



II-536 - ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE BACTÉRIAS DE RESÍDUOS OLEOSOS DO SANEAMENTO POR MEIO DA ANÁLISE DO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS

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

Graduando 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, representados 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 decaimento de O&G, pode-se observar que, durante o período avaliado, os diferentes potenciais de degradação estão intimamente ligados a atividade lipolítica das cepas por espectrofotometria. A cepa "C1" obteve remoção 87,23% de O&G de combinada com o resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES.

PALAVRAS-CHAVE: Isolados bacterianos; Lipases; Atividade lipolítica; Óleos e graxas.

INTRODUÇÃO

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.

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 [1]. A presença de óleos e graxas nos esgotos sanitários está relacionada ao uso de alimentos como: óleos vegetais, manteigas,



carne, entre outros. Os compostos gordurosos, em geral, não são desejáveis nas unidades de transporte e de tratamento dos esgotos, pois aderem às paredes das tubulações e diminuem as seções úteis, formam espuma, camada de matéria flutuante de compostos gordurosos, que poderá vir a comprometer o funcionamento das unidades subseqüentes de uma estação de tratamento de esgoto, como também, interferir e inibir a vida biológica e ocasionar problemas de manutenção [2].

Os lipídios são substâncias de uma complexa mistura de compostos orgânicos e não são diretamente incorporados pelas células bacterianas [3]. Esta é a explicação porque as bactérias são capazes de sintetizar muitas enzimas hidrolíticas, incluindo lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) as quais catalisam reações de despolimerização de lipídios. Os mecanismos dessas enzimas para intervir em reações de hidrólise ainda não são completamente elucidados, mas considerando a grande disponibilidade e a alta estabilidade das lipases extracelulares provenientes de microrganismos, elas têm um significativo potencial para uso em biotecnologia [4].

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las [5]. Muitos estudos estão sendo realizados para a utilização de lipases no tratamento de efluentes como uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais. Resíduos industriais ricos em óleos e materiais graxos provenientes de restaurantes, laticínios e indústrias processadoras de carne podem ser tratados através do uso de lipases de diferentes origens. O tratamento enzimático de efluentes é interessante, pois ajuda a melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais. Além disso, as enzimas atuam em poluentes específicos e, com os avanços da biotecnologia, algumas enzimas podem ser produzidas de forma econômica [7-10].

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 através do monitoramento da concentração de óleos e graxos num sistema de respirometria aeróbia.

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 Graxas (O&G) segundo as metodologias descritas no "Standard Methods for the Examination of Water and Waster" [11], 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 [12], 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 [13] 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 [14] e para dosagem da atividade lipolítica, de acordo com Winkler & Stuckmann [15].

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.

Avaliação do teor de óleos e graxas

O decaimento de O&G foi aferido com uma alíquota de 2g dos resíduos contidos nos potes de biodegradação. Os potes utilizados nesta etapa foram réplicas dos tratamentos para não interferir nos resultados de respirometria. Outros parâmetros físico-químicos analisados foram o pH e SV. As técnicas utilizadas obedeceram aos procedimentos estabelecidos pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 19ª edição. Na extração de óleos e graxas foi empregada a técnica clássica Soxhlet (Extrator de óleos e graxas MA 491, Marconi).

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 a variação do teor de O&G entre os tratamentos, seguida do teste Tukey (5%) para a comparação entre as médias dos tratamentos. 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.

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

Figura 1: Desenho experimental dos ensaios de bancada



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. [16] 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 [17]. Cammarota, Texeira e Freire [10] 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.

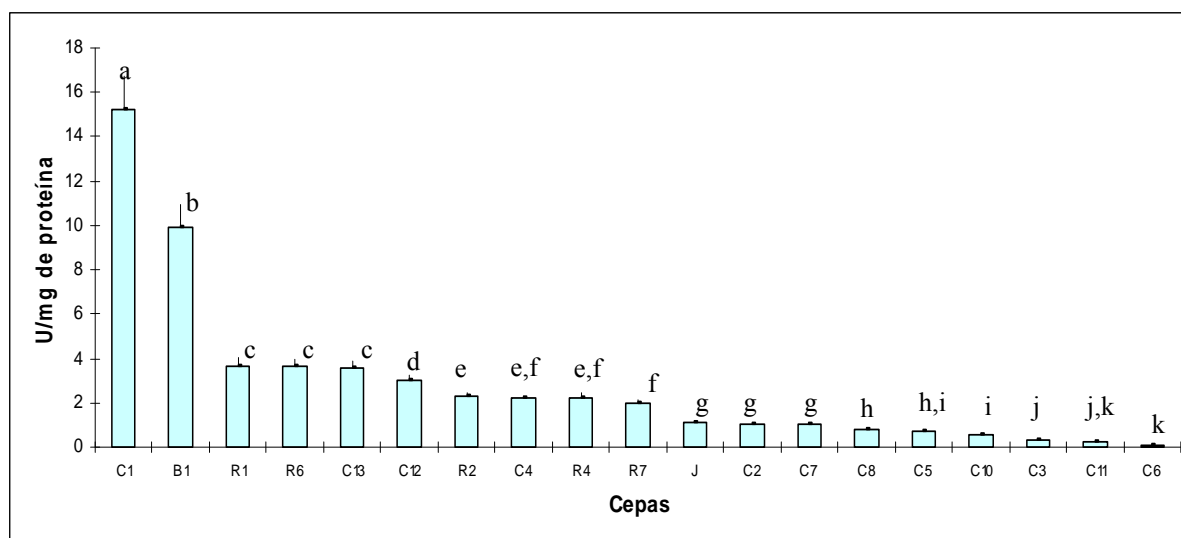


Figura 2: Atividade lipolítica em U(μ mol/min) por mg de proteína das cepas selecionadas após 120 horas de enriquecimento e grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$), pelo teste de Tukey.

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 [18] 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, que 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 [19]. 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 [20], 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, o método de determinação utilizado para aferir a atividade enzimática.

Avaliação do teor de óleos e graxas

A avaliação do teor de O&G foi realizada paralelamente ao sistema de respirometria aeróbia no experimento com 4 resíduos oleosos provenientes dos dispositivos de retenção de sólidos gordurosos do RU-UFES e ETE-UFES, lodo do reator UASB da ETE-UFES acrescido de óleo de soja comercial e óleo de fritura (Figura 4). Estes experimentos foram realizados de forma paralela com o objetivo de verificar se havia diminuição no teor de óleos e graxas dos resíduos inoculados com bactérias lipolíticas, e se esta redução estaria relacionada com a produção de CO₂ do sistema de respirometria aeróbia. Foram utilizados 4 tratamentos com cepas lipolíticas (C1, B1, R1 e J), uma lipase comercial AK Amano 20 (Amano Co., Japão) e o controle (sem inóculo). Os resultados da remoção de O&G nas condições de cada tratamento são apresentados na Figura 3. As medidas foram realizadas aos: 0, 10, 20 e 30 dias de experimento.

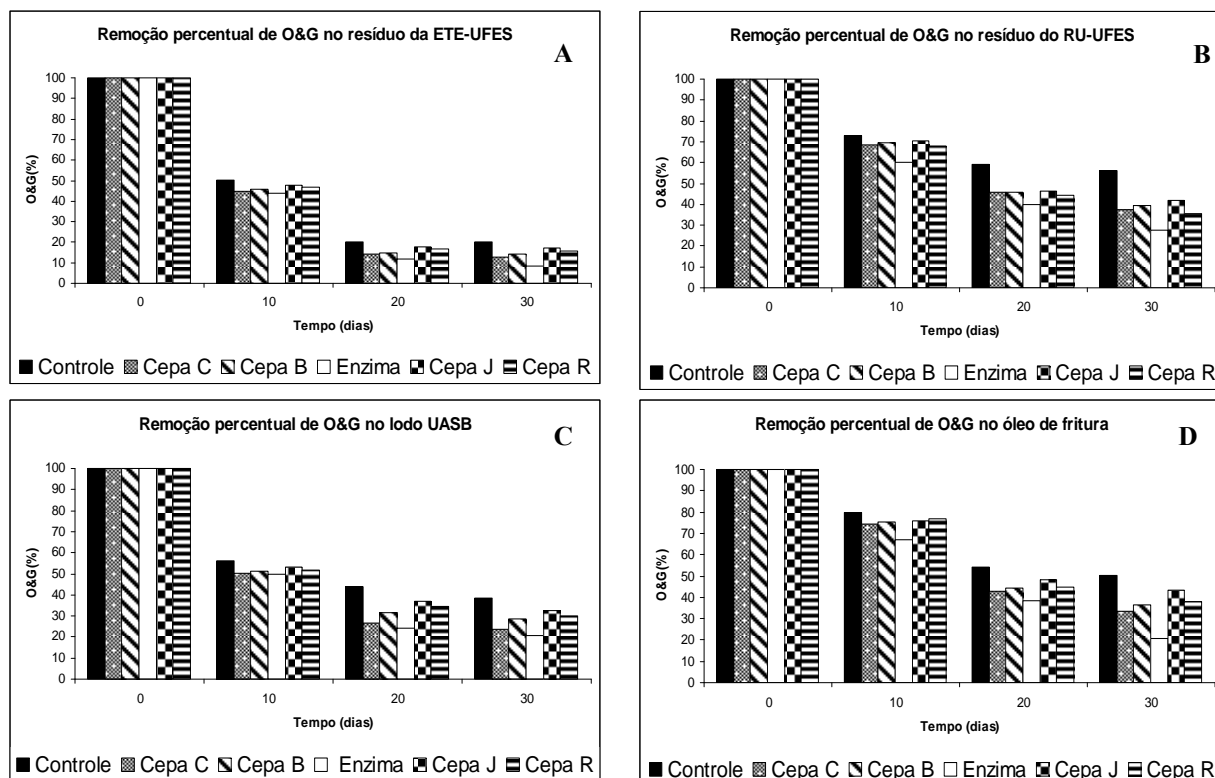


Figura 1: Remoção percentual de O&G nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e ou gordurosos. (A) resíduo da caixa de gordura ETE-UFES, (B) resíduo da caixa de gordura do R.U.-UFES, (C) lodo UASB ETE-UFES e (D) óleo de fritura.

A maior taxa de remoção ocorreu no resíduo da caixa de gordura da ETE-UFES suplementado com a lipase comercial com 91,39% de remoção (Figura 3-a). As elevadas taxas de decaimento neste resíduo se devem à presença de uma grande microbiota ativa no resíduo. O resíduo da ETE-UFES apresentou a maior microbiota no início (1183×10^5 UFC/g de substrato seco) e no final (2171×10^5 UFC/g de substrato seco) do experimento, ou seja, a grande população microbiana teve influência na remoção de O&G e permitiu pouca diferença entre os tratamentos realizados com as cepas lipolíticas, uma vez que estes tratamentos foram pouco representativos no número total de microrganismos. Em contrapartida, a menor taxa de remoção de O&G ocorreu no controle do resíduo do RU-UFES com apenas 49,83% de remoção (Figura 3-b), e isto deve ter ocorrido porque esse resíduo apresentou uma pequena população microbiana inicial, de 221×10^5 UFC/g de substrato seco, e final, de 571×10^5 UFC/g de substrato seco, comparando-se ao resíduo da ETE-UFES.

A cepa C1 apresentou valor de atividade lipolítica de 15,20 U/mg de proteína, valor maior que o da enzima Lipolase do estudo citado por PEREIRA [21], que realizou experimentos com tratamentos enzimáticos em lodo anaeróbio rico em gordura, proveniente de abatedouro de frango. As lipases da marca Novozyme: Lipozyme e Lipolase também apresentaram degradação de O&G no decorrer de seu experimento. As enzimas utilizadas apresentaram atividade lipolítica de 210 e 3,52 U/mg, respectivamente, em pH igual a 7. O resultado de atividade lipolítica por espectrofotometria mostra a elevada produção de lipase extracelular da cepa C1, justificando o decaimento dos valores de O&G no decorrer do experimento, pois de acordo com Jaeger et al.[22], as lipases que são atuantes no metabolismo de microrganismos, hidrolisam especificamente óleos e gorduras num mecanismo denominado lipólise [23], liberando ácidos graxos e glicerol que também são degradados posteriormente para obtenção de energia. Porém, o decaimento verificado para a cepa C1 foi menor do que no tratamento acrescido de lipase comercial, visto que esta enzima possui atividade lipolítica de 20 U/mg de proteína, superior a da cepa C1. Apesar do valor de atividade lipolítica da lipase utilizada nos tratamentos desta pesquisa encontrar-se próximo da faixa de atividade lipolítica das enzimas testadas no estudo de Pereira (2004), a redução da concentração de O&G com Lipolase (68%) foi menor do que o tratamento com lipase desta pesquisa que teve como máximo valor a remoção de 91,39%, ambos num período de 30 dias. Apesar do tempo de tratamento nas duas pesquisas ser o mesmo, percebeu-se que a atividade enzimática (U/mg) e tipo de tratamento (aeróbio ou anaeróbio) foi fundamental para a diferença nas taxas de



remoção de óleos e graxas. O gráfico de erro da remoção de O&G ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) é mostrado na Figura 4.

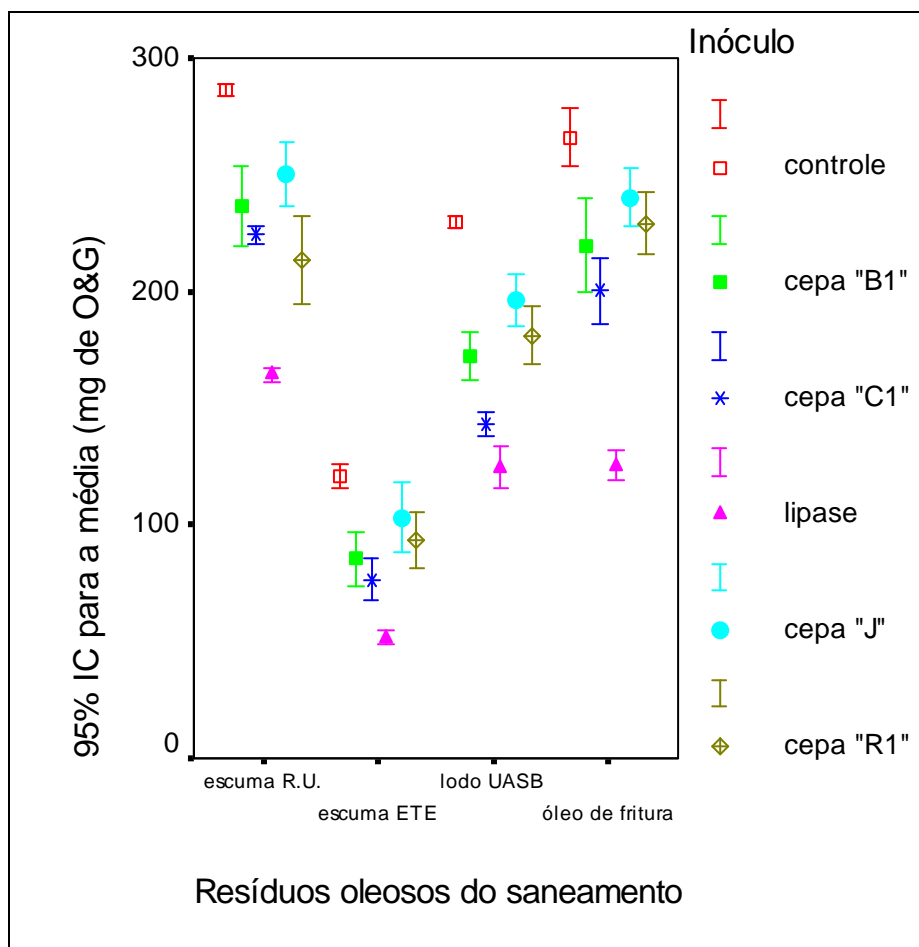


Figura 4 – Gráfico de erro da remoção de O&G ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) aos 30 dias, com intervalo de confiança de 95%, para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle.

A Figura 4 apresenta a comparação da remoção de O&G ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) aos 30 dias nos tratamentos realizados com os resíduos oleosos do saneamento, e permite verificar a diferença estatística ao nível de 95% de confiança. Este gráfico mostra que o controle e a enzima apresentaram diferença estatística de todos outros tratamentos em todos os resíduos, pois no controle não foram adicionadas cepas lipolíticas, o que confere a este tratamento a baixa capacidade de quebrar os triglicerídeos dos resíduos, e por isto apresentou as menores taxas de remoção de O&G. O tratamento com a lipase comercial tem um grande potencial de degradação de O&G, gerando ácidos graxos e glicerol, que são compostos menores e de mais fácil assimilação para a microbiota presente nos resíduos.

Os tratamentos com os resíduos utilizados neste experimento apresentaram uma diminuição do pH no decorrer de 30 dias de experimento, e a maior diminuição ocorreu no óleo de fritura com aplicação da lipase comercial que apresentou $\text{pH}=4,75$ no início do experimento e $\text{pH}=4,51$ após 1 mês. A diminuição do pH do substrato pode ser explicada pela hidrólise de triacilgliceróis pelas lipases no meio, liberando com isso ácidos graxos. Observou-se também, a diminuição no teor de sólidos voláteis em todas as condições de tratamento, que ocorreu em virtude da degradação dos compostos orgânicos presentes no sistema de respirometria, transformados em biomassa e em CO_2 .



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.

Nos estudos de decaimento de O&G, a cepa C1 confirmou os resultados obtidos avaliação da atividade lipolítica por espectrofotometria, e obteve taxas de redução de O&G de 87,23% combinada com o resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES.

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. JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A.; Tratamento de esgotos domésticos, 4 ed, Rio de Janeiro: ABES, p.131-138, 2005.
3. MUDRYK, Z. J., SKÓRCZEWSKI, P. Occurrence and activity of lipolytic bacterioneuston and bacterioplankton in the estuarine lake Gardno. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 51, p. 763-772, 2000.
4. OTERO, C., FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., PÉREZ-GIL, J. Effects of interactions with micellar interfaces on the activity and structure of different lipolytic isoenzymes from *Cândida rugosa*. Enzyme and Microbial Technology, 37, p. 695-703, 2005.
5. LIMA, V.M.G Produção e purificação de lipases e sua utilização em biocatálise em solventes orgânicos. Tese de Doutorado em Ciências (Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, 2004
6. VALLADÃO, A.B.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 60, p. 219-225, 2007.
7. LEAL, M.C.C.R.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANNA JR, G.L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. Process Biochemistry, Vol. 41, p. 1173-1178, 2006.
8. ROSA, D. R. Tratamento Enzimático/Biológico de Efluentes com Alto Teor de Gordura, Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. p.37-45, 2004.
9. JUNG, W.H.; KIM, H.K.; LEE, C.Y.; OH, T.K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 12, p. 25-30, 2002.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. SILVA, C. H. P. M. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis, RJ: Eventos. p.37-38, 105-109, 1999.
14. 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.
15. 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.
16. 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.



17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. PEREIRA, E. B. Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. Tese de Doutorado (Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSC, 2004.
22. 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.
23. CURI, R.; POMPÉIA, C.; MYIASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a Gordura – os ácidos graxos. 1ª Edição, São Paulo, Manole, p.36, 2002.