desta, no caso específico da geração de biodiesel, como catalisadoras da reação transesterificação, maior tempo necessário à reação e menor rendimento do processo. Há que se considerar porém, que lipases estão envolvidas na reciclagem de material orgânico insolúvel na natureza, e o uso de substratos alternativos para a produção de meio ou produtos de alto-valor constituem vantagem sobre os processos tradicionais. A reciclagem corresponde ao que se conhece como “tecnologia limpa”, na qual materiais são sistematicamente usados e reusados para tornar a produtividade uma atividade ambientalmente sustentável.

A geração de novas lipases, com alta atividade sobre substratos específicos, como no caso de resíduos oleosos do saneamento ambiental (escuma de esgoto sanitário, escuma de caixas de gordura, e óleo residual de fritura), em quantidade suficiente para atender a uma contínua demanda, impulsionam a pesquisa por novas fontes destas enzimas, facilitada pela grande biodiversidade microbiana que dispomos no País. Bactérias e fungos (filamentosos e leveduriformes), hiperprodutores de lipases, podem ser isolados de resíduos industriais ou domésticos oleosos, de solos contaminados com óleos e graxas, de água, e de plantas e animais vivos ou mortos, como também de sementes de oleaginosas.

Em função do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi o isolamento de microrganismos com alto potencial lipolítico, a partir de amostras ambientais, representadas por tecidos vegetais necrosados e insetos-pragas de plantas, solo e resíduos oleosos oriundos de atividades do saneamento: escumas de caixas de gordura residencial e de restaurante e, escuma de caixa de gordura e lodo de esgoto sanitário de um sistema UASB-BF, pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), visando sua utilização em processos hidrolíticos de saneamento ambiental e, biocatalítico, em uma rota etanólica enzimática para a geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento, em pesquisa no Departamento de Engenharia Ambiental da UFES.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Saneamento – LABSAN, junto ao Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), localizada em Vitória, ES. Para garantir condições estéreis de crescimento dos



microrganismos, a água, os meios de cultura e/ou substratos, vidrarias e utensílios laboratoriais foram esterilizados em autoclave a 121°C (Autoclave vertical BIOENG, mod. A75, Ind.Brasileira), durante 20 min, ou estufa de esterilização a 180°C por 2 horas (Estufa de Secagem e Esterilização Fisher Scientific), após devidamente acondicionados. As pesagens de reagentes e meios de cultura foram efetuados em balança de precisão (marca SCIENTECH). Os isolados microbianos foram mantidos armazenados à temperatura de 5°C, em tubos de cultura com o meio BDA (batata-dextrose-ágar) conforme Menezes&Assis (2004).

ISOLAMENTO A PARTIR DE TECIDOS VEGETAIS NECROSADOS E DE INSETOS-PRAGAS DE PLANTAS

Para a obtenção de microrganismos procedeu-se o isolamento a partir de tecidos vegetais necrosados, por atividade fitopatogênica, de frutos de banana, limão, mamão, manga e de folhas de oiti, e também de insetos-pragas (formiga saúva, lagarta da goiabeira, lagarta do cartucho do milho, moleque da bananeira, gorgulho-do-milho, broca-do-cafeeiro, cigarrinha da cana-de-açúcar e de pastagens). Foi utilizado o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), com o pH corrigido para 6,0 usando NaOH 0,1 M. O método foi o de isolamento direto, descrito por Menezes&Assis (2004), com modificações, que consistiu na transferência de esporos presentes na superfície do tecido vegetal necrosado ou dos insetos-pragas mortos, para placas de Petri contendo 20 ml do meio BDA, acrescido de 1 mg de sulfato de estreptomicina e 1 mg de cloranfenicol, para evitar o desenvolvimento de bactérias e actinomicetos, em condições assépticas (Capela de Fluxo Laminar Vertical, marca CONFORS). A transferência de esporos dos fungos ocorreu com utilização de alça de repicagem descartável, ou com auxílio de um estilete flambado, usando o método de esgotamento em estrias (Tortora, 2005). As placas foram incubadas durante 96 horas, à temperatura de 28°C, no escuro. Após este período as colônias, com tipos morfológicos diferentes, foram repicadas, sucessivamente, para placas com os meios MB e MMOS_R (reacionais para atividade lipolítica extra e intracelular, descritos adiante), também com esgotamento em estrias até o completo isolamento, sendo então, os isolados fúngicos obtidos, repicados para tubos de cultura com o meio BDA e armazenados a 5 °C.

ISOLAMENTO A PARTIR DO SOLO E DE RESÍDUOS OLEOSOS DO SANEAMENTO

No caso da obtenção de microrganismos a partir do solo, os isolamentos ocorreram a partir de uma amostra coletada em uma área de pomar de mangueiras, localizada na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Vitória, ES. No caso da obtenção a partir de resíduos oleosos do saneamento, foram utilizados como fontes: lodo e escuma de esgoto sanitário, coletados na ETE-UFES (UASB-BF), e também escuma de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário desta Universidade. Foi também utilizada a escuma de uma caixa de gordura residencial, pertencente a um condomínio de apartamentos localizado em Vila Velha-ES.

Inicialmente procedeu-se o enriquecimento microbiano do resíduo oleoso. Para tal foi tomada uma alíquota de 10 ml do resíduo e transferida para um frasco erlenmyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio mínimo, acrescidos de 10% de óleo de soja (Liza). O frasco foi incubado em agitador rotativo (CERTOMAT MO, B.Braun Biotech International) a 30 °C, 120 rpm, por 96 horas. Para o isolamento dos fungos, na sequência, foram utilizados os meios de cultura reacionais MB (Meio Basal) e MMOS_R (Meio Mínimo + Óleo de Soja + Rodamina-B), de acordo com Hankin& Anagnostakis (1975) e Semionato (2006), com modificações na composição e nos procedimentos. O meio MB foi assim constituído (g/L): peptona – 10, NaCl – 5, CaCl₂ - 0,1, Agar – 15, e 1000 ml de água destilada, tendo o pH sido corrigido para 6,0, com NaOH 0,1 M. Como substrato lipídico foi utilizado o sorbitol monolaurato (Tween 80), autoclavado em separado, e acrescentado na proporção de 1%. Também acrescentados ao MB foram 50 mg de sulfato de estreptomicina e 50 mg de cloranfenicol, após resfriamento do meio para 45°C, antes de ser vertido nas placas de Petri. O MMOS_R teve, por sua vez, a composição por 1000 ml de água destilada, assim definida: (NH₄)₂ SO₄, 5,0 g; KH₂PO₄, 0,9 g; NaCl, 1,0 g; MgSO₄. 7H₂O, 0,3; Na₂HPO₄, 6,2 g; solução de micronutrientes, 1 ml; e, ágar, 15 g. O pH inicial foi de 6,5 (tampão fosfato 0,1 M). A solução de micronutrientes apresentou a seguinte composição, por 1000 ml: FeCl₃. 6H₂O, 2000 mg; ZnCl₂, 50 mg; CuCl₂. 2H₂O, 30 mg; MnCl₂. 2H₂O, 500 mg; (NH₄)₆.Mo₇O₂₄. 4H₂O, 50 mg; AlCl₃, 50 mg; CoCl₃. 6H₂O, 2000 mg; e, HCl (concentrado), 1 ml. A solução foi agitada em agitador magnético (Thermolyne, Cimarec 3) por 20 minutos e transferida para frascos erlenmeyers de 1000 para autoclavagem por 20 minutos a 120 °C, seguindo-se o seu armazenamento a 5°C, para posteriores utilizações. De forma equivalente ao MB foram acrescentados os mesmos antibióticos. Além destes, a este meio de cultura foi acrescentado o corante indicador Rodamina B (C.I. 45170 – Synth, Brasil) na concentração a 10mg/mL do meio de cultura e, o óleo de soja (Liza) na concentração de 10 % (v/v). Previamente o óleo de soja foi emulsificado com Tween 80, na concentração de 0,1 % acrescentado de 1 ml de água esterilizada, sob agitação em vortex (VORTEX MIXER, model VS-1300V, Vision Scientific CO. Ltda, Korea), por 5 minutos.

Para o isolamento foi retirada 1 g de cada resíduo oleoso previamente enriquecido, ao qual foram adicionados 100 ml de água destilada esterilizada e o frasco agitado manualmente por 1 minuto, para diluição e suspensão do conteúdo, e deixado em repouso por 5 minutos. Do sobrenadante foi coletada uma alíquota de 0,1 ml e transferida para a superfície de uma placa de Petri, contendo 20 ml do meio de cultura MB ou MMOS_R, solidificado, procedendo-se conforme o método de esgotamento por estrias (Tortora, 2005). Foram utilizadas seis placas para cada resíduo, três para cada meio de cultura, que foram incubadas a 28°C, por 96 horas, em condições de escuro, em estufa incubadora (DBO – Biotec BT424). As colônias fúngicas que apresentavam, no seu contorno, decorrido este período, um “halo opaco” (no meio MB) ou uma coloração “laranja fluorescente” (no meio MMOS) observada diretamente na biomassa, sob radiação UV, com comprimento de onda de 354 nm (Spectroline model EA – 160, EUA), foram repicadas sucessivamente, para placas de Petri com o mesmo meio de cultura, até o completo isolamento e purificação. Os isolados obtidos foram repicados para tubos de cultura com o meio BDA e armazenados a 5°C.

CRESCIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

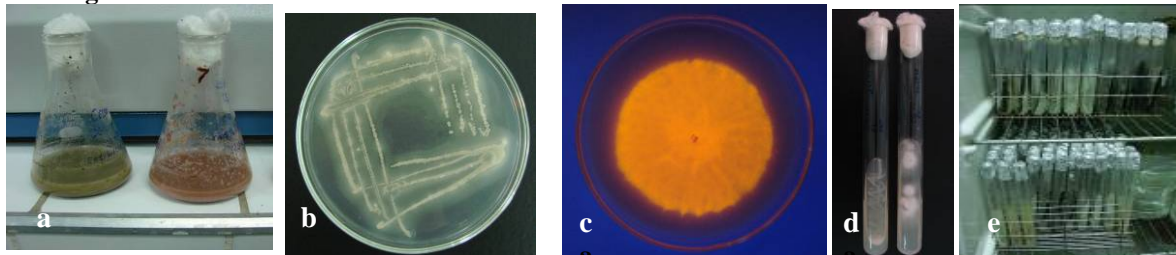
Todos os isolados de fungos filamentosos obtidos a partir da amostras ambientais, que apresentaram atividade lipolítica detectada nos meios de cultura MB e ou MMOS_R foram caracterizados quanto ao crescimento no segundo meio de cultura e, quanto à morfologia das colônias, sendo identificados ao nível de gênero, de acordo com Barnett & Hunter (1986) e Barnett *et. al.* (2000). Já os isolados de fungos leveduriformes, com atividade lipolítica detectada, foram somente caracterizados ao nível de crescimento no meio de cultura MMOS_R, que contem óleo de soja como única fonte de carbono.

Para quantificar o crescimento, em câmara de fluxo laminar, o meio MMOS_R foi distribuído em placas de Petri (100 mm x 10 mm), cerca de 20 ml por placa. Após a solidificação a placa foi inoculada no seu ponto central. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com triplicata para cada isolado analisado, representada por três placas de Petri. A incubação foi por 96 horas à temperatura de 28 °C, em condições de escuro, e as medições das colônias ocorreram decorridas 96 horas de incubação, utilizando régua milimetrada. Nesta ocasião foi também confirmada a presença da coloração “laranja fluorescente”, mostrada na Figura 1c, indicando atividade lipolítica intracelular, sob radiação UV, com comprimento de onda de 354 nm (Spectroline model EA – 160, EUA).

RESULTADOS

Foram obtidos 113 isolados microbianos, sendo que destes, 100 isolados corresponderam a fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Verticillium* sp. Outros treze (13) isolados foram de fungos leveduriformes. Todos os isolados foram caracterizados quanto ao crescimento e a atividade lipolítica em dois meios de cultura sólidos (MB e MMOS_R), conforme mostrado na Figura 1 e Tabela 1. Características destes gêneros fúngicos são apresentadas de acordo com observações microscópicas e descrições da literatura (Barnett & Hunter, 1986 e Barnett *et. al.*, 2000), na Tabela 2.

Figura 1: a) Microrganismos enriquecidos nos resíduos oleosos do saneamento; b e c) Crescimento e reações apresentadas pelos microrganismos nos meios de cultura MB e MMOS_R, respectivamente; d) microrganismos repicados para tubos de cultura; e) armazenamento dos tubos de cultura com microrganismos a 5°C.



Frascos erlenmeyers contendo a biomassa microbiana produzida nos resíduos oleosos do saneamento, ao final do processo de enriquecimento, podem ser vistos na Figura 1a. Nas Figuras 1b e 1c, são mostradas as biomassas microbianas produzidas nos meios de cultura sólidos MB e MMOS_R, respectivamente. A Figura 1e



mostra os microrganismos já transferidos para o meio de cultura BDA, inclinado em tubos de cultura, para o armazenamento à temperatura de 5°C, em geladeira, conforme visto na Figura 1e. Tal forma de armazenamento é usual em laboratórios de microbiologia e permite a manutenção de culturas fúngicas e bacterianas durante alguns meses, devido a redução do seu metabolismo. Com a exaustão e dessecação do meio de cultura é necessária nova repicagem para novos tubos com o meio BDA para a continuidade do armazenamento das culturas microbianas (Tortora, 2005).

O halo opaco observado na Figura 1 b, em torno da biomassa microbiana, é um indicativo de atividade lipásica extracelular, e decorre da formação, no meio MB, de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da lipase e pela completa degradação dos sais de lipídio (Hankin & Anagnostakis, 1975). A coloração “laranja fluorescente” observada na própria biomassa microbiana no meio de cultura MMOS_R (Figura 1c) indica atividade enzimática intracelular, conforme Haba *et. al.* (2000).

Tabela 1: Classificação e características dos isolados microbianos quanto à procedência, ao crescimento e a atividade lipolítica nos meios de cultura sólidos: meio básico (MB) e meio mínimo + óleo de soja + rodamina-B (MMOS_R), desconsiderados aqueles que não apresentaram reações em ambos os meios.

Classificação genérica/ (Nº de isolados)	Isolado	Procedência	Crescimento em MMOS _R (mm)*	Reação em MB	Reação MMOS _R
<i>Aspergillus</i> (5)	F92	Caixa de gordura do RU-UFES	**	+	-
	F31	Caixa de gordura do RU-UFES	**	+	-
	F68	Caixa de gordura do RU-UFES	32,3	-	+
	F79	Fruto de mamoeiro	**	+	-
	F81	Caixa de gordura do RU-UFES	44,0	+	+
<i>Beauveria</i> (25)	F9	Formiga saúva	4,5	+	+
	F35	Lagarta do cartucho do milho	6,5	+	+
	F36	Broca do café	7,8	+	+
	F37	Broca do café	7,8	+	+
	F38	Broca do café	5,0	+	+
	F39	Broca do café	6,7	+	+
	F40	Broca do café	9,3	+	+
	F41	Broca do café	5,8	+	+
	F42	Broca do café	7,3	+	+
	F43	Broca do café	5,8	+	+
	F44	Broca do café	5,2	+	+
	F45	Broca do café	3,8	+	+
	F46	Broca do café	5,8	+	+
	F47	Broca do café	5,8	+	+
	F48	Broca do café	4,8	+	+
	F49	Broca do café	5,5	+	+
	F50	Broca do café	5,8	+	+
	F51	Broca do café	5,5	+	+
	F52	Broca do café	7,5	+	+
	F53	Broca do café	7,2	+	+
	F54	Broca do café	5,5	-	+
	F55	Broca do café	5,3	-	+
	F56	Broca do café	6,7	-	+
	F59	Moleque da bananeira	7,0	-	+
	F60	Cigarrinha de pastagem	8,7	-	+
	F61	Cigarrinha da cana de açúcar	7,8	-	+
<i>Botrytis</i> (2)	F104	Caixa de gordura residencial	8,0	+	+
	F105	Caixa de gordura residencial	14,0	-	+
<i>Cladosporium</i> (4)	F27	Fruto de bananeira	**	+	-
	F28	Fruto de bananeira	**	+	-
	F76	Fruto de mamoeiro	6,7	+	+
	F98	Fruto de mamoeiro	6,0	+	+
<i>Colletotrichum</i> (6)	F64	Fruto de mangueira	**	+	-
	F65	Fruto de mangueira	10,7	+	+
	F66	Fruto de mamoeiro	**	+	-
	F71	Fruto de mamoeiro	**	+	-
	F26	Fruto de bananeira	**	+	-
	F72	Folhas de oití	13,2	+	+



Tabela 1: continuação.

Classificação genérica/ (Nº de isolados)	Isolado	Procedência	Crescimento em MMOS _R (mm)*	Reação em MB	Reação MMOS _R
<i>Fusarium</i> (6)	F10	Caule de bananeira	18,8	-	+
	F67	Fruto de mamoeiro	36,8	-	+
	F74	Fruto de mamoeiro	42,2	-	+
	F75	Fruto de mamoeiro	**	+	-
	F84	Solo de pomar de mangueira	7,3	-	+
	F103	Caixa de gordura residencial	27,0	-	+
<i>Geotrichum</i> (3)	F96	Caixa de gordura do RU-UFES	19,5	+	+
	F97	Caixa de gordura do RU-UFES	16,3	-	+
	F99	Caixa de gordura do RU-UFES	13,8	-	+
	F15	Caixa de gordura do RU-UFES	**	+	-
<i>Penicillium</i> (10)	F2	Caixa de gordura do RU-UFES	**	+	-
	F6	Caixa de gordura do RU-UFES	**	+	-
	F22	Caixa de gordura do RU-UFES	**	+	-
	F29	Fruto de bananeira	7,3	-	+
	F62	Fruto de bananeira	9,3	-	+
	F69	Caixa de gordura do RU-UFES	7,0	-	+
	F83	Solo de pomar de mangueira	10,5	-	+
	F102	Caixa de gordura residencial	6,0	+	+
	F110	Caixa de gordura residencial	**	+	-
	F12	Escuma de esgoto sanitário	38,7	-	+
<i>Rhizomucor</i> (5)	F18	Caixa de gordura do RU-UFES	59,5	-	+
	F19	Caixa de gordura do RU-UFES	34,3	-	+
	F106	Caixa de gordura residencial	56,0	-	+
	F113	Caixa de gordura do RU-UFES	35,7	-	+
	F7	Escuma de esgoto sanitário	3,0	+	+
<i>Verticillium</i> (1) Levedura (9)	F23	Lodo de esgoto sanitário	4,2	-	+
	F34	Fruto de bananeira	3,7	+	+
	F57	Fruto de bananeira	10,7	+	+
	F77	Fruto de bananeira	6,0	+	+
	F80	Fruto de mamoeiro	3,0	+	+
	F82	Fruto de mamoeiro	13,7	-	+
	F107	Caixa de gordura residencial	7,5	+	+
	F108	Caixa de gordura residencial	**	+	-
	F111	Caixa de gordura residencial	5,5	+	+

* Média de triplicatas e leitura com 96 horas de incubação a 28 °C e escuro.

** Inexistência de crescimento e ou biomassa rala e pouco perceptível, dificultando a medição da colônia.

Tem sido relativamente comum o isolamento de microrganismos lipolíticos a partir de várias fontes, como o solo, água, resíduos oleosos industriais e do saneamento, e de alimentos, ou outras ambientais (Andretta *et. al.*, 2007; Colen, 2006; Semionato, 2006; Dartora *et. al.*, 2005; Feitosa *et. al.*, 2003; Ko *et. al.*, 2005; Shukla&Gupta; 2007, Pimentel, 1996). No entanto, o isolamento a partir de amostras de insetos-pragas de plantas, afetados por microrganismos entomopatogênicos e, de tecidos vegetais necrosados pelo ataque de microrganismos fitopatogênicos, pouco tem sido citado, apesar de vários pesquisadores utilizarem nos seus testes tais microrganismos a partir de Coleções de Microrganismos mantidos por inúmeras Instituições em todo o mundo, como no caso de Colen (2006).

Em relação aos fungos filamentosos lipolíticos, os gêneros aos quais pertencem os isolados que apresentaram atividade lipolítica detectada neste trabalho, são compatíveis com os citados na literatura como maiores produtores de lipases, inclusive já produzidas e comercializadas, com inúmeras aplicações industriais. Exceção, no entanto, fazemos em relação à *Cladosporium*, *Botrytis* e *Verticillium*, com raras ou nenhuma citação na literatura, como no caso deste último.

Dentre os fungos filamentosos podem-se citar algumas espécies que vem sendo mais investigadas por vários pesquisadores, citados por Pimentel (1996) e Colen (2006): *Fusarium solani*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Gliocladium viride*, *Fusarium lateritium*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis*. Algumas das espécies melhores produtoras pertencem aos gêneros *Geotrichum*,



Penicillium, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. Sobre a produção de lipases por fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos, embora existam relatos, ainda são poucos. Podem ser citados em relação aos primeiros *Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Quanto aos segundos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Silva *et al.*, 2005).

Colen (2006) avaliou a capacidade de produção de lipase por 73 cepas fúngicas, 14 obtidas de coleções de cultura e 59 isoladas de amostras do solo do cerrado de Minas Gerais, com o emprego de técnicas de enriquecimento seletivo. O isolamento e seleção primária foram realizados em meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva, sais biliares e nutrientes. As colônias lipolíticas foram detectadas pela presença no meio opaco de uma zona clara ao redor delas. Vinte e uma cepas foram avaliadas como produtoras em potencial e a capacidade de produção determinada em condições de cultivo submerso e cultivo em estado sólido (seleção secundária). Apenas 7 delas foram selecionadas como boas produtoras. A cepa melhor produtora, foi identificada como *Colletotrichum gloeosporioides*. Isolados deste fungo também foram por nós obtidos e confirmaram o seu potencial lipolítico neste trabalho, porém em etapas subsequentes mostraram-se inferiores a alguns isolados fúngicos de outras espécies, embora com boa atividade lipolítica comprovada inclusive em meio líquido.

Ko *et.al.* (2005), utilizaram um meio seletivo para o isolamento de bactérias, actinomicetos e fungos de um solo agrícola. O meio foi adicionado de 0,1% de óleo de girassol emulsificado com 0,01% de Tween 80. O maior número de isolados lipolíticos obtidos foi de actinomicetos, seguidos por bactérias e fungos. Geralmente, pequeno percentual de bactérias do solo apresentaram atividade lipolítica, se comparadas aos dois outros grupos de microrganismos.

Haba *et al.* (1999) isolaram 47 cepas de bactérias, sendo que 40 apresentaram atividade lipolítica, utilizando o teste de rodamina B. Cepas de *Pseudomonas* sp.; *Bacillus* sp.; *Candida* sp.; *Rhodococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. degradaram óleos de oliva e de girassol. Afirmaram que *Pseudomonas* sp. são as melhores produtoras da lipase, especialmente *P. aeruginosa*.

Semionato (2006) isolou 27 cepas de bactérias provenientes de amostras retiradas da espuma dos dispositivos de remoção de gordura (ETE - UFES), as quais resultaram numa seleção de 19 cepas de bactérias lipolíticas, quando submetidas ao teste de Rodamina B.

O teste de rodamina B detecta a presença de lipase extracelular de microrganismo lipolítico com sensibilidade mínima de atividade lipolítica de 0,002 U/mg por proteína (Jette&Ziomek, 1994). A elevada sensibilidade do teste detecta atividade lipolítica mesmo em microrganismos que apresentam baixa produção de lipase extracelular (Haba *et al.*, 2000; Kouker & Jaeger, 1986). Em seu relato, estes pesquisadores observaram que a variação do tempo de incubação do teste é decorrente do tempo de crescimento de cada espécie de bactéria. No caso de vários gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Serratia*), o teste de rodamina B variou entre 24 e 72 horas a 30°C.

Em nosso trabalho, cujos isolados obtidos foram fúngicos, o meio mínimo mais 10 % de óleo de soja, acrescido de rodamina-B (que denominamos MMOS_R) propiciou ótima detecção de atividade lipolítica intracelular após 48 e, principalmente, 96 horas de incubação a 30°C, com o a típica coloração “laranja fluorescente”, visualizada sob radiação ultravioleta, ocorrendo diretamente na biomassa, sem que, no entanto, pudesse ser visualizado halo, com estas características, em torno da colônia. Já o meio MB, proposto por Hankin& Anagnostakis (1975), propiciou ótima detecção da atividade lipolítica extracelular, confirmando vários relatos em que os autores obtiveram bons resultados com a utilização deste método (Andretta *et.al.*, 2008; Dartora *et.al.*, 2005).

Neste trabalho este meio de cultura MB foi preparado com o Tween 80, em substituição ao Tween 20, originalmente utilizado. A concentração em ágar também foi modificada deixando de ser utilizada 20 g.L⁻¹ e sim 17 g. L⁻¹, o que parece ter facilitado a difusão das lipases produzidas e, conseqüentemente, a reação que leva a formação de cristais de cálcio do ácido láurico, visível como um halo opaco, que confirma a atividade lipolítica extracelular do microrganismo. Também foram utilizados antibióticos (sulfato de estreptomicina e cloranfenicol), aumentando a eficiência do processo, por evitar contaminações bacterianas e por actinomicetos, sem nenhum comprometimento detectável da expressão da atividade lipolítica dos isolados fúngicos obtidos.



O meio de cultura MMOS_R também teve acrescentado os antibióticos e, sua utilização com o propósito específico de isolamento de fungos filamentosos e leveduriformes, com a composição que propusemos e utilizamos, parece não ter precedentes na literatura.

Tabela 2: Gêneros de fungos filamentosos cujos isolados apresentaram atividade lipolítica detectada nos meios MB e ou MMOS_R e suas características morfológicas de acordo com Barnett *et. al.* (1986).

Gênero fúngico	Características morfológicas	Desenho
<i>Aspergillus</i>	Colônias de coloração amarela esverdeada e amarela amarronzada, micélio septado, conidióforos livres, conídios globosos e unicelulares, formados em cadeia, sobre columela, conidiogênese blástica fialídica. Fungo mitospórico, decompositor e ou fitopatígeno.	
<i>Beauveria</i>	Colônias de coloração branca e ou ligeiramente creme, cotonosa em flocos, micélio septado, conidióforos livres, conídios hialinos, globosos e unicelulares, acropleurógenos, conidiogênese blástica simpodial. Fungo mitospórico, decompositor e ou entomopatígeno.	
<i>Botrytis</i>	Colônias de coloração cinza a amarronzada, micélio septado; conidióforos livres, conídios limoniformes; conidiogênese blástica sincrônica. Fungo mitospórico, decompositor e ou fitopatígeno.	
<i>Cladosporium</i>	Colônias de coloração cinza escuro a esverdeadas; micélio septado; conidióforos livres; conidiogênese blástica acropetal, conídios ameroespóricos, didimospóricos ou fragmospóricos. Fungo mitospórico decompositor e ou fitopatígeno.	
<i>Colletotrichum</i>	Colônias de coloração branca a branca acinzentada ou esverdeada; micélio septado; conidióforos tipo acérvulo com a presença de setas negras; conídios ameroespóricos em forma de salsicha ou bastonetes. Fungos mitospóricos, decompositores e ou fitopatígenos.	
<i>Fusarium</i>	Colônias de coloração branco amareladas, amarronzadas e ou róseas, micélio septado; conidióforo tipo esporodóquio; macroconídios fusiformes e fragmospóricos; microconídios elípticos ou em forma de bastonetes, ameroespóricos, ambos hialinos. Fungo mitospórico, decompositor e ou fitopatígeno.	
<i>Geotrichum</i>	Colônias de coloração branca a creme, micélio septado e com características leveduriformes; conidióforos livres; conídios com posição acrógena, unicelulares, retangulares e catenulados; conidiogênese blástica. Fungo mitospórico, decompositor e ou fitopatígeno.	
<i>Penicillium sp.</i>	Colônias de coloração verde a verde acinzentadas ou azuladas; micélio septado, conidióforos livres; conidiogênese blástica fialídica, conídios catenulados, globosos, ovais ou elípticos. Fungo mitospórico, decompositor e ou fitopatogênico.	
<i>Rhizomucor sp.</i>	Colônias com coloração branco a amarronzada, cotonosa, micélio cenocítico, rizóides e estolões pobremente desenvolvidos, esporângios globosos e acrógenos esporangiosporos globosos e destituídos de flagelos, esporo de resistência tipo zigosporo. Fungo zigomiceto, decompositor e ou fitopatígeno.	
<i>Verticillium sp.</i>	Colônias de coloração branca e cotonosas; micélio septado; conidióforo verticilado; conídios unicelulares, elípticos e hialinos. Fungo mitospórico decompositor e ou fitopatígeno ou entomopatígeno.	



Foram obtidos 52 isolados com atividade lipolítica extracelular e 61 com atividade intracelular, dentre os 113 totais. Destes, 35 isolados apresentaram os dois tipos de atividade lipolítica. Portanto, 78 isolados fúngicos passaram à etapa subsequente de nossa pesquisa, na qual se procedeu uma seleção mais acurada, utilizando dois meios de cultura sólidos, e procedeu-se a quantificação do crescimento e dos índices enzimáticos (IE) respectivos. Esta etapa foi relatada através de outro artigo.

Desconhecemos relatos anteriores de trabalhos visando ao isolamento e avaliação de fungos filamentosos e ou leveduriformes a partir de amostras ambientais com a finalidade precípua de sua utilização direta ou indireta em processos biocatalíticos de transesterificação etanólica visando a produção de biodiesel, a partir da utilização de resíduos oleosos do saneamento. São, no entanto, abundantes os relatos destas pesquisas visando processos hidrolíticos e ou biocatalíticos aplicados a várias outros propósitos tecnológicos e ou industriais, com muitas lípases já produzidas industrialmente e comercializadas em todo o mundo, conforme já mencionamos anteriormente, inclusive voltados para o saneamento ambiental.

CONCLUSÕES

Os materiais e métodos utilizados permitiram a obtenção de isolados microbianos com potencial lipolítico extra e intracelular, a partir das amostras ambientais utilizadas, evidenciando-os através das reações apresentadas nos meios de cultura afins, permitindo uma pré-seleção, importante quando se parte de um grande número de isolados, em busca dos melhores, de forma viável técnico-científica e econômica.

Os isolados obtidos de amostras ambientais, que apresentaram atividade lipolítica extracelular, detectada no meio de cultura MB corresponderam a aproximadamente 46% e, a intracelular no meio MMOS_R, a aproximadamente 54% do total de isolados microbianos (113). Destes, apresentam reação lipolítica detectada em ambos os meios cerca de 31% dos isolados.

O meio de cultura MB, isoladamente, permitiu detectar de forma satisfatória a atividade lipolítica extracelular e o meio MMOS_R, isoladamente, a atividade lipolítica intracelular, ambos de forma simples, rápida e eficiente. O contrário não se verificou. Portanto, a utilização dos métodos e meios reacionais em conjunto, evitou que isolados microbianos fossem desconsiderados, quanto à atividade lipolítica extra e ou intracelular, quando dela eram dotados, no processo de isolamento a partir das amostras ambientais.

Os 78 isolados microbianos pré-selecionados nesta pesquisa (69 de fungos filamentosos e 9 de leveduras), foram avaliados em pesquisa subsequente, na qual se procedeu uma seleção, utilizando os meios de cultura MB e MMOS_R, através da quantificação dos índices enzimáticos (IE) no primeiro e, do crescimento microbiano em ambos.

O trabalho, considerado no seu conjunto, e em função das metodologias propostas e com êxito utilizadas, bem como por sua finalidade específica, caracteriza-se por não apresentar precedentes na literatura, constituindo-se, ao nosso entender em uma contribuição importante à área de saneamento ambiental e biocombustíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustível (ANP), através de sua representação junto à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), com relação à concessão de uma bolsa de estágio e a liberação dos recursos de taxa de bancada correspondente, e outros afins a esta pesquisa, contribuindo de forma importante com sua realização. Também ao PIBIC-UFES/CNPQ pela concessão de bolsa de iniciação científica que permitiu a participação de acadêmicos do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental, colaborando com a sua formação profissional.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRETTA, L.I.; DAMSCHI JUNIOR; ONOFRE, S.B. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases de águas residuárias de laticínios. *Biology & Health Journal*, v.1,n.1, 2. 2007.
2. BARNET, H.C.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. New York: Burgess Publ. 1986. 241 p.
3. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeast, characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
4. COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Belo Horizonte: UFMG, 2006. (Tese de Doutorado).
5. DARTORA, D.F.; HENDGESI, D.H.; SANAGALETTI, N.; CADORIN, T.L.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S.B. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Lipases a partir do Soro de Queijo. www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t165.doc.
6. FEITOSA, J.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R.; DALKE, C.R.; PASTRO, F.Z.; TALAMINI, A. Isolamento de microrganismos degradadores de compostos lipídicos de origem vegetal em amostras de águas da barragem do Rio Passaúna-Araucária, PR. *B.CEPPA*, v. n 2. 11. 2003.
7. HABA, E.; BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUÉS, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 40–44. 2000.
8. HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycol.*, v.67, p.597-607. 1975.
9. JETTE, J.F.; ZIOMEK, E. Determination of lipase activity a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Analytical Biochemistry* 219, 256-260. 1994.
10. KO, W.H.; WANG, I.T.; ANN, P.J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 597–599. 2005.
11. KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1: 211-213. 1987.
12. MENEZES, M.&ASSIS, S.M.P. *Guia prático para fungos fitopatogênicos*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2004.
13. PIMENTEL, M.C.B. Produção de lipases por fungos filamentosos: estudos cinéticos e síntese de ésteres. Campinas: UNICAMP, Instituto de Química, 1996. Tese de Doutorado em Química.
14. SEMIONATO, S; 2006. Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura; Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental; Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental; Universidade Federal do Espírito Santo.
15. SHUKLA, P.; GUPTA, K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation* vol. 2, nº 2:35-42, 2007.
16. SILVA, W.O.B.; MIDIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* 40: 321–326. 2005.
17. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.