



II-534 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL VIA SISTEMA DE RESPIROMETRIA AERÓBIA

Amaury Freire de Lima Junior⁽¹⁾

Biólogo graduado pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em 2007. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Pesquisador do LABSAN-DEA-CT-UFES.

Carolina Oliveira Falcone

Graduanda em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Aluna de Iniciação Científica pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

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 PME - UFES.

Junko Tsukamoto

Engenheira Química pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1995), MSc Engenharia de Alimentos UNICAMP, Dr Engenharia Química UNICAMP, Bolsista de Pós Doutorado na Universidade Federal do Espírito Santo.

Weberton Vitorino Gervásio

Graduanda em Química pela Faculdade de Administração Espírito-santense (FAESA). Pesquisador voluntário do LABSAN-DEA-CT-UFES.

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Engenharia Ambiental – Universidade Federal do Espírito Santo Av. Fernando Ferrari, s/n – Goiabeiras – Vitória – ES – Brasil - CEP: 29060-970 - Telefax: +55 (27) 3335-2165 / Tel: +55 (27) 3335-2165 e-mail: amauryjr82@yahoo.com.br

RESUMO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas que atuam no metabolismo microbiano, na hidrólise catalítica de óleos e gorduras por meio de reações de esterificação e transesterificação, influenciadas pelo teor de água no meio reacional. Recentemente, estas enzimas foram incluídas em possíveis rotas de produção de biodiesel onde atuam como biocatalisadores no processo de transesterificação. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade lipolítica em cepas bacterianas isoladas a partir de amostras de resíduos do saneamento, representadas pela espuma de caixa de gordura, visando à avaliação de sua capacidade hidrolítica em ensaios de bancada. A atividade lipolítica foi avaliada por espectrofotometria, pelo método de respirometria aeróbia e pelo teor de óleos e graxas, utilizando diversos tipos de substratos. A atividade lipolítica dos isolados bacterianos evidenciou uma resposta diversificada variando de 0,09 U/mg a 15,20 U/mg de proteína. A cepa “C1” inoculada em meio mínimo com óleo de soja, apresentou valores médios de atividade lipolítica de 15,20 U/mg de proteína. Esta atividade representa cerca de 80% em relação à atividade da enzima comercial utilizada. Nos estudos de respirometria e decaimento de O₂ e G, pôde-se observar que, durante o período avaliado, os diferentes potenciais de degradação estão intimamente ligados à atividade lipolítica das cepas por espectrofotometria. As maiores produções de CO₂ foram observadas para a lipase comercial, seguida pela cepa “C1”, variando de 313,64 a 1563,89 mg de CO₂.

PALAVRAS-CHAVE: Isolados bacterianos; Lipases; Atividade lipolítica; Respirometria aeróbia.

INTRODUÇÃO

Os lipídeos são caracterizados por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres que, juntamente com proteínas e carboidratos, compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias. Mundialmente é estimada uma produção anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas [1]. Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes [2]. No Brasil, os setores de indústrias de carne e laticínios são responsáveis por uma boa parte da economia do país. Em 2005, 21×10⁹ L de leite foram produzidos no Brasil [3], gerando aproximadamente 84×10⁹ L de efluentes.



Com o aumento da atividade industrial no Brasil, também ocorreu um aumento na quantidade de efluentes gerados, os quais, na sua maioria, não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, aumentando o impacto ambiental, tornando-se um preocupante problema ambiental. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente, pelo artigo 34 da resolução nº 357 de 17 de março de 2005, estabeleceu que para o lançamento de efluentes em corpos hídricos a concentração máxima de óleo mineral é de até 20 mg/L e para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L [4]. Com essas condições da resolução CONAMA, os efluentes das indústrias com elevados teores de lipídios enfrentam um desafio. Os teores de O&G dos efluentes variam de acordo com o tipo de atividade da indústria: 200 a 2000 mg/L para as indústrias de laticínios; 500 mg/L a 16000 mg/L para as indústrias de extração de óleos vegetais [5]. Comparando-se esses valores com os valores estabelecidos percebe-se a necessidade de tratamentos para esses efluentes.

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) que são atuantes no metabolismo de microrganismos, hidrolisam especificamente óleos e gorduras, liberando ácidos graxos e glicerol. No entanto, em ambientes aquo-restritos essas enzimas catalisam diversas outras reações, como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação [6]. A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial biotecnológico e a aplicação das mesmas é fundamental para a produção de biodiesel pela rota enzimática, um biocombustível que apresenta vantagens ambientais em relação aos combustíveis fósseis.

Nesta pesquisa foram utilizados quatro diferentes tipos de resíduos oleosos, as amostras desses resíduos foram coletadas a partir de caixas de gordura residencial (ETE-UFES) e de restaurante (RU-UFES), uma amostra de óleo de fritura, e lodo UASB (ETE-UFES) adicionado de óleo de soja. Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância das bactérias como produtores de enzimas, justifica-se a busca de novas cepas com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise. Com base nestes aspectos, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar bactérias lipolíticas a partir de espuma coletada em caixas de gordura, e avaliar sua atividade sobre resíduos oleosos e ou gordurosos derivados de atividades do saneamento ambiental e com potencial para utilização como matéria prima na produção de biodiesel.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análise físico-química dos resíduos oleosos e/ou gordurosos

Os parâmetros físico-químicos analisados foram: pH, Umidade, DQO total, DBO₅, Sólidos Voláteis e Óleos e Graxos (O&G) segundo as metodologias descritas no “Standard Methods for the Examination of Water and Waster” [7], referenciadas na Tabela 5. O percentual de óleo de soja utilizado no Lodo UASB foi de 5% em volume. Para avaliar a DBO₅ do óleo de fritura, foi necessário além da diluição e introdução de nutrientes, adicionar "semente", ou seja, uma porção de esgoto com DBO₅ conhecida para corrigir o resultado final.

Isolamento e caracterização de bactérias potencialmente lipolíticas

As bactérias foram obtidas a partir de amostras de espuma coletadas de caixas de gordura residencial e do restaurante universitário da UFES. Preliminarmente ao isolamento procedeu-se o enriquecimento bacteriano, conforme descrito por Semionato [8], com modificações. Uma alíquota de 10 g de espuma foi transferida para Erlenmeyer de vidro de 250 mL, contendo 5 mL de óleo de soja comercial (Liza[®]) e 50 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi preparado em um frasco de um litro: 1,0 mL de fungicida comercial Nistatina (Micostatin, B-MS, EUA); 1,0 g NaCl (Synth, Brasil); 5,0g (NH₄)₂ SO₄ (Synth, Brasil); 6,2g de Na₂HPO₄ (Synth, Brasil); 0,9g KH₂PO₄ (Synth, Brasil); 0,3g MgSO₄ · 7H₂O (Synth, Brasil); e óleo de soja comercial (Liza[®]) como fonte de carbono (5% v/v). Essas amostras foram incubadas por 120 horas em temperatura de 30°C em shaker de mesa a 120 rpm.

As bactérias isoladas foram inoculadas em placas de Petri com meio mínimo sólido contendo fungicida comercial Nistatina, emulsão óleo e Tween 80 (Vetec, Brasil) e indicador Rodamina B (C.I. 45170 – Synth, Brasil) a 10mg/mL a 30°C por 24 a 48 horas. As colônias bacterianas também foram submetidas ao teste de Gram, testes bioquímicos de catalase, coagulase, indol e vermelho de metila (Reagen, Brasil), todos conforme Silva [9] para sua caracterização.

Avaliação da atividade lipolítica de cepas bacterianas por espectrofotometria

Neste experimento foram utilizadas as cepas bacterianas que obtiveram resultados positivos do teste de Rodamina B. O substrato oleoso utilizado foi óleo de soja (Liza[®]). As cepas foram inoculadas em 50 mL de



meio de cultura mínimo líquido com óleo de soja comercial (5% em v/v), contidos em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram submetidos à agitação de 120 rpm, sob temperatura de 28°C. O período total de incubação foi de 120 horas. Para as análises, a mesma cepa foi inoculada em dois Erlenmeyers, e de cada um foi coletado três amostras (triplicata). Decorrido o período de incubação bacteriana para as análises, uma amostra de 1 mL foi colocada em eppendorf estéril e centrifugada a 15000 g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido, denominado de extrato protéico, foi utilizado para dosagem de proteínas e atividade enzimática. A metodologia utilizada para a dosagem de proteínas do extrato protéico foi de acordo com Bradford [10] e para dosagem da atividade lipolítica, de acordo com Winkler & Stuckmann [11].

Sistema de Respirometria Aeróbia

Com a finalidade de avaliar a degradação dos compostos em estudo, foi montado um sistema de respirometria aeróbia estático. Em potes plásticos herméticos de 900 ml adicionaram-se amostras de 100g da mistura areia-vermiculita adicionadas de 50% de sua capacidade de campo de Meio Mínimo (MM) líquido, cepas liofilizadas na proporção de 10^7 UFC/g de vermiculita em pó, utilizada como veículo de inoculação, e a dose de resíduos oleosos. Para cada tipo de resíduo houve também um tratamento com a solução de lipase comercial AK Amano 20 (Amano Co., Japão) diluída em água destilada estéril para obter uma concentração 5 mg/mL, em substituição às cepas liofilizadas. O sistema foi colocado ao abrigo da luz (sistema *dark*) por um período de 30 dias. Os resíduos oleosos utilizados nos experimentos como fontes de matéria orgânica foram: Escuma da caixa de gordura da ETE, escuma da caixa de gordura do restaurante universitário (UFES), lodo UASB (ETE-UFES) adicionado de 5% de óleo de soja comercial (Liza®) para igualar o teor de O&G dos demais resíduos, e óleo de fritura de origem doméstica, utilizado à temperatura de aproximadamente 170°C, no preparo de alimentos. Os resíduos oleosos foram levados à estufa a 60°C até atingirem o mesmo teor de O&G.

Planejamento experimental e análise estatística

Foram calculadas as estatísticas descritivas e elaborados gráficos de média para as variáveis estudadas. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) dos dados para analisar as variações e significâncias da produção de CO₂ e do teor de O&G entre os tratamentos, seguida do teste Tukey (5%) para a comparação entre as médias dos tratamentos. Os dados de respirometria e O&G foram analisados aos 30 dias, uma vez que os experimentos são cumulativos. A medida de respirometria foi feita diariamente na primeira semana e de dois em dois dias a partir do oitavo dia. Os O&G foram avaliados aos 0, 10, 20 e 30 dias. Os experimentos realizados nesta pesquisa foram Experimentos Fatoriais, conforme o desenho experimental (Figura 1). O experimento foi composto no total por 78 unidades experimentais.

$$4 \text{ Resíduos} \times \begin{pmatrix} 4 \text{ Cepas} \\ \text{Lipase} \\ \text{Controle} \end{pmatrix} + \text{Branco} + (\text{Areia} + \text{Vermiculita}) + \text{NaOH}$$

Figura 1: Desenho experimental do Sistema de respirometria aeróbia

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise físico-química dos resíduos oleosos e/ou gordurosos

Os parâmetros físico-químicos verificados na caracterização dos resíduos oleosos foram: pH, Umidade, DQO total, DBO₅, Sólidos Voláteis e Óleos e Graxas conforme pode ser observado na Tabela 1.



Tabela 1: Dados físico-químicos dos resíduos oleosos derivados de sistema de tratamento de esgoto.

| Resíduo | Umidade (%m/m) | SV (%m/m) | DQO _t (mgO ₂ /L) | DBO ₅ (mgO ₂ /L) | pH | O&G (g/L) | DQO/DBO |
|----------------------------------|----------------|--------------|--|--|-------------|---------------|---------|
| Óleo de fritura | 10,02 | 89,91 | 180000 | 80000 | 4,63 | 906,70 | 2,25 |
| Lodo UASB (5% de O. de soja v/v) | 92,44 | 6,34 | 92000 | 46000 | 7,18 | 38,81 | 2,00 |
| Escuma R.U. | 97,65 | 2,23 | 12500 | 6100 | 5,65 | 33,42 | 2,05 |
| Escuma ETE | 92,56 | 6,25 | 205000 | 95000 | 5,88 | 40,80 | 2,16 |

O resíduo oleoso proveniente da escuma de ETE apresentou elevadas taxas de DQO_t e DBO₅, 205000 e 95000 mg de O₂/L, respectivamente. Esses resultados indicam que o resíduo da ETE-UFES apresentou grande concentração de matéria orgânica, uma vez que este resíduo é proveniente de esgoto doméstico e, portanto possui uma elevada carga de detergentes, O&G, restos alimentícios e excretas, fatores estes que contribuem para alta demanda química e bioquímica mensurada, e também podem explicar os elevados teores de O&G. O óleo de fritura apresentou a maior taxa de sólidos voláteis (89,91 %m/m), de O&G (906,70 g/L) e menor pH (4,63) e umidade (10,02 %m/m). O pH apresentado pelo óleo de fritura pode ser explicado pela presença de ácidos graxos nesse tipo de amostra, enquanto a umidade foi resultado de resíduos dos alimentos utilizados no processo de fritura.

Oswal et al. [12] observaram que o efluente de usina de óleo de palma constituído basicamente de resíduos de lignocelulose com uma mistura de carboidratos e óleo continha aproximadamente 250000 mg/L de DQO. Estudos de águas residuárias provenientes de indústrias alimentícias contêm uma DBO de até 100000 mg/L e DQO de até 130000 mg/L [13]. Cammarota, Texeira e Freire [14] pesquisaram águas residuais recolhidas a partir de caixa de gordura de uma cooperativa leiteira e estas apresentavam as seguintes características: pH = 2,8-4,8; DQO = 10000-12000 mg/L; DBO₅ = 7000-9000 mg/L; óleos e graxas = 200 - 1200 mg/L. Os relatos de literatura sobre resíduos que têm elevadas concentrações de O&G, geralmente apresentam grandes cargas de matéria orgânica. Isto contribui para o entendimento dos dados obtidos na presente pesquisa. A relação DQO/DBO dos resíduos oleosos analisados, que mede a fração biodegradável do resíduo, foi em torno de 2. Esta relação indica que aproximadamente 50% dos resíduos têm potencial de biodegradação.

Isolamento e caracterização de bactérias potencialmente lipolíticas

Foram isoladas 24 cepas bacterianas por meio de esgotamento em estria. Essas cepas foram submetidas ao teste de Rodamina B, resultando numa seleção de 18 cepas de bactérias lipolíticas especificadas como “C1” a “C8”; “C10” a “C13”; “B1”; “R1”; “R2”; “R4”; “R6”; “R7” e a cepa comercial “J”.

Avaliação da atividade lipolítica de cepas bacterianas por espectrofotometria

A avaliação de atividade lipolítica [11] indica a ação da enzima lipase ao hidrolisar o p-nitrofenil palmitato (p-NPP) em pH 8,0, liberando o nitrofenil e gerando uma coloração amarela, a qual foi quantificada a 410 nm de absorção pelo espectrofotômetro. A atividade lipolítica por proteína das 19 cepas de bactérias lipolíticas selecionadas através do teste de rodamina B é mostrada na Figura 2.

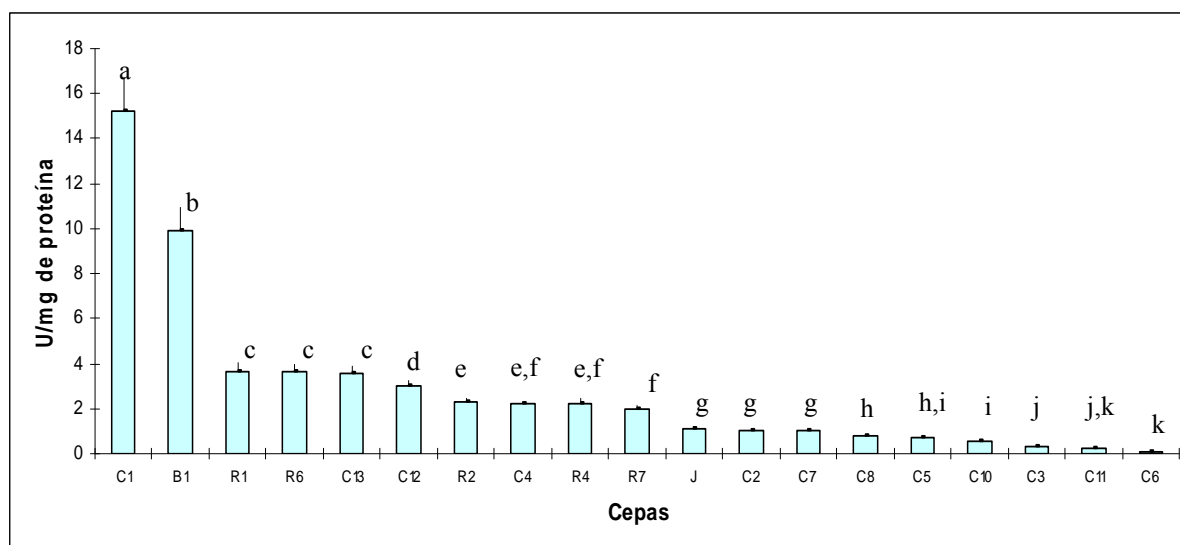


Figura 2: Atividade lipolítica em U(μ mol/min) por mg de proteína das cepas selecionadas após 120 horas de enriquecimento e grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$), pelo teste de Tukey.

Os resultados observados, utilizando meio mínimo adicionado de óleo de soja, evidenciaram uma resposta diversificada variando de 0,09 U/mg (C6) a 15,20 U/mg (C1) de proteína. O resultado do teste F (ANOVA), feito com o objetivo de comparar os valores de atividade lipolítica entre as 19 cepas, indicou diferença significativa entre as cepas ao nível de 95 % de confiança, gerando 11 grupos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j e k).

A atividade lipolítica encontrada neste estudo para as cepas C1 e B1 está dentro da faixa de atividade lipolítica de lipases comerciais como a Lipase FAP (fornecida pela Amano Internacional Enzyme Co., Japão), que segundo Gioielli, Oliveira e Oliveira [15] em seu estudo variou de 0,56 a 22,74 U/mg de proteína. Testes de atividade lipolítica com lipases de *Xylella fastidiosa* e *Pseudomonas aeruginosa*, incubadas a 37°C por 30 minutos utilizando azeite de oliva comercial, apresentaram atividade de 5,53 U (μ mol/min) e 11,66 U (μ mol/min), respectivamente. Foi utilizado o método titrimétrico com solução de NaOH (0,01N) e fenolftaleína 1% em etanol como indicador [16]. Apesar dos valores de atividade lipolítica das cepas estudadas nesta pesquisa encontrarem-se próximos ao da faixa de atividade lipolítica das enzimas testadas no estudo de Bogo [16], o tempo de incubação, a fonte de carbono e o método de determinação da atividade utilizado por esse autor foram distintos daqueles utilizados na presente pesquisa. Consequentemente, a atividade encontrada para *Pseudomonas aeruginosa* (11,66 U) foi menor do que a atividade detectada para a cepa C1 (15,20 U) desta pesquisa. No entanto, o tempo de experimento do autor mencionado, foi de 30 minutos, ou seja, o dobro do tempo de incubação do experimento desta pesquisa. Nota-se, com isso, a importância do tempo de incubação, e, principalmente, do método de determinação utilizado para aferir a atividade enzimática.

Avaliação do processo de biodegradação aeróbia por respirometria

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados por meio da produção acumulada de CO₂ (Figura 3). As cepas bacterianas selecionadas para o sistema respirométrico foram às cepas C1, B1, R1 e a bactéria comercial japonesa (J). As cepas C1 e B1 apresentaram atividade lipolítica alta, R1 média e J baixa. Os resíduos oleosos das caixas de gordura do restaurante universitário (RU), da ETE-UFES, óleo de fritura e Lodo UASB, foram combinados com as bactérias C1, B1, R1 e J, separadamente.

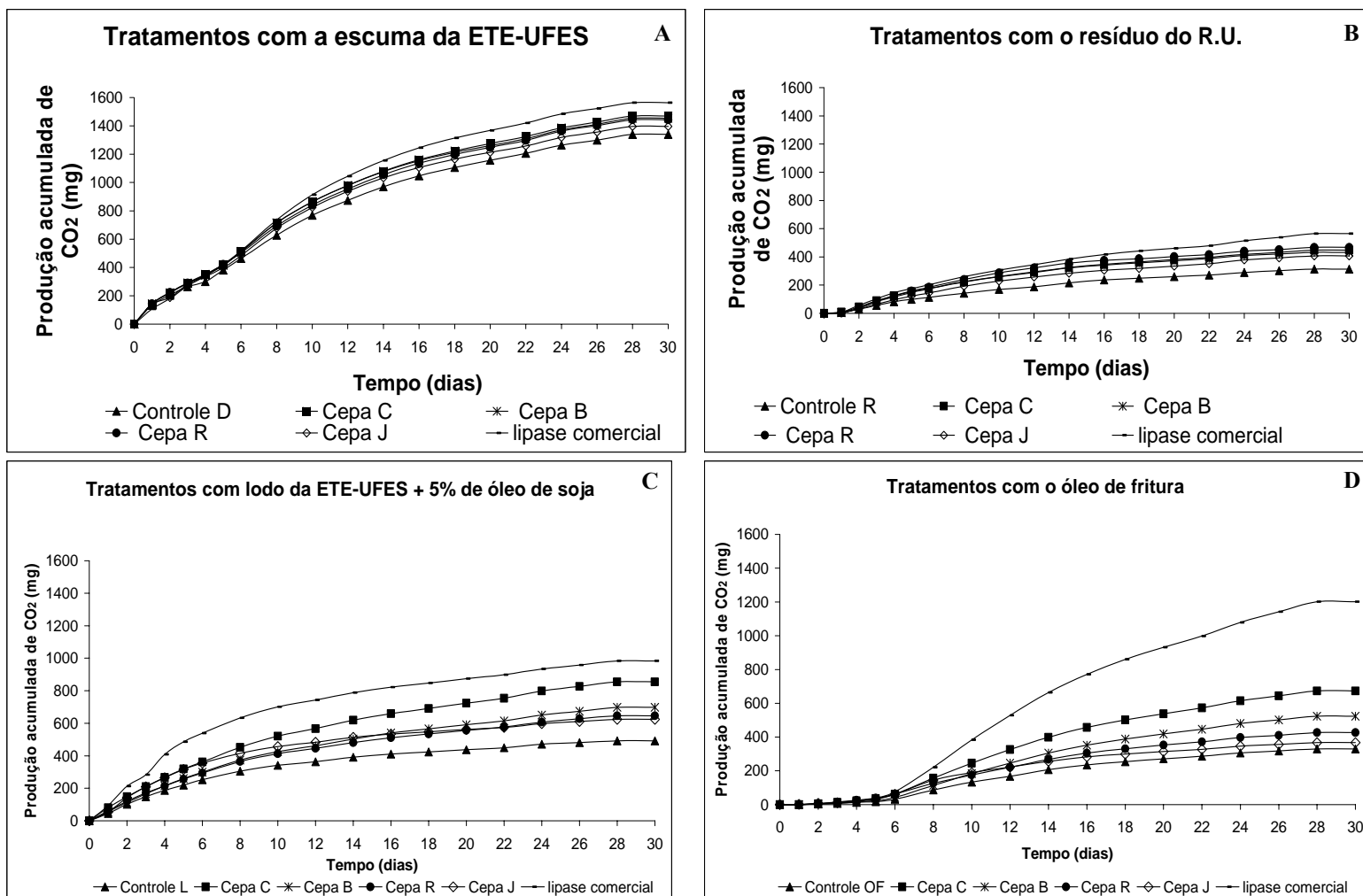


Figura 3: Comparação da produção cumulativa de CO₂ (mg.100⁻¹ g de substrato) nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e ou gordurosos. (A) resíduo da caixa de gordura ETE-UFES, (B) resíduo da caixa de gordura do R.U.-UFES, (C) lodo UASB ETE-UFES e (D) óleo de fritura.

As menores produções de CO₂ nos tratamentos com a espuma do dispositivo de remoção de gordura da ETE-UFES (Figura 3-a) ocorreram no controle, ou seja, tratamento sem inóculo (1340,02 mg CO₂). A análise estatística (ANOVA) dos dados originados na degradação do resíduo da ETE-UFES pelos diversos tratamentos gerou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), aos 30 dias de experimento. A lipase comercial apresentou a maior produção de CO₂ (1563,89 mg de CO₂), seguida da cepa C1 com 1469,38 mg de CO₂. As elevadas taxas de degradação na espuma da ETE-UFES se devem à presença de uma grande microbiota intrínseca do resíduo e a alta carga de matéria orgânica medida indiretamente pela DQO do resíduo (aproximadamente 205000 mg de O₂/L). A relação DBO/DQO da espuma de ETE-UFES foi 2,16, o que indicou a grande biodegradabilidade do resíduo. No entanto, os dados se mostraram relativamente mais homogêneos, pois as diferenças de produção de CO₂ entre os tratamentos foram menores se comparados aos outros resíduos. Isto ocorreu porque o resíduo da ETE-UFES apresentou a maior microbiota no início (1183 UFC/g de substrato seco) e no final (2171 UFC/g de substrato seco) do experimento, ou seja, a grande população microbiana teve influência na produção de CO₂ e permitiu pouca diferença entre os tratamentos realizados com as cepas lipolíticas.

Os tratamentos com o resíduo proveniente do dispositivo de remoção de gordura do RU-UFES apresentaram as taxas de degradação mais baixas variando entre 313,64 e 565,30 mg CO₂ (Figura 3-b). Estas taxas de degradação ocorreram no controle (sem inóculo) e no tratamento com a lipase comercial. As baixas taxas de degradação podem ser associadas à baixa carga de matéria orgânica apresentadas por esse resíduo, se comparada aos demais resíduos oleosos. A DQO e a DBO do resíduo da caixa de gordura do RU-UFES foram 12500 e 6100 mg de O₂/L, respectivamente e essas foram as menores concentrações encontradas nos resíduos



oleosos analisados neste experimento. No entanto, a relação DBO/DQO da espuma do RU-UFES foi 2,05, indicando a possibilidade de biodegradação do resíduo, mas o fator concentração de matéria orgânica medido pela DQO teve maior influência nos resultados e não possibilitou grande produção de CO₂ nos tratamentos realizados na espuma do RU-UFES. Pode-se creditar o bom desempenho da cepa R1 neste resíduo à especificidade cepa – substrato, pois esta cepa bacteriana foi isolada do mesmo resíduo (RU-UFES) no qual apresentou elevada produção de CO₂, se comparada aos tratamentos com outras cepas bacterianas.

O lodo UASB ETE-UFES foi adicionado de 5% de óleo de soja para elevar sua concentração de O&G, aproximando-o da concentração encontrada nos demais resíduos oleosos e ou gordurosos. Os tratamentos apresentaram taxas de degradação variando entre 491,67 e 982,79 mg CO₂ (Figura 3-c). Estas taxas de degradação ocorreram no controle (sem inóculo) e no tratamento com a lipase comercial. A produção de CO₂ do lodo UASB adicionado de óleo de soja está também relacionada ao pH, próximo a 7, ideal para o crescimento de microrganismos lipolíticos e saprófitos, ou seja, o pH ideal para o desenvolvimento das células microbianas permitiu a elevada produção de CO₂, captada pelos respirômetros.

Os tratamentos com o óleo de fritura, controle (sem inóculo) e com lipase comercial, apresentaram as taxas de degradação mais distintas variando entre 329,18 e 1271,79 mg CO₂. O óleo de fritura apresentou o maior período de aclimação, aproximadamente 5 dias, neste período houve uma pequena taxa respirométrica. Esta é uma fase de adaptação dos microrganismos ao novo ambiente denominada fase lag [17], e a atividade marcante no resíduo é a lise dos triacilgliceróis pelas cepas lipolíticas inoculadas, uma vez que este resíduo apresentou pouca ou nenhuma microbiota inicial. A lipase comercial apresentou a maior produção de CO₂ (1201,79 mg de CO₂). Isto ocorreu porque uma grande concentração de lipase (5 mg/mL) foi utilizada neste tratamento, estas enzimas hidrolisam triacilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol que são compostos de mais fácil assimilação por microrganismos. Estes por sua vez, utilizam o substrato na alimentação, e na lise desses compostos para obtenção de energia necessária para desempenhar as funções vitais, liberando CO₂ no processo respiratório.

Trabalhos recentes de respirometria aplicada à degradação de matéria orgânica do solo e da torta de filtro demonstraram uma produção total de CO₂ acumulado superior a 1216 mg de CO₂ em 72 dias de ensaio nos experimentos com uso de 28 mg/ kg de cádmio e com uma relação C/N de 11,1 na torta de filtro empregada [18]. Segundo Pedroti [19], a produção de CO₂ dos tratamentos realizados por 29 dias com óleo bruto 1 na proporção de 5 % v/v, utilizando o substrato areia-vermiculita, pode chegar a 250 mg de CO₂. Estes resultados mostram que a produção de CO₂ está relacionada ao tempo de experimento, já que o estudo de Firme [18] ocorreu em 72 dias, ou seja, mais que o dobro da duração desta pesquisa e obteve produção de CO₂ similar a alguns tratamentos realizados neste estudo. O tempo de experimento das pesquisas referidas, Firme [18] e esta pesquisa, foram distintos, mas a produção de CO₂ foi similar porque o tipo e as características físico-químicas do substrato analisado nos ensaios de respirometria eram diferentes. Os trabalhos de Firme [18] e Pedroti [19] utilizaram como substrato torta de filtro (com uma relação C/N de 11,1) e óleo bruto (com 0,9039 g/cm³ de densidade relativa e °API igual a 40), respectivamente, porém este estudo foi realizado com espuma da caixa de gordura da ETE-UFES como substrato, que apresentou uma DQO de aproximadamente 205000 e relação C/N de 6,46, representando um resíduo com características completamente distintas daquelas apresentadas pelos substratos das demais pesquisas citadas.

CONCLUSÕES

Foi isolado um total de 24 cepas bacterianas, a partir de resíduos oleosos oriundos de dispositivos de retenção de gordura. Destas, 18 foram selecionadas pelo método de rodamina-B como bactérias lipolíticas e especificadas como “C1” a “C8”; “C10” a “C13”; “B1”; “R1”, “R2”, “R4”, “R6”, “R7”, somadas a cepa comercial “J”, demonstrando que estes dispositivos são uma fonte importante dessas bactérias.

A atividade lipolítica dos isolados bacterianos evidenciou uma resposta diversificada variando de 0,09 U/mg a 15,20 U/mg de proteína. Neste experimento, a cepa C1 apresentou os valores médios de atividade lipolítica mais elevados. A atividade lipolítica encontrada neste estudo para as cepas C1 e B1 (120 horas de enriquecimento a 28°C e 120 rpm) está dentro da faixa de atividade lipolítica de lipases comerciais como a Lipase FAP (fornecida pela Amano Internacional Enzyme Co., Japão), que segundo Gioielli, Oliveira e Oliveira (1999) em seu estudo variou de 0,56 a 22,74 U/mg de proteína.



As cepas que apresentaram maior atividade lipolítica por espectrofotometria demonstraram maior crescimento nas placas com rodamina-B, desta forma a rodamina-B se demonstrou um bom pré-seletor, pois obteve correlação com a atividade lipolítica.

No experimento de respirometria, pôde-se observar que, durante o período avaliado, as cepas mostraram diferentes potenciais de biodegradação, avaliadas em termos de produção de CO₂. Os diferentes potenciais de degradação estão intimamente ligados à atividade lipolítica das cepas por espectrofotometria. As maiores produções de CO₂ foram observadas para a lipase comercial, seguida pelas cepas C1 e B1, variando de 313,64 a 1563,89 mg de CO₂. Essas taxas representam o resíduo da caixa de gordura do R.U. sem inóculo e o tratamento do resíduo da ETE-UFES com lipase comercial, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids; Journal of the Science of Food and Agriculture; v. 79, p.1535 - 1549, 1999.
2. GRAMPONE, M. A. Propriedades dos óleos vegetais modificados por hidrogenação, interesterificação e fracionamento. Óleos & Grãos, 15, 5-9, 1993.
3. IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005.
4. CONAMA 357 – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Legislação Ambiental Federal, Resolução nº 357, 2005.
5. MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. Brazilian Journal of Food Technology, v.9, n.2, p. 143-149, 2006.
6. JAEGER, K.-E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. AND MISSET, O. Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews, 151, 29±63. 1994.
7. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19. ed. Washington, EUA, p.2-53, 2-58; 4-65; 5-2, 5-17, 5-30, 5-36, 1995.
8. SEMIONATO, S. Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura; Dissertação de Mestrado; Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental; Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.
9. SILVA, C. H. P. M. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis, RJ: Eventos. p.37-38, 105-109, 1999.
10. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 7; vol.72; p.248–254, 1976.
11. WINKLER, U. K., STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology, 138, p. 663 - 670, 1979.
12. OSWAL, N.; SARMA, P.M.; ZINJARDE, S.S. e PANT, A. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. Bioresource Technology, vol. 85, no. 1, p. 35-37, 2002.
13. MADEJÓN, E.; ROMERO, A. S.; LÓPEZ, R.; CABRERA, F. Characterization of the wastewater from the two-phase centrifugation system for olive oil extraction, Nutrient and Carbon Cycling in Sustainable Plant-Soil Systems. p.185-188, 1998.
14. CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. Biotechnology Letters, v. 23, p. 1591-1595, 2001.
15. GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, M. N. Hidrolise parcial enzimática da gordura de babaçu. Campinas: Ciência e Tecnologia de Alimentos. vol. 19, nº. 2, p. 270-276, 1999.
16. BOGO, E. Análise de atividade lipolítica de uma nova lipase de *Xylella fastidiosa* visando utilização industrial. 2003. 64f. Dissertação de mestrado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.
17. ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, New York, p. 17-38, 1994.
18. FIRME, L. P.; Cinética de degradação microbiológica de torta de filtro no solo na presença de cádmio e níquel; Dissertação de Mestrado; Curso de Pós- graduação em Agronomia; Universidade de São Paulo, p. 38-42, 2005.
19. PEDROTI, G. I. Ensaios de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solo; Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental; Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental; Universidade Federal do Espírito Santo; 2007.