



II-535 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE MICRORGANISMOS ATRAVÉS DA BIODEGRADAÇÃO AEROBIA DE ÓLEOS E DE RESÍDUOS OLEOSOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL

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 Brasil depende da importação de lipases ((triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3), cujo custo representa a principal razão para a limitação de sua utilização em diversos processos, tais como o tratamento de efluentes oleosos de atividades industriais e domésticas e a geração de biodiesel, a partir destes resíduos oriundos de atividades do saneamento, via rota enzimática, viabilizando tais processos como tecnologias limpas, portanto e ambientalmente sustentáveis. É necessária a obtenção de novas lipases e de metodologias eficientes e rápidas para avaliação da atividade lipolítica, principalmente em substratos sólidos, mais favoráveis a microrganismos como os fungos filamentosos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a biodegradação de resíduos oleosos do saneamento relacionado-a à atividade lipolítica de microrganismos previamente isolados e selecionados, via respirometria aeróbia e quantificação da remoção de óleos e graxas. Diferenças significativas foram detectadas para os diferentes resíduos, inoculantes e a interação entre eles, principalmente em relação ao óleo de fritura e ao padrão avaliado, o óleo de soja. Maior produção acumulada de CO₂ ao final de 30 dias ocorreu em relação à biodegradação da espuma de esgoto sanitário. A biomassa microbiana relacionou-se quantitativamente à produção de CO₂ e ao teor de óleos e graxas dos substratos analisados. Maior biodegradação foi observado utilizando como inoculante o isolado F2 (*Penicillium* sp.) em óleo de soja e óleo de fritura residencial, com produções acumuladas em 30 dias de 443,9 e 473,4 mg de CO₂, respectivamente e, o F18 (*Rhizomucor* sp.) em espuma de esgoto sanitário da ETE-UFES e espuma de caixa de gordura do RU-UFES, valores de 1186,2 e 439,1 mg de CO₂, respectivamente. Os percentuais de remoção de óleos e graxas pelos citados isolados, e em relação aos mesmos resíduos oleosos acima, aos 30 dias decorridos do experimento, foram de 65,50, 74,16, 58,33 e 58,33 %, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiesel, Catálise Enzimática, Resíduos Oleosos do Saneamento, Lipases, Biodegradação, Respirometria Aeróbia, Microrganismos.



INTRODUÇÃO

O Brasil ainda depende em grande parte da importação de lipases ((triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3), cujo custo representa a principal razão para a limitação de sua utilização em diversos processos, tais como no tratamento de efluentes oleosos e gordurosos e na geração de biocombustíveis, como o biodiesel, a partir destes resíduos oriundos de atividades do saneamento, via rota enzimática, podendo somar-se àquele produzido a partir de óleos vegetais virgens. Portanto, é necessária a obtenção de novas lipases, cada vez mais especializadas e com alto nível de eficiência, fatos que impulsionam as pesquisas em busca de novas fontes, e de metodologias eficientes e rápidas para avaliação da atividade lipolítica, principalmente em substratos sólidos mais favoráveis aos microrganismos como os fungos filamentosos, que são grandes produtores.

As lipases microbianas são mais utilizadas, por sua relativa facilidade de produção, pois são extracelulares em sua maioria e, pela diversidade de microrganismos capazes de sintetizá-las e com potencial para exploração comercial. São mais interessantes devido à sua maior estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enâncio seletividade, quando comparadas a lipases de outras fontes. Os microrganismos produtores de lipases podem ser isolados de resíduos industriais e domésticos oleosos e/ou gordurosos, de solos contaminados com óleos e graxas, de plantas e animais vivos ou mortos, e de sementes oleaginosas e são representados por fungos (filamentosos e leveduriformes) e por bactérias. Isolados, os microrganismos devem passar por um processo de seleção que permita a partir de um número elevado, chegar àqueles com maiores níveis de atividade enzimática e, portanto, com maior potencial para utilização em etapas subsequentes do processo biotecnológico de obtenção das enzimas e ou biomassa microbiana lipolítica.

A produção de CO₂ por biodegradação, quantificada por respirometria aeróbia, associada ao monitoramento da remoção de óleos e graxas dos substratos oleosos testados vem sendo avaliada no Laboratório de Saneamento (LABSAN-UFES) como formas de quantificação da biodegradação de resíduos oleosos do saneamento relacionada ao potencial de atividade lipolítica de microrganismos (fungos e bactérias) obtidos a partir de amostras ambientais diversas, principalmente dos próprios resíduos oleosos do saneamento.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a biodegradação de resíduos oleosos e o potencial de atividade lipolítica de microrganismos, previamente isolados e selecionados, em condições de fermentação em estado sólido (FES) através de um sistema de respirometria aeróbia, com quantificação do CO₂ e do teor de óleos e graxas, como base para viabilizar sua utilização em processos hidrolíticos aplicados a atividades de saneamento ambiental, como o tratamento de efluentes oleosos e ou gordurosos de natureza doméstica ou industrial e também, como biocatalisadores em rotas enzimáticas para a geração de biodiesel a partir de resíduos do saneamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Saneamento – LABSAN, do Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), em Vitória, ES.

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO POR RESPIROMETRIA AERÓBIA

Como resíduos oleosos, foram avaliados o óleo de fritura residencial e as escumas de caixa de gordura, obtidos no Restaurante Universitário – UFES e, de esgoto sanitário, obtida na caixa de gordura da Estação Experimental de Tratamento de Esgotos da UFES (ETE-UFES). O óleo de soja comercial (Liza) foi utilizado como substrato oleoso padrão. Tanto os resíduos como o óleo de soja tiveram a concentração de óleos&graxas padronizada para 60 g. L⁻¹. Como inoculantes foram utilizados suspensões de esporos de quatro isolados fúngicos filamentosos: F2 (*Penicillium* sp.), F41 (*Beauveria bassiana*), F96 (*Geotrichum candidum*) e, F18 (*Rhizomucor* sp.), previamente obtidos a partir de amostras ambientais e selecionados, pela atividade enzimática apresentada em meios de cultura reacionais sólidos e processo de fermentação em estado líquido (FEL). Para a obtenção do inóculo, as cepas foram propagadas a 28 °C por 5 dias, em placas de Petri com o meio de cultura BDA. Os esporos foram removidos pela adição 5 ml de água destilada esterilizada sobre a colônia, seguida por uma raspagem leve com alça de Drigalski, sendo a suspensão resultante transferida para um béquer. A calibração da suspensão de esporos (inóculo) foi com a utilização de câmara de Neubauer,



adequando a concentração para aproximadamente 10^7 esporos/mL. Como padrão para atividade enzimática foi utilizado uma lipase comercial (Lipase, recombinante, obtida de *Rhizomucor mihei* sobre *Aspergillus oryzae*, da SIGMA, Dinamarca) na concentração de $1\mu\text{mL}^{-1}$. O volume de inoculo utilizado foi de 1 mL, para os isolados fúngicos e lipase comercial. O tratamento controle não conteve os inoculantes e os produtos utilizados como padrões.

Previamente à montagem dos experimentos foram analisados nos resíduos oleosos do saneamento e no óleo de soja comercial, os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, umidade, DQO total, DBO_5 , sólidos totais e voláteis e óleos e a graxas (O&G) segundo as metodologias descritas no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 1995) os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Como substrato suporte foi utilizado uma mistura de areia e vermiculita (vol./vol). A areia foi previamente lavada com uma solução de HCl 0,1M e posteriormente repetidas vezes com água corrente. Após a lavagem foi seca em estufa a 100°C , por 24 horas, e autoclavada a 120°C , por 30 minutos. Procedeu-se da mesma forma em relação à vermiculita, excetuando a lavagem com ácido.

Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada representada por um pote plástico. Três delas serviram, diariamente até o final do experimento, à quantificação do CO_2 produzido em decorrência da atividade de biodegradação dos resíduos oleosos misturados ao substrato suporte. Destas mesmas três unidades experimentais (potes), foram retiradas alíquotas do substrato, para a quantificação da biomassa microbiana, por contagem de colônias, em quatro datas: 0, 10, 20 e 30 dias, decorridos da data da instalação do experimento. A biodegradação também foi avaliada pelo monitoramento da remoção de óleos e graxas dos substratos experimentais, nas mesmas quatro datas acima citadas, para o que foi utilizada, com exclusividade, uma quarta repetição (pote), de cada qual foi retirado uma amostra de 1 g para análise, sendo nestas ocasiões também determinado o pH do substrato. O experimento durou 30 dias, sendo as unidades experimentais (potes) mantidas em condições ambientais de laboratório, no escuro, por 30 dias.

O experimento foi estruturado conforme proposto pela CETESB (1990), Teles (2007), Lima Junior (2005) e Matos (2002) com adaptações (Figura 1): - amostras de 100g da mistura areia-vermiculita foram acondicionadas em potes plásticos herméticos (900 ml) e adicionadas até 50% de sua capacidade de campo com meio mínimo (MM) líquido. Em seguida foram acrescentados 10 g do resíduo oleoso por pote. A cada pote, que constitui uma repetição, foi adicionado um (1) ml de uma suspensão de esporos fúngico, calibrada para 10^7 esporos/mL de MM, através da câmara de Neubauer. Em cada pote foi colocado um frasco de polietileno de 50 ml de capacidade, contendo 20 ml de solução de NaOH 0,5 mol/l para a absorção do CO_2 produzido pela atividade de biodegradação, a partir do qual foi efetuada a quantificação por meio de leitura de condutividade elétrica conforme Rodella & Saboya (1999), utilizando um condutivímetro da marca Jenco, modelo 1671, China. Os dados de CO_2 produzido foram obtidos subtraindo a quantidade de CO_2 produzido nas amostras, das quantidades dos frascos de controle, durante o período de incubação. A solução de NaOH contida no interior dos frascos de plástico foi trocada periodicamente por uma nova solução de NaOH, isenta de íons carbonato, para a captura de CO_2 . A quantificação do CO_2 foi realizada a cada 24 h. A calibração para a determinação do CO_2 foi realizada através da utilização de soluções de NaOH e Na_2CO_3 , de concentrações conhecidas, considerando-se que a solução de NaOH parcialmente neutralizada pelo CO_2 pode ser comparada a mistura de soluções padrão de NaOH e Na_2CO_3 . A quantidade em miligramas de CO_2 absorvido (mg) foi calculada pela expressão:

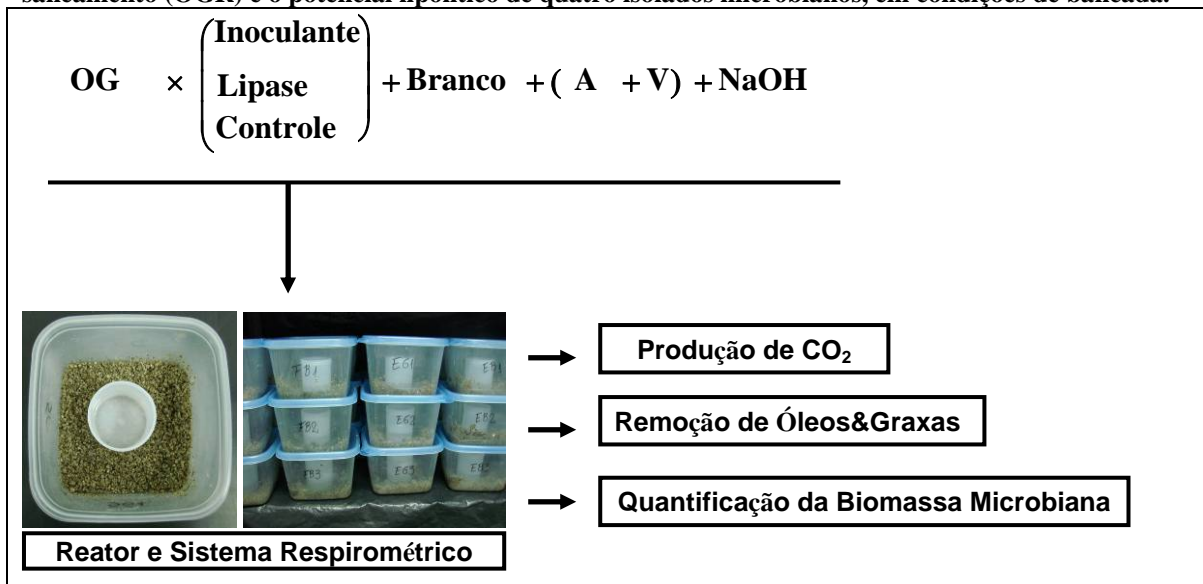
$$\text{CO}_2(\text{mg}) = V \cdot M \cdot 22 \cdot \frac{[C_1 - C_x]}{[C_1 - C_2]}$$

Onde: V e M são respectivamente, o volume da solução de NaOH em mL empregada na absorção do CO_2 e sua concentração em mol L^{-1} ; C_1 é a medida da condutividade elétrica da solução padrão de NaOH em mS cm^{-1} ; C_x é a medida da condutividade elétrica da amostra e C_2 é a medida da condutividade elétrica da solução padrão de Na_2CO_3 .

Para a quantificação da biomassa microbiana foi utilizado o método tradicional de diluição em placas, descrito em Tortora (2005), com modificações, sendo o resultado dado por ufc de microrganismo/g de peso seco do substrato analisado. A quantificação do teor de óleos e graxas foi de acordo com metodologia descrita no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 1995), utilizando a técnica

clássica Soxhlet (Extrator de óleos e graxas MA 491, Marconi), e os resultados foram expressos em g/kg do substrato analisado.

Figura 1: Sistema respirométrico aeróbio utilizado para avaliar a biodegradação de resíduos oleosos do saneamento (OGR) e o potencial lipolítico de quatro isolados microbianos, em condições de bancada.



OGR = Óleos e Gorduras Residuais do Saneamento; A = Areia; V = Vermiculita.

A análise e os gráficos estatísticos dos dados obtidos neste trabalho, foram efetuadas com a utilização do software “SPSS for Windows” versão 11.5.0, pertencente ao Departamento de Estatística da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES.

RESULTADOS

Os resíduos oleosos do saneamento (escuma de caixa de gordura, escuma de esgoto sanitário e óleo de fritura), assim como o óleo de soja comercial (Liza), analisados físico-quimicamente, como requisito para sua utilização no experimento de avaliação da biodegradação através de um sistema de respirometria aeróbia, em condições laboratoriais, apresentaram os resultados observados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos resíduos oleosos do saneamento e do óleo de soja, utilizados no experimento de respirometria aeróbia para determinação da atividade lipolítica de isolados microbianos.

Resíduo	Umidade (% m/m)	SV (% m/m)	DQO (mg O ₂ /L)	DBO (mg O ₂ /L)	DQO/DB O	O&G (g/kg)	pH
Escuma de Caixa de Gordura (RU)	92,07	4,22	40.352	20.000	2,02	59,5	6,07
Escuma de Esgoto Sanitário (ETE)	89,71	8,59	151.561	74.700	2,03	17,9	5,51
Óleo de Fritura	8,62	89,97	186.270	82.870	2,24	897,0	3,94
Óleo de Soja Comercial	3,85	88,11	113.883	54.000	2,11	923,0	6,88

Os resultados das análise físico-químicas estão de acordo com os resultados relatados por outros pesquisadores para os mesmos tipos de resíduos ou outros derivados de atividades industriais ou do saneamento (Mendes, 2006). As relações DQO/DBO dos resíduos analisados, que mede a fração biodegradável do resíduo, foi de aproximadamente 2, o que indicou o potencial de biodegradação de aproximadamente 50% dos resíduos e do óleo de soja, facultando suas utilizações no sistema respirométrico aeróbio (Tabela 1).

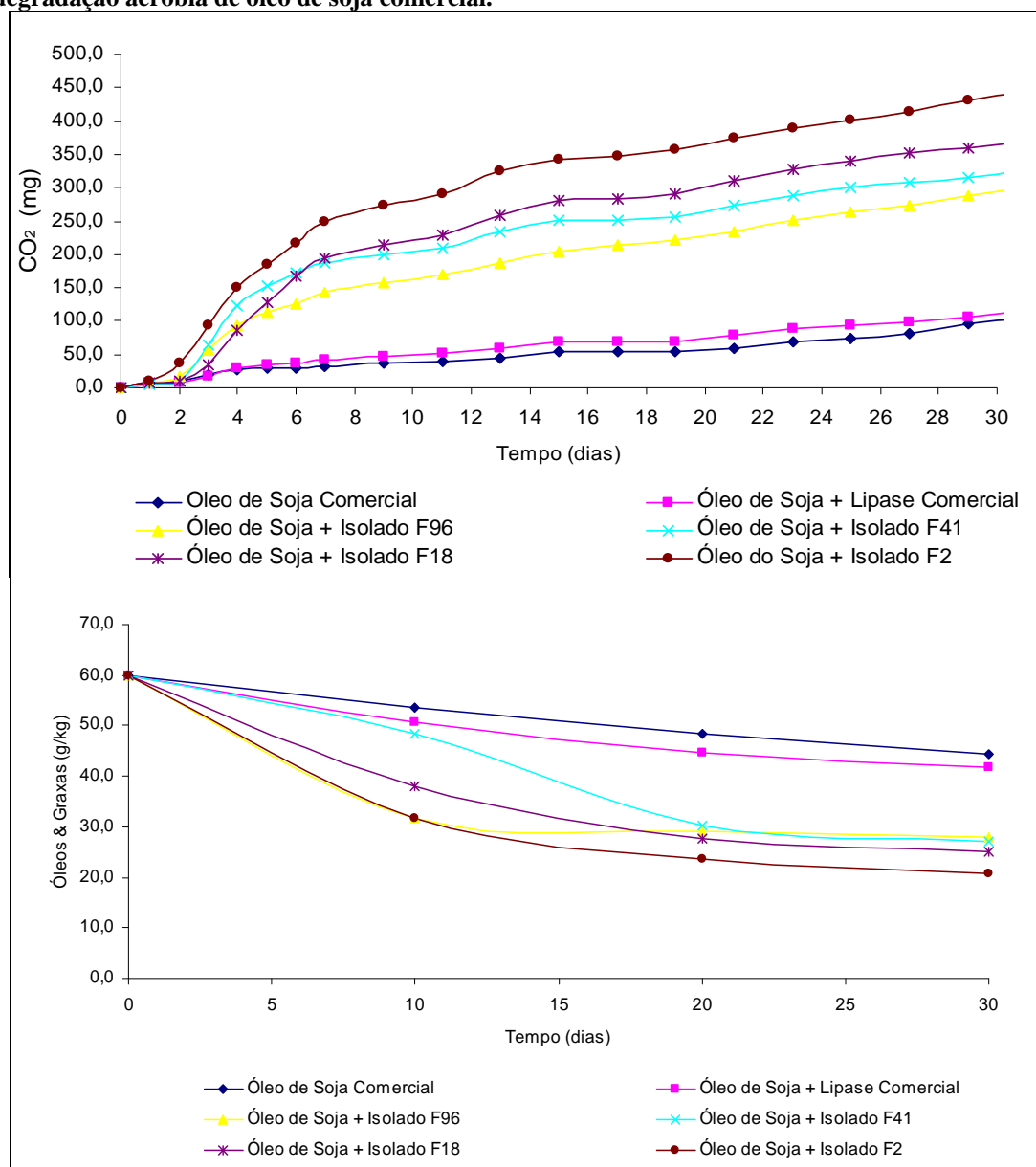


Figura 2: Reatores respirométricos aos 20 dias de experimento: a = óleo de soja (controle), b = óleo de soja + isolado F2 (*Penicillium* sp.), c = óleo de fritura + F2, d = escuma de esgoto sanitário + F18 (*Rhizomucor* sp.), e = escuma de caixa de gordura RU-UFES + F18). Biomassa fúngica pode ser vista nos tratamentos com inoculantes, distintas entre aqueles com os isolados F2 (b,c) e F18 (d, e).



As curvas resultantes da produção diária de CO₂ e remoção de óleos e graxas dos substratos analisados, são apresentadas através das Figuras 3, 4, 5 e 6.

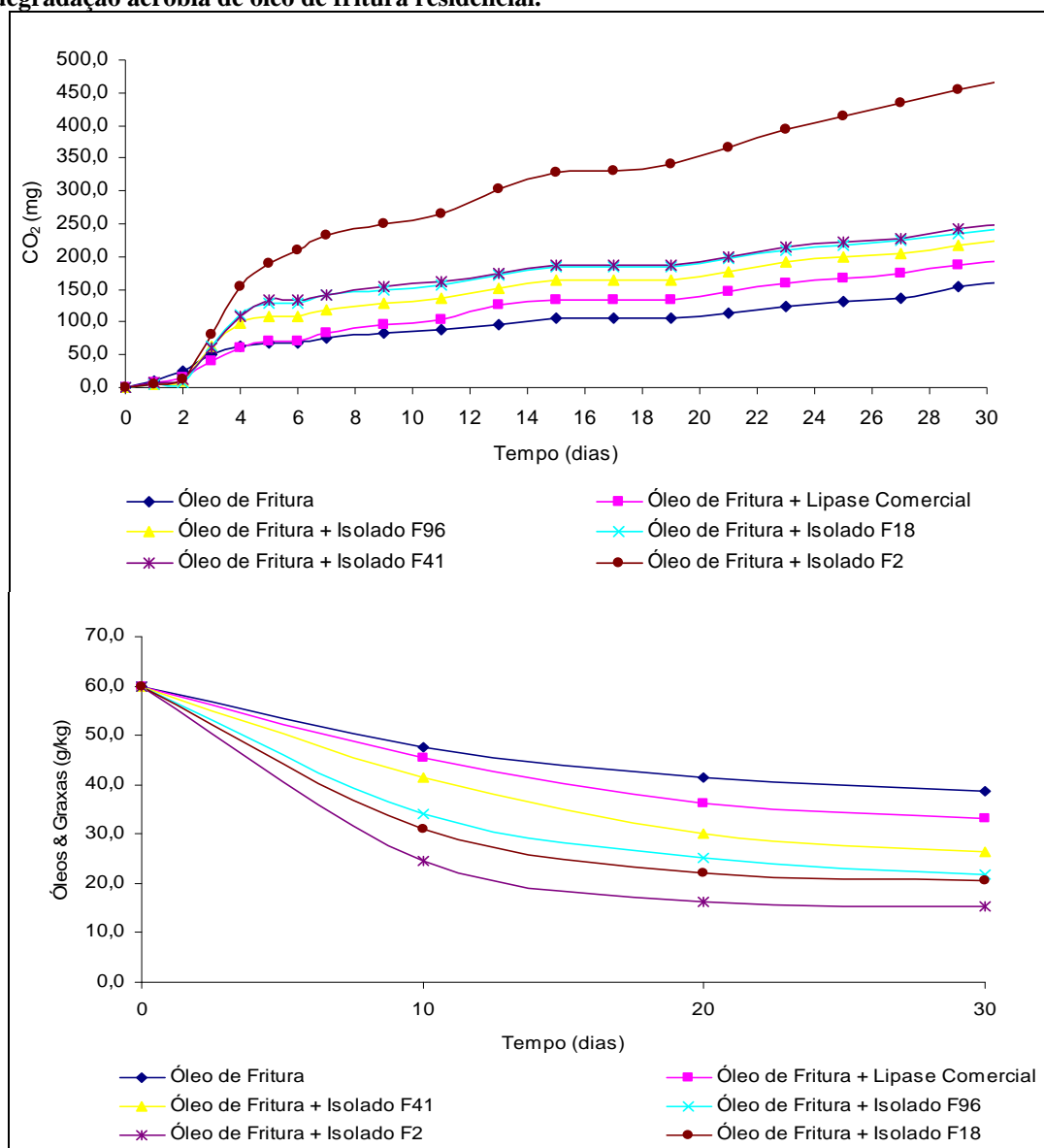
Figura3: Curvas de produção acumulada de CO₂ (mg . 0,1 kg⁻¹) e teor de óleos e graxas (g . kg⁻¹), por biodegradação aeróbia de óleo de soja comercial.



Em relação à biodegradação do óleo de soja comercial, os níveis acumulados de CO₂, mínimo e máximo, foram de 103,6 e 443,9 mg, ao final dos 30 dias experimentais, correspondentes aos tratamentos com óleo somente (controle) e, com o óleo acrescentado do inoculante F2 (*Penicillium* sp.), sendo este último o maior valor obtido dentre os inoculantes utilizados. O tratamento com acréscimo de lipase comercial não resultou em acréscimo significativo de biodegradação em relação ao controle, podendo tal resultado ser atribuído à dose utilizada (0,1 µl/ml) que pode ter sido insuficiente para destacar sua atividade nas condições em que foi conduzido o experimento, à ausência de microrganismos ou ao nível de especificidade inerente à enzima utilizada. A produção acumulada de CO₂ para todos os tratamentos com inoculantes microbianos foram muito superiores àqueles apresentados pela ausência destes inoculantes (Figura 3).

É perceptível, pelas curvas apresentadas, a relação entre a produção de CO₂ e a remoção de óleos e graxas do óleo de soja, acrescido dos inoculantes microbianos, que analisada apresentou uma correlação negativa forte ($R = -0,98$), mostrada na Figura . Os percentuais de óleos e graxas removidos, mínimo e máximo, foram de 26,16 e 65,50 %, para o óleo de soja (controle) e o óleo de soja acrescido do inoculante fúngico F2 (*Penicillium* sp.), resultado coerente com o observado em relação à produção de CO₂, o que se verificou também em relação aos demais tratamentos experimentais relativos ao óleo de soja (Figura 3).

Figura 4: Curvas de produção acumulada de CO₂ (mg . 0,1 kg⁻¹) e teor de óleos e graxas (g . kg⁻¹), por biodegradação aeróbia de óleo de fritura residencial.

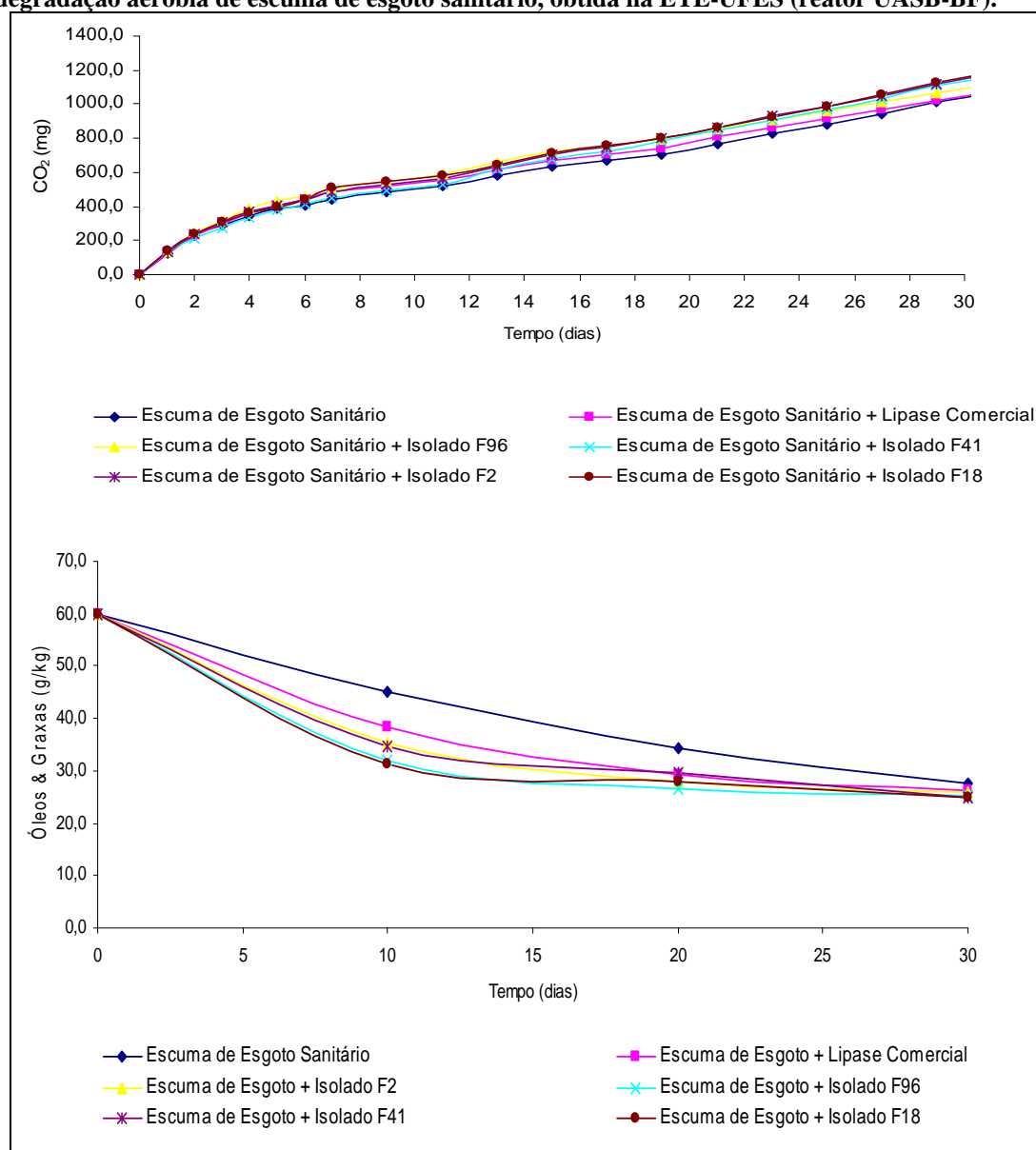




Resultados semelhantes foram observados em relação aos tratamentos em que o resíduo a ser biodegradado foi o óleo de fritura residencial (Figura 4), porém, com superioridade bem notória para a produção de CO_2 com a utilização do isolado F2 (*Penicillium* sp.) como inoculante, com o valor de 473,4 mg, enquanto que o valor abaixo foi de apenas 251,1 mg, obtido com o inoculante F41 (*Beauveria bassiana*), pouco acima do valor de 244,8 mg, conseguido com o inoculante F18 (*Rhizomucor* sp.). Os percentuais de remoção de óleos e graxas foram de 35,5 e 74,16 %, para o óleo de fritura sem inoculante e tendo como inoculante o isolado F2, respectivamente, decorridos os 30 dias de duração do experimento.

Percebe-se, analisando as curvas de produção de CO_2 e de remoção de óleos e graxas, nos processos de biodegradação do óleo de soja e de fritura, que houve um período de aclimação aos substratos oleosos, necessário aos inoculantes, que correspondeu a 3 ou 4 dias, que é considerado como uma fase de ajuste ou adaptação dos microrganismos ao novo ambiente, de acordo com Alexander (1999).

Figura 5: Curvas de produção acumulada de CO_2 ($\text{mg} \cdot 0,1 \text{ kg}^{-1}$) e teor de óleos e graxas ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), por biodegradação aeróbia de espuma de esgoto sanitário, obtida na ETE-UFES (reator UASB-BF).

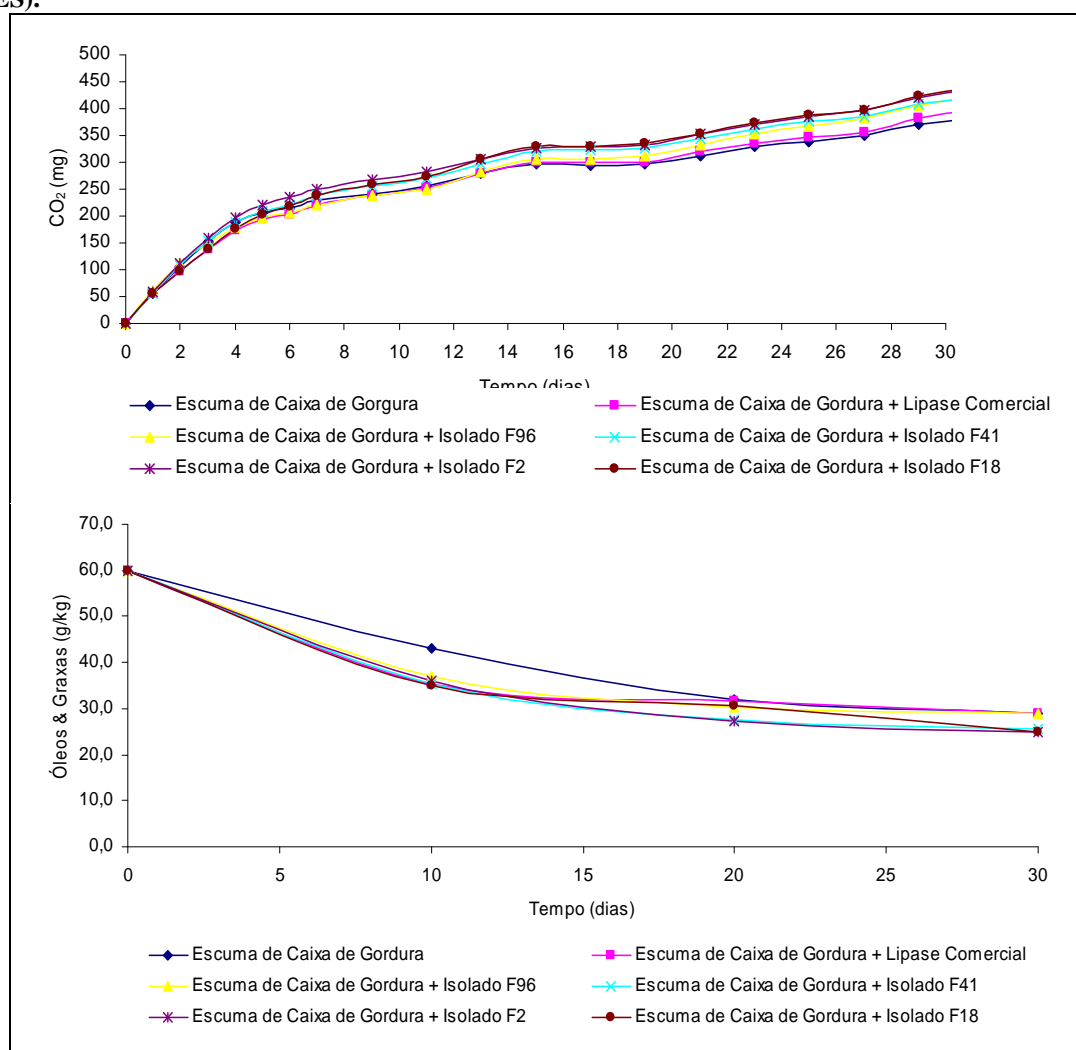


O potencial de biodegração apresentado pelos isolados microbianos F2, F96 e F41, foram de acordo com os resultados relatados em trabalhos anteriores em que se verificaram a alta atividade lipolítica extracelular, avaliada em meio de cultura sólido (MB) e a elevada atividade lipolítica específica, avaliada em um processo

de fermentação em meio líquido (FEL) com a utilização de espectrofotometria. Contrariamente, pode-se atribuir os bons resultados obtidos com o isolado F18, ao seu elevado potencial lipolítico intracelular, verificado quando testado no meio mínimo sólido, acrescido de 10% de óleo de soja e do corante indicador de atividade lipolítica rodamina-B, resultados também relatados em trabalhos anteriores, que se expressou no processo de fermentação em estado sólido (FES) implantado com o sistema respirométrico aeróbio, dada a exuberante biomassa exibida nos substratos oleosos que receberam este inoculante (Figura 2: d, e).

A maior produção acumulada de CO_2 foi observada no processo de biodegradação da espuma de esgoto sanitário, coletado na caixa de gordura da ETE-UFES, comparados aos da biodegradação do óleo de soja, óleo de fritura e esuma da caixa de gordura do RU-UFES, com relativamente pouca diferença entre a presença ou ausência de inoculantes e entre os diferentes inoculantes microbianos utilizados. Os valores mínimo e máximo constatados foram de 1066,5 e 1186,2 mg de CO_2 (Figura 5).

Figura 6 : Curvas de produção acumulada de CO_2 (mg . 0,1 kg⁻¹) e teor de óleos e graxas (g . kg⁻¹), por biodegradação aeróbia de espuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES (RU-UFES).



A explicação para este fato pode estar relacionada à maior biomassa microbiana intrínseca quantificada neste tipo de resíduo, principalmente bacteriana (Figura 9), e maior carga de matéria orgânica, medida indiretamente pela DQO, que foi de 151.561 mg de O_2/L e a relação DQO/DBO de aproximadamente 2,03, indicando a boa capacidade de degradabilidade deste resíduo. A presença das biomassas fungicas e bacterianas inerentes ao resíduo, deveu-se à sua utilização em condições naturais e, não permitiu uma diferença maior de biodegradação por efeito dos inoculantes microbianos utilizados, fato que não ocorreu em relação ao óleo de soja e de fritura, visto que não apresentaram inicialmente microorganismos ou significativa presença deles. Foi

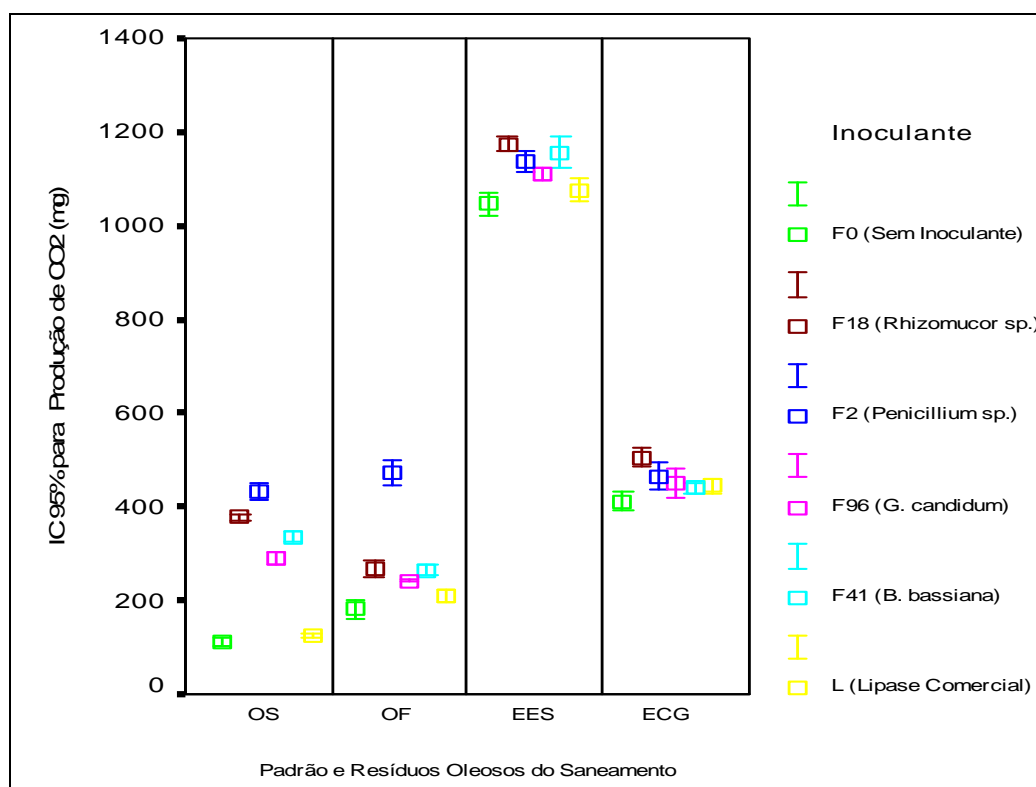


constatada a presença de microrganismos em quantidades muito inferiores às escumas de esgoto sanitário ou da caixa de gordura do RU-UFES, somente ao final do experimento, aos 30 dias (Figura 10).

Com relação à biodegradação da espuma de caixa de gordura do RU-UFES (Figura 6), a produção de CO_2 mostrou-se mais próxima daquelas exibidas com a utilização do óleo de soja e de fritura do que com a espuma de esgoto sanitário, com valores mínimo e máximo de 383,3 e 439,1 mg, dado aos menores valores de DQO e DBO, assim como à presença de menor biomassa microbiana intrínseca, quantificada por contagem de colônias microbianas (Figura 10). No mais, são válidas as ponderações efetuadas em relação à biodegradação da espuma de esgoto sanitário, coletada da caixa de gordura da ETE-UFES.

Em relação à remoção de óleos e graxas dos dois últimos citados resíduos, prevaleceu a relação entre a produção acumulada de CO_2 e o decréscimo dos teores oleosos dos mesmos ($R = -0,66$ e $R = -0,61$), respectivamente, como esperado (Figura 9). Os percentuais mínimo e máximo de remoção verificados foram também próximos, dado a pouca diferença observada dentro de cada resíduo em relação aos inoculantes microbianos e a produção acumulada de CO_2 . Verificaram-se valores de 58,33 e 53,83 % para a espuma de esgoto sanitário e, de 58,33 e 51,66 % para a espuma de caixa de gordura do RU-UFES, aos 30 dias decorridos da instalação do experimento. Estes valores próximos obtidos para remoção de óleos e graxas, entre os dois resíduos, apesar da quantidade superior de biomassa bacteriana notada na espuma de esgoto sanitário, indica que parte dela pode ter sido constituída de bactérias destituídas de capacidade lipolítica específica, devendo-se o equilíbrio na queda do teor de óleos e graxas observado entre os dois resíduos à biomassa fúngica levantada, cujos valores foram superiores para a espuma de caixa de gordura do RU-UFES, desde o início até o final do experimento (Figura 10). Neste caso, a maior produção de CO_2 verificada no processo de biodegradação da espuma de esgoto sanitário pode ser atribuído à degradação de material orgânico não lipídico, mais abundante neste tipo de resíduo em condições naturais, principalmente pela biomassa bacteriana não lipolítica.

Figura 7: Intervalos de Confiança (95%) para as médias de triplicatas de produção acumulada de CO_2 ($\text{mg} \cdot 0,1 \text{ kg}^{-1}$), obtidas em substratos um sistema respirométrico para avaliar a biodegradação aeróbia de resíduos oleosos do saneamento e a atividade lipolítica de quatro inoculantes microbianos.

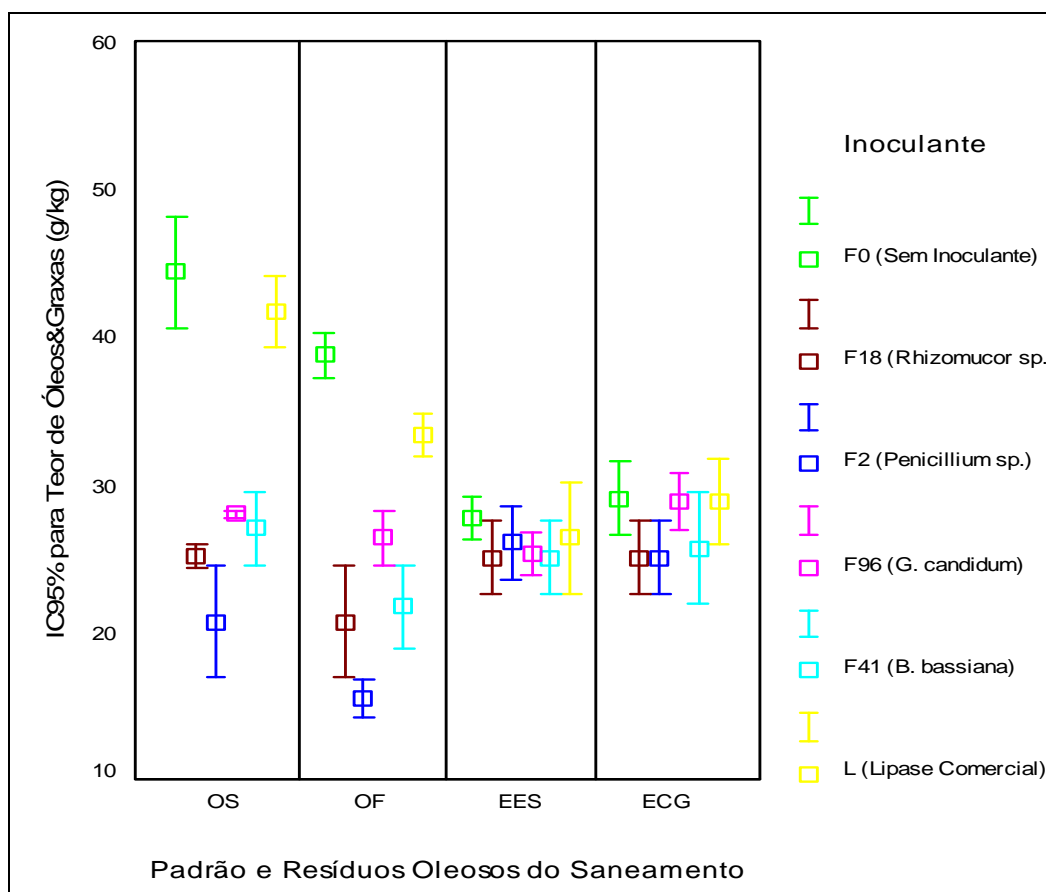


OS = Óleo de Soja Comercial; OF = Óleo de Fritura Residencial; EES = Escuma de Esgoto Sanitário ETE-UFES; ECG = Escuma de Caixa de Gordura RU-UFES.

O resultados obtidos em relação à remoção de óleos e graxas neste experimento (Figura 8), principalmente em relação ao óleo de soja e ao óleo de fritura mostraram-se coerentes com os relatados em trabalhos anteriores em que foi testada a capacidade lipolítica de isolados microbianos em meios sólidos e líquidos, objetivando sua seleção (Semionato, 2006; Lima Junior, 2007). Tanto o bom potencial de atividade lipolítica extracelular, quanto o de atividade intracelular, anteriormente observado corroboraram para os resultados obtidos em relação aos isolados microbianos utilizados como inoculantes neste experimento, constituídos por fungos filamentosos e leveduriformes. Os tratamentos com os resíduos utilizados neste experimento apresentaram uma diminuição do pH no decorrer de 30 dias de experimento. 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 CO₂.

A análise de variância multivariada com os dados de produção acumulada de CO₂ e teor de óleos e graxas, aos 30 dias do experimento, mostrou significância ($p=0,05$) entre os valores obtidos para os resíduos, os inoculantes e sua interação em todos testes (Traço de Pillai, Lambda de Wilks, Traço de Hotelling e Maior Raiz de Roy), indicando tratarem-se as diferenças encontradas devem-se ao efeito dos diferentes tratamentos analisados, com probabilidade de apenas 5 % de poderem ser atribuídas a erro experimental de amostragem.

Figura 8: Intervalos de Confiança (95%) para médias de triplicatas do teor de óleos e graxas ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), obtidas em substratos de um sistema respirométrico, para avaliar a biodegradação aeróbia de resíduos oleosos do saneamento e a atividade lipolítica de quatro inoculantes microbianos.



OS = Óleo de Soja Comercial; OF = Óleo de Fritura Residencial; EES = Escuma de Esgoto Sanitário ETE-UFES; ECG = Escuma de Caixa de Gordura RU-UFES.

Feita, então a comparação de médias pelo teste de Tukey (0,05), foram obtidos os grupos de médias em função presença ou não de diferença estatística, que são mostrados, para os resíduos, na Tabela 2.



Alguns relatos de pesquisas podem ser mencionados, que validam os resultados obtidos neste trabalho. Um conduzido por Semionato (2006) demonstrou a capacidade de remoção de 39,76% da concentração de O&G utilizando lipase de *Pseudomonas* sp. (Sigma, EUA), em experimentos realizados por 20 dias, pH em torno de 7,0 e temperatura de $25,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2$, utilizando apenas lodo UASB e óleo de soja (10%) como substrato.

Tabela 2: Grupos de médias dos valores de produção acumulada de CO_2 e teor de óleos e graxas, para o óleo de soja e tres resíduos oleosos de saneamento, aos 30 dias de biodegradação aeróbia.

Resíduo	Grupos de Médias					
	CO_2 (mg. $0,1 \text{ kg}^{-1}$)			Óleos e Graxas (g. kg^{-1})		
	1	2	3	1	2	3
OF	272,6			25,8		
OS	278,4			26,0		
ECG		452,9			27,0	
EES			1116,2			31,1

Dentro dos grupos não há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey (0,05).

Tabela 3: Grupos de médias dos valores de produção acumulada de CO_2 e teor de óleos e graxas, para os inoculantes, aos 30 dias de biodegradação aeróbia.

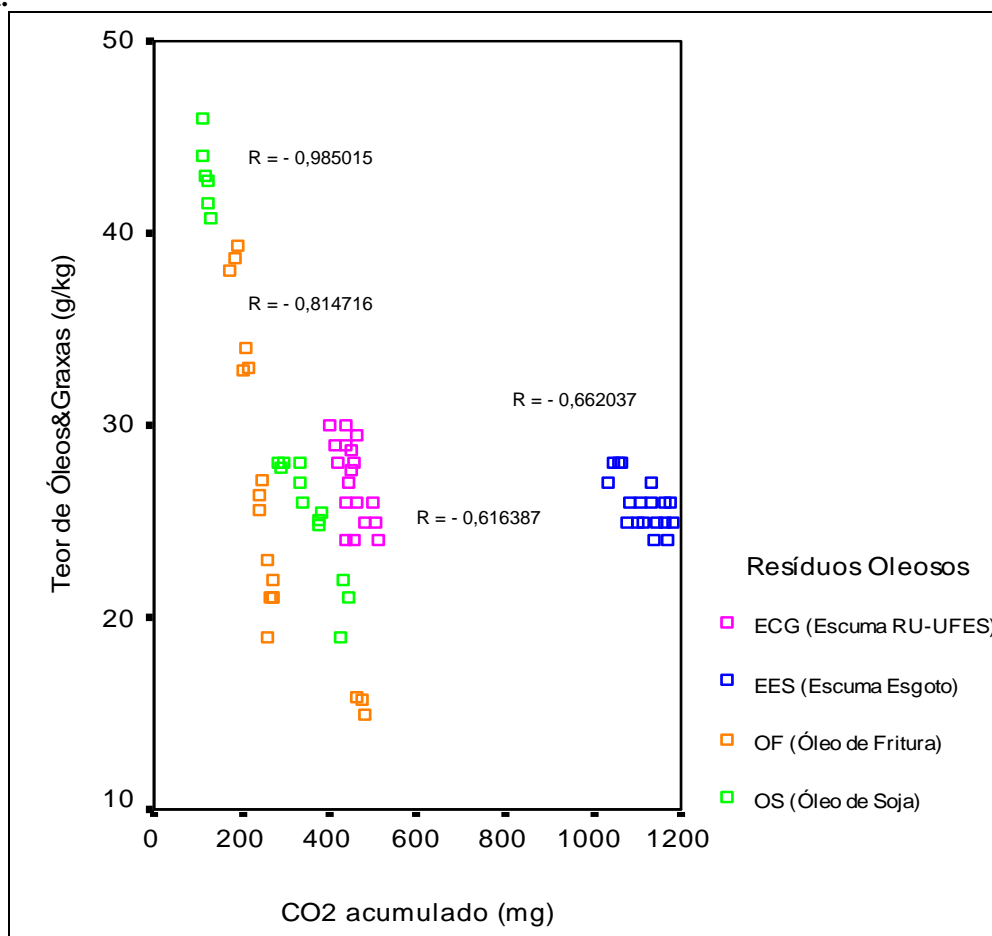
Resíduo	Grupos de Médias										
	CO ₂ (mg. 0,1 kg ⁻¹)						Óleos e Graxas (g. kg ⁻¹)				
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
F0	437,8						34,9				
L		463,6						32,5			
F96			523,2						27,11		
F41				548,6						24,8	
F18					580,9					23,9	
F2						626,11					21,78

Dentro dos grupos não há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey (0,05).

A Figura 10 mostra os valores plotados de biomassa microbiana por g de substrato seco, obtidos por contagem de colônias dos microrganismos (fungos e bactérias totais) e expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) $\times 10^5$ por grama de substrato (peso seco), aos 30 dias decorridos do experimento. Verificou-se valores muito superiores de UFC por parte dos tratamentos com espuma de esgoto sanitário da ETE-UFES e espuma de caixa de gordura do RU-UFES. Deve-se isto ao fato de que estes resíduos contêm uma população microbiana intrínseca muito elevada, e foram utilizados sem esterilização prévia. Esta esterilização também não ocorreu em relação aos óleos de soja comercial e de fritura que, porém, não mostraram a presença de microrganismos intrínsecos, devendo-se a biomassa fúngica final somente aos inoculantes utilizados e, a bacteriana, praticamente insignificativa, em relação à dos dois primeiros resíduos, à manipulação das unidades experimentais durante o decorrer do mesmo.

A quantificação da biomassa, pelo método de diluição e contagem de colônias em placas, apesar de muito trabalhosa e relativamente demorada, mostrou-se eficiente e contribuiu para o esclarecimento dos resultados obtidos neste trabalho, em relação à biodegradação dos resíduos oleosos do saneamento, pesquisados. Verificou-se uma forte correlação positiva forte ($R = 0,8119$, $R^2 = 0,6593$, $y = 0,2621x + 189,95$) entre a biomassa microbiana total (fungos + bactérias) e a produção acumulada de CO_2 , com os dados obtidos aos 30 dias do experimento. O efeito somado da biomassa intrínseca e daquela oriunda da inoculação dos isolados microbianos (fungos filamentosos), tornaram próximos os valores encontrados de produção acumulada de CO_2 e de remoção de óleos e graxas (teores) para os resíduos espuma de esgoto sanitário e espuma de caixa de gordura, para o mesmo resíduo, porém pôde-se, ainda assim, constatar diferenças significativas ($p=0,05$) entre os tratamentos. Verificou-se, em relação à biomassa bacteriana, superioridade de valores para o resíduo espuma de esgoto sanitário, coletado na caixa de gordura da ETE-UFES, em relação à espuma de caixa de gordura do RU-UFES; no caso da biomassa fúngica, no entanto, o contrário foi observado (Figura 10).

Figura 9 : Correlações entre as produções acumuladas de CO₂ (mg. 0,1 kg⁻¹) e os teores de óleos e graxas (g . kg⁻¹), em óleo de soja e resíduos oleosos do saneamento, após 30 dias de biodegradação aeróbia.

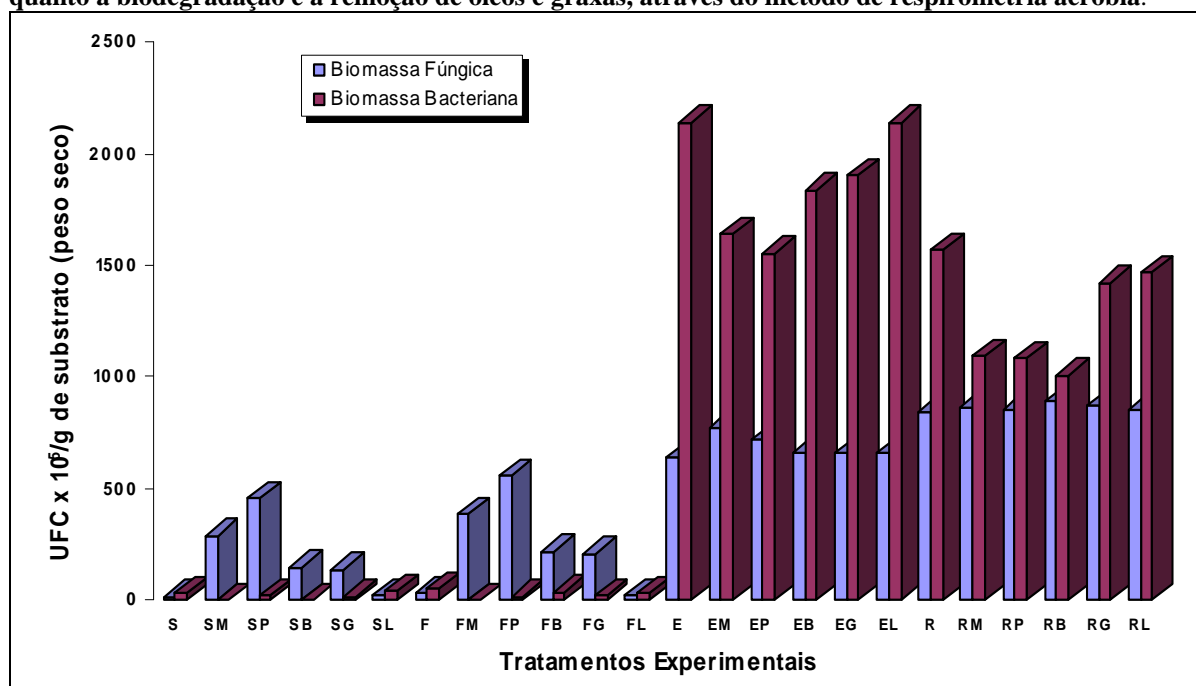


A presença de óleos e graxas em grandes quantidades no esgoto sanitário provoca vários problemas na rede coletora e no tratamento. Estes compostos promovem uma intensa agregação de sólidos e partículas em suspensão, gerando entupimento nas redes, dutos e reservatórios do sistema de tratamento de esgotos. Outros problemas advindos da presença de sólidos gordurosos são: mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura (Mendes *et. al.*, 2002). Os compostos gordurosos são indesejáveis 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 compromete o funcionamento das unidades subsequentes de uma estação de tratamento, interferindo e ou inibindo a vida biológica, ocasionando problemas de manutenção. Os lipídeos presentes no efluente possuem baixa degradabilidade, representando problemas nos processos biológicos anaeróbios e aeróbios, causando danos operacionais (Pereira, 2004). Além disto, é cada vez maior na atualidade o espaço para a reciclagem de resíduos do saneamento e industriais, não só porque representam “matérias primas” de baixo custo, mas também porque os efeitos da degradação ambiental em função do seu acúmulo são significativos, em todo o mundo (Reetz, 2002). Uma das possibilidades potenciais do seu aproveitamento é a produção de biocombustíveis, como o biodiesel.

Até o presente, o biodiesel tem sido produzido com o emprego de catalisadores básicos ou ácidos, a partir, principalmente, de óleos vegetais. No entanto, a exigência de remoção do catalisador e o gasto excessivo de energia são os maiores inconvenientes do processo químico. Assim sendo, a substituição do catalisador químico por enzimas pode diminuir estes problemas, justificando o desenvolvimento de pesquisas utilizando lipases (Adamczak&Bednarsky, 2004). As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.1) atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos, porém, baixas concentrações de água podem ainda catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação. As produzidas por microrganismos são as que melhor potencial apresentam, o que motivou o desenvolvimento desta pesquisa junto ao Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).



Figura 10: Biomassas fúngica e bacteriana aos 30 dias, em 24 tratamentos experimentais, avaliados quanto a biodegradação e a remoção de óleos e graxas, através do método de respirometria aeróbia.



S = Óleo de Soja Comercial ; F = Óleo de Fritura Residencial; E = Escuma de Esgoto Sanitário da Caixa de Gordura da ETE-UFES; R = Escuma de Caixa de Gordura do RU-UFES; M = F18 (*Rhizomucor* sp.); P = F2 (*Penicillium* sp.); B = F41 (*Beauveria bassiana*); G = F96 (*Geotrichum candidum*).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir pela eficiência dos materiais e métodos utilizados em estimar o processo de biodegradação dos resíduos oleosos do saneamento e estabelecer a relação com a atividade enzimática dos isolados inoculados, via produção de CO₂ e quantificação da remoção de óleos e graxas dos substratos analisados, nas condições em foi conduzido o experimento.

Diferenças estatísticas (p=0,05) foram encontradas para os valores de médias de triplicatas dos tratamentos experimentais, confirmando diferenças entre resíduos, inoculantes e a interação entre eles.

Maior produção acumulada de CO₂ ao final de 30 dias ocorreu em relação à biodegradação da escuma de esgoto sanitário, resultado explicado pela maior biomassa microbiana intrínseca quantificada neste tipo de resíduo, principalmente bacteriana, e maior carga de matéria orgânica, medida indiretamente pela DQO, sendo a relação DQO/DBO de aproximadamente 2,03, portanto favorável à biodegradação deste resíduo.

A produção acumulada de CO₂ assim como o percentual de remoção de óleos e graxas todos os tratamentos com inoculantes microbianos foram superiores àqueles apresentados pela ausência destes inoculantes. O isolado apresentou os melhores resultados em relação ao óleo de soja comercial e óleo de fritura residencial, enquanto o F18 (*Rhizomucor* sp.) assim o fez em relação às escumas de esgoto sanitário, obtido a partir de uma caixa de gordura da ETE Experimental da UFES (ETE-UFES) e, de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES (RU-UFES), nas condições em que foi conduzido o experimento.

Ficaram evidentes neste trabalho, assim como nos outros anteriormente relatados, pertinentes à pesquisa que estamos desenvolvendo junto ao Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Espírito Santo (LABSAN-UFES), os potenciais dos isolados fúngicos filamentosos F2 (*Penicillium* sp.) e F18 (*Rhizomucor* sp.), para futuras utilizações em pesquisas voltadas para sua utilização, direta ou indireta, em processos hidrolíticos de saneamento ambiental e ou biocatalíticos em processos de geração de biodiesel com a utilização de resíduos oleosos do saneamento.



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. ADAMCZAK, M., BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry*, 39, p. 1347-1361, 2004.
2. ALEXANDER, M.; *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press, New York, p. 17-38, 1994.
3. APHA, AWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19. ed. Washington, EUA, 1995.
4. COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Belo Horizonte: UFMG, 2006. (Tese de Doutorado).
6. COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). L6.350 - Solos – Determinação da biodegradação de resíduos – Método Respirométrico de Bartha, 1990.
7. LIMA JUNIOR, A.F. Biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos derivados de sistemas de tratamento de esgoto. XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2007. Anais. Belém PA, 2007.
8. 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.
9. MATOS, Z.M.R.; FERNANDES, F.; BERNARDES, R.S. Avaliação da biodegradabilidade do lodo de esgoto por meio da compostagem, utilizando respirometria. XXVIII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Anais. Cancun, México, 2002.
10. MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B.; 2006. 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.
11. 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.
12. REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, p. 145-150, 2002.
13. RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V.; Calibration for conductimetric of carbon dioxide. In: *Soil Biology and Biochemistry Journal*. USA: Elsevier; p.2059-2060, 1999.
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. TELES, C.R. Modelagem da decomposição aeróbia de lodo de esgoto em solos de diferentes texturas. Vitória: UFES, 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica).
16. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.