

BIOPROSPECÇÃO DE CEPAS AMBIENTAIS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Ezaine Cristina Corrêa Torquato¹, Ida Carolina Neves Direito¹, Luanda Silva de Moraes²,
Maria Cristina de Assis¹

¹ Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste / Centro setorial Ciências Biológicas e da Saúde / Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental / Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental

² Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste / Centro Setorial de Produção Industrial / Laboratório de Tecnologia em Materiais / Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Materiais

ABSTRACT:

Lipids released in effluents represent great damage to the environment and represent a high investment of financial resources in treating fatty waste. In this context, alternative processes have been used to reduce the concentration of lipids contained in the said effluents by enzymes, particularly lipases. The identification of new sources of lipase bacteria isolated from the environment allows the development of new enzymatic systems. The objective of this study was to identify lipolytic strains in a collection of isolated bacterial soil samples associated with the rhizosphere of cabbage and chicory and the isolation of bacteria with lipolytic activity in domestic grease traps for the construction of a collection of bacteria for use in treatment oily effluents. We use as a screening method cultivation of strains isolated in the presence of Rhodamine B (qualitative assay). The selected strains were subjected to quantitative method for determining lipase activity based on hydrolysis of palmitate nitrophenyl. Subsequently, the isolated with the greatest potential lipolytic was used for vitro assay in vitro to the decay of oil and grease (O & G) of fatty effluent samples. In the qualitative assay 84 strains isolated from the rhizosphere were tested, and from the 45 isolated from chicory, just the CH02 strain was positive and from the 39 isolated from cabbage, the C24 strains, C37 and C38 were positive. In the same way, 16 strains isolated from grease traps were tested. From these 16, 5 strains were positive (E4 Ni1, Ni2, Q1 and Q2). The positive strains were subjected to quantitative assay in which the strain PAO-1 of *Pseudomonas aeruginosa* (100% lipase activity) was used as reference. The strains with higher percentages of increased lipase activity were the C38 strains of cabbage rhizosphere (32.4 11.8%) and Q1 of the effluent of domestic grease trap (50.3 7.1%). The isolated grease trap effluent Q1 was selected for the decline test O & G which showed a 28.6 18.8% decrease of content of O&G, which is a higher decay than that found in the treatment with PAO-1 reference strain (54.5 22.5%).

Key words: bioprocess, oily wastewater, lipase, treatment of greasy wastewater

RESUMO:

Os lipídeos lançados nos efluentes representam grande prejuízo ao meio ambiente bem como representam um investimento de recursos financeiros alto no tratamento efluentes gordurosos. Dentro deste contexto, processos alternativos vêm sendo utilizados na redução da concentração de lipídeos contidos nestes efluentes por meio de enzimas, particularmente lipases. A identificação de novas fontes de lipases de bactérias isoladas do meio ambiente possibilita o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos. O objetivo deste trabalho foi identificar cepas lipolíticas em uma coleção de amostras bacterianas isoladas do solo associadas à rizosfera de couve e chicória e o isolamento de bactérias com atividade lipolítica em caixas de gordura domésticas visando a construção de uma coleção de bactérias para utilização em tratamento de efluentes gordurosos. Utilizamos como método de triagem o cultivo das amostras isoladas em presença de Rodamina B (ensaio qualitativo). As cepas selecionadas foram submetidas ao método quantitativo para determinação da atividade lipolítica fundamentado na hidrólise de palmitato de nitrofenila. Posteriormente, o isolado com maior potencial lipolítico foi utilizado para o ensaio do decaimento de óleos e graxas (O&G) em amostras de efluentes gordurosos in vitro. No ensaio qualitativo, foram testadas 84 cepas isoladas da rizosfera, sendo que dos 45 isolados da chicória apenas a cepa CH02 foi positiva e dos 39 isolados da couve, foram positivas as cepas C24, C37 e C38. Da mesma forma, foram testadas 16 cepas isoladas de caixas de gordura das quais 5 cepas foram positivas (E4, Ni1, Ni2, Q1 e Q2). As cepas positivas foram submetidas ao ensaio quantitativo no qual foi utilizada como referência a cepa PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa* (100% de atividade lipolítica). As cepas que apresentaram maiores percentuais de aumento de atividade lipolítica foram às cepas C38 da rizosfera da couve (32,4 11,8%) e Q1 do efluente caixa de gordura doméstica (50,3 7,1%). O isolado de efluente da caixa de gordura Q1 foi selecionado para o ensaio do decaimento de O&G onde apresentou uma diminuição de 28,6 18,8%, do teor de O&G sendo um decaimento superior ao encontrado com o tratamento com a cepa de referência PAO-1 (54,5 22,5%).

Palavras-chave: bioprocessos, efluentes gordurosos, lipase, tratamento de efluentes gordurosos

INTRODUÇÃO

Lipídeos (gorduras, óleos e graxas) são as principais matérias orgânicas (concentrações > 100mg. L⁻¹) em águas

residuais de origem doméstica, de algumas indústrias e refinarias de óleos comestíveis, frigoríficos, curtumes e indústrias de laticínios (Mendes et al., 2005). A excessiva presença de

sólidos gordurosos traz consequências aos sistemas de tratamento de esgotos como entupimento da canalização, mal funcionamento das estações de tratamento e limitação da transferência de oxigênio para a biomassa devido à geração de um filme lipídico na interface ar/água, com danos aos processos biológicos anaeróbios e aeróbios do sistema (Vidal et al., 2000; Cammarota & Freire, 2006). Os compostos gordurosos são também denominados sólidos flutuantes ou espuma. Estes resíduos geram também mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura, necessidade de remoções da espuma produzida para aterros gerando poluição do solo e maior custo operacional das estações de tratamento (Jordão & Pessoa, 2005). Resíduos oleosos são considerados como sérios poluentes em ambientes aquáticos e terrestres podendo impor sérios danos ecológicos (Willey, 2001).

Em 1997, a Lei federal n.º 9.433 de 08 de janeiro, instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos com o objetivo de garantir à atual e às futuras gerações água em qualidade e disponibilidade suficientes.

A Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) n.º 357 de 2005, determina que qualquer fonte poluidora somente podem lançar seus efluentes em corpos d'água caso atendam o limite de 1 até 20mg.L-1 para óleos minerais e de até 50mg.L-1 de óleos vegetais e gorduras animais. A Norma Brasileira Registrada- NBR 9800/1988, estabelece que os efluentes líquidos não domésticos a serem lançados no sistema coletor público de esgoto sanitário deve ter o teor de 100mg.L-1 de óleos e graxas (O&G). Esta medida levou a adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias, levando a realização de pesquisa para obtenção de novas ferramentas visando à redução do impacto ambiental,

especialmente em efluentes contendo elevados teores de lipídeos como os provenientes de laticínios, matadouros, enlatados, extração de óleos, entre outros (Mendes et al., 2005).

É necessário que a elevada concentração de triglicerídeos, nas estações de tratamento desses efluentes, seja inicialmente hidrolisada para então ser transformada em fonte de carbono para bactérias e, posteriormente, convertido em biomassa (lodo ativado) (Dueholm et al., 2001). Além dos triglicerídeos, os efluentes dessas indústrias contêm sulfatos, nitratos e fosfatos, cuja biodegradabilidade é baixa e a demanda química de oxigênio bastante alta. O tratamento biológico, logo após o físico-químico convencional, com custo elevado, é o processo mais utilizado atualmente, mas sua eficiência fica comprometida devido à presença de sais inorgânicos que inibem a atividade microbiana. Há formação de lodo com características diversas que provocam a flotação da biomassa, demora na retenção hidráulica, redução na capacidade dos aeradores e demanda elevada de produtos flocculantes (Castro&Mendes, 2005). Alternativamente, vêm sendo utilizados outros processos para redução da concentração de lipídeos, destacando-se os que utilizam as lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) para hidrólise de óleos e gorduras, viabilizando o tratamento anaeróbio e a desobstrução de filmes de óleos nas tubulações, o que prolonga a vida útil dos equipamentos (Berton et al., 2011). Este tipo de tratamento possui vantagens como a especificidade tendo em vista ser um tratamento enzimático, o que permite o controle dos produtos gerados no processo, além do baixo custo em relação à energia e aos equipamentos, e ainda, desperta interesse no que se refere à preservação ambiental.

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos. São muito

utilizadas como catalisadores biológicos em processos tecnológicos de conversão química. Os substratos naturais para as lipases são óleos e gorduras contendo triglicerídeos constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações esteres tríplexes. Usualmente são estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, mas a ótima condição térmica situa-se entre 30 e 40°C. A termoestabilidade das lipases pode variar em função de sua origem, sendo que as lipases microbianas, em geral, tendem a apresentar maior estabilidade térmica que as originárias de outras fontes (Castro et al., 2004). Lipases microbianas possuem um enorme potencial biotecnológico, visto que são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores, podem ter grande especificidade pelo substrato e exibem elevada enantiosseletividade (Jaeger & Reetz, 1998).

A diversidade de microrganismos é imensa, menos de 10% foram cultivados e/ou caracterizados, sugerindo que ainda há muito a ser descoberto, permitindo a identificação de novas enzimas com interesse industrial (CARVALHO et al., 2005). Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de avaliar a atividade lipolítica de cepas bacterianas oriundas de amostras de solo associadas à rizosfera da couve e chicória e de efluentes domésticos ricos em gorduras (caixas de gordura).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

1.1. Cepas bacterianas oriundas de amostras de solo

Foram utilizadas cepas da coleção de cultura construída por Ferreira (2012) a partir do isolamento bacteriano de amostras de solo associadas à rizosfera de couve (*Brassica oleracea* L.) e chicória (*Cichorium endivia* L.). As cepas foram reativadas em meio Luria Bertanni (LB) contendo 5% de óleo de soja comercial para estimular a expressão máxima

de lipases.

1.2. Coleta de efluente de origem doméstica

Foram isoladas cepas bacterianas a partir de efluentes gordurosos de origem doméstica de Campo Grande e Cosmos no Rio de Janeiro. A coleta foi realizada pela manhã, após 12 horas sem a inserção de detergentes e outros produtos químicos. Para a realização destas coletas foram utilizados tubos Falcon estéreis de 15 mL e as amostras de efluentes foram armazenados na geladeira até o processamento para isolamento de colônias com atividade lipolítica pelo método da Rodamina B.

1.3. Cepa bacteriana de referência

A cepa de PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada como controle positivo para atividade lipásica por serem eficientes produtoras de lipases (Haba et al., 2000).

2. Seleção de cepas produtoras de lipase pelo Método Rodamina B

A triagem de bactérias produtoras de lipase foi realizada pelo método da Rodamina B descrito por Haba et al. (2000), que detecta bactérias que apresentam boa expressão de lipases extracelulares. É um método qualitativo que se fundamenta no crescimento bacteriano em meio rico em gorduras na presença de Rodamina B (Sigma Aldrich). As cepas bacterianas produtoras de lipase produzem ácidos graxos que reagem com a Rodamina B formando um composto fluorescente. Após o cultivo pelo período mínimo de 24 horas, faz-se a leitura do teste com uma lâmpada ultravioleta (365nm). As cepas que emitem um halo fluorescente ao redor da colônia são consideradas positivas para a produção de lipases.

As cepas bacterianas isoladas da rizosfera, a cepa de referência *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1) e as diluições em salina a 0,9% (10⁻¹ a 10⁻⁵) dos efluentes domésticos foram semeados em meio sólido Mueller Hinton acrescido de 0,1% (m/v) de Rodamina B e uma emulsão de óleo de soja comercial

(Liza) com Triton X-100 (Sigma Aldrich) na concentração de 5% e incubadas a 30°C, em estufa bacteriológica, por períodos de 24 e 48 horas. Em ambos os períodos as placas foram retiradas da estufa e observadas sob luz ultravioleta (365nm). As cepas consideradas positivas foram estocadas em LB contendo 20% de glicerol e 5% de óleo de soja comercial (Liza) a -20°C até a determinação da atividade lipásica.

3. Determinação da atividade lipolítica das cepas bacterianas

3.1. Obtenção dos sobrenadantes de culturas de cepas produtoras de lipase para determinação da atividade lipolítica.

As cepas bacterianas com atividade lipolítica foram cultivadas em meio LB suplementado com 5% de óleo de soja, sob agitação de 150 rpm por 18 horas à 30°C. Logo após as culturas foram centrifugadas a 3600 rpm por 10 minutos. Após esta etapa os sobrenadantes foram desprezados, obtendo-se o precipitado utilizado no preparo das suspensões bacterianas com DO_{680nm} = 0,2, em meio LB suplementado com 5% de óleo de soja. Após esta etapa, foram inoculados 100 µl das suspensões bacterianas em Erlenmeyer contendo 10 mL de meio LB suplementado com 5% de óleo de soja (1/100). As culturas foram incubadas sob agitação de 150 rpm por 24 horas à 30°C em shaker orbital. Após este período de tempo, as culturas foram centrifugadas a 3600rpm por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante de cada cultura foi coletado e estocado a -20°C até a dosagem de proteínas e determinação da atividade enzimática.

3.2. Determinação da concentração de proteínas nos sobrenadantes das culturas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada conforme Peterson (1977). Aliquotas de amostras contendo entre 10 e 100 µg de proteínas totais foram levadas a

1,0 mL com água destilada. A seguir foi acrescentado para cada amostra 1,0mL do reagente A (10 mL de uma solução contendo 10% de carbonato de sódio, 0,1% de sulfato de cobre pentahidratado, 0,2% de tartarato de potássio, 10 mL de uma solução de SDS a 10%, 10mL de NaOH a 3,2 % e 10 mL de água destilada). Após vigorosa agitação as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos seguindo-se a adição de 0,5 mL do reagente B (reativo de Folin-Ciocalteu diluído 1:5 em água). Após 30 minutos foram lidas as absorbâncias a 750nm. Aliquotas de uma solução de albumina bovina contendo exatamente 10 e 100 µg de proteínas totais foram usadas como padrão. A quantidade de proteínas totais nas amostras foi avaliada através da seguinte fórmula:

Proteínas totais (µg) = (I x A) S

- $S = 1/\log (P100/P10)$

- $I = \text{antilog} (2/S - \log P100)$

Onde A, P100 e P10 são as densidades óticas obtidas em 750nm da amostra, do padrão de 100 µg e do padrão de 10 µg, respectivamente.

3.3. Determinação da atividade lipolítica

A atividade enzimática da lipase livre foi determinada pelo método descrito por Winker & Stuckman (1979) modificado por Kriger (1991) para medir a quantidade de micromoles de p-nitrofenol liberada através da hidrólise do p-NPP. Uma solução estoque de p-NPP (3mg.mL⁻¹) foi preparada em álcool isopropílico (solução A). Outra solução (solução B) foi preparada a partir de goma arábica (0.5%) e Triton X-100 (2%), ambos diluídos em tampão fosfato (pH 7; 0,05M). Em seguida 4 ml da solução A foi adicionada a 36mL de solução B (1:10). Na solução final de substrato (A+B) foram adicionados 120µl do sobrenadante (1/10) e em seguida a mistura foi incubada por 20 minutos a 37°C em banho-maria. O p-nitrofenol liberado foi determinado por espectrofotometria a 410nm.

As dosagens foram realizadas em

triplicata e como controle positivo foram utilizados sobrenadantes da cepa PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade lipolítica do sobrenadante foi calculada de acordo com a equação:

$[U = (\text{abs}) \cdot (\text{vol}) / (\epsilon) \cdot (T) \cdot (p^*)]$. Onde:

- Abs- Absorbância a 410nm
- Vol- volume do ensaio em ml
- ϵ - coeficiente de extinção molar (18,5 mL $\mu\text{Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ do p-nitrofenol)
- T- tempo em minutos
- p^* - miligrama de proteínas

A cepa bacteriana que apresentou melhor atividade enzimática foi submetida ao ensaio de decaimento de óleos e graxas (O&G).

4. Determinação do potencial lipolítico da enzima bruta pelo decaimento de óleos e graxas (O&G) em amostras de efluentes domésticos pelo método de extração Soxhlet.

4.1. Preparo de suspensões bacterianas para utilização no ensaio de decaimento de óleos e graxas

A cepa PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*– (controle positivo) e a cepa ambiental Q1 foram cultivadas em meio LB suplementado com 5% de óleo de soja (Liza) sob agitação de 150 rpm, em shaker orbital (Nova Ética), a 30°C por 18 horas. Após este período os tubos foram centrifugados a 3.600 rpm a 25°C por 10 minutos. O precipitado obtido foi utilizado para o preparo das suspensões bacterianas em meio LB com DO_{680nm} = 0,2. Após esta etapa, foram inoculados 1mL destas suspensões bacterianas em Erlenmeyers contendo 100ml de meio LB suplementado com 10% de óleo de soja. Estes foram também mantidos sob agitação de 150 rpm, em shaker orbital, a 30°C por 24 horas. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 4°C e 3.600 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram congelados a -20°C.

4.2. Coleta de efluente gorduroso doméstico para decaimento de O&G

A coleta do efluente foi realizada pela manhã, após 12 horas sem a inserção de detergentes e outros produtos químicos na caixa de gordura. Foram coletados 2, 5 litros de efluente gorduroso, que foram deixados em repouso sobre a bancada para decantação de detritos. Após a decantação, o sobrenadante foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.3. Ensaio do decaimento de O&G pelo método de extração Soxhlet

Em erlenmeyers contendo 400mL de efluente doméstico autoclavado foram inoculados isoladamente 100 mL dos sobrenadantes bacterianos das cepas PAO-1 e Q1. Como controle negativo foi utilizado 100mL de meio LB suplementado com óleo de soja (Liza) a 10%. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C por um período de 20 horas sob agitação de 200 rpm em shaker orbital (Nova Ética). Após este período, as amostras de efluentes foram congeladas a -20 °C até o ensaio de decaimento.

O teor de óleos e graxas é um indicador global representativo de um grupo de substância com características semelhantes determinadas quantitativamente com base em sua solubilidade comum em um solvente de extração orgânico.

As amostras de efluentes contendo frações de óleos e graxas, após sofrer decaimento orgânico pela ação de enzimas presentes nos sobrenadantes das culturas (controle negativo, PAO-1 e Q1) foram conduzidas ao ensaio de determinação de O&G pelo método de extração Soxhlet. As amostras em suspensão foram filtradas em funil de Büchner contendo papel de filtro especial (Watman 40). Para evitar a perda do elemento quantificado (O&G) foi feita uma cama de terra diatomácea na superfície do papel de filtro, pela filtração de uma suspensão

de terra diatomácea preparada previamente (10g de terra Diatomácea/1L de água destilada). Em seguida cada amostra foi lentamente filtrada. O material retido na terra diatomácea foi transferido para um cartucho de extração, e o mesmo acondicionado no extrator Soxhlet, que foi conectado a um balão de fundo chato contendo o solvente de extração n-hexano. A extração foi conduzida por evaporações e condensações sucessivas do solvente por 4 horas. Após este período, o balão contendo o material extraído foi conduzido ao evaporador rotatório para eliminação do solvente e, por fim, o balão foi levado à estufa a 60 °C para secagem até peso constante. Esse procedimento é feito levando o balão à estufa por 1 hora e, posteriormente, ao dessecador para resfriar sem condensar e permitir a pesagem à balança analítica para aferição do peso constante. Inicialmente, foi determinada a massa de cada balão onde ocorreu a extração. O teor de O&G foi determinado através da Equação:

$$\text{Mg de óleos e graxas/L} = \frac{P1 - P0 \times 1000}{\text{volume da amostra (L)}}$$

Onde:

P1 = massa em gramas do balão com resíduo de O&G

P0 0 = massa em gramas do balão vazio

5. Análises Estatísticas

Os resultados representam médias $\pm$ erros padrões (SEM) dos valores obtidos. Seguida de análise de variância (ANOVA) que determina diferenças estatísticas entre os grupos. As análises e confecção de gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

1. Seleção de cepas bacterianas com atividade lipolítica pelo método Rodamina B.

A Figura 1A apresenta os resultados da triagem pelo ensaio da Rodamina B das cepas isoladas a partir da rizosfera da chicória e da

couve, bem como dos efluentes gordurosos. Dos 45 isolados da rizosfera de chicória encontramos apenas 1 cepa positiva (CH02). A partir da rizosfera de couve foram testadas 39 cepas, das quais 03 cepas foram positivas para atividade lipolítica (C24, C37, C38). Portanto dos 84 isolados do solo associados à rizosfera da chicória e da couve apenas 4,8% dos isolados foram positivos para a atividade lipásica. Ao passo que das 18 cepas isoladas de caixa de gordura testadas 05 (E4, Ni1, Ni2, Q1 e Q2) mostraram-se positivas para a atividade lipásica, correspondendo a 27,78% do total dos isolados A Figura 1B mostra a atividade lipolítica positiva da cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 pelo método da Rodamina B.

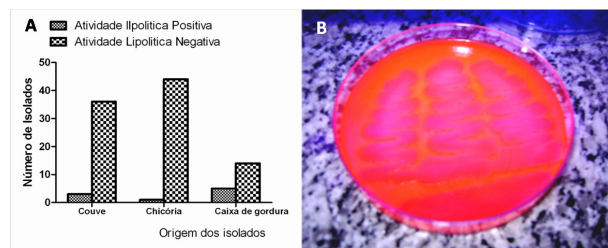


Figura 1. Seleção de cepas bacterianas com atividade lipolítica utilizando o método qualitativo da Rodamina B. A- Número de isolados bacterianos com atividade lipolítica pelo método da Rodamina B. Foram considerados como resultado negativo, cepas que não emitiram nenhuma fluorescência quando expostas a luz ultravioleta (365nm); Como resultados positivos para atividade lipásica foram considerados as cepas que emitiram fluorescência quando expostas a luz ultravioleta (365nm), apresentando halo fluorescente ao redor das colônias; Os resultados foram obtidos após 48 horas de cultivo em meio com Rodamina B. B- Atividade lipolítica positiva da cepa PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Determinação da atividade lipolítica das cepas bacterianas selecionadas pelo método da Rodamina B.

A Figura 2A representa os valores médios (U.g-1 de proteína) da determinação da atividade lipásica nos sobrenadantes de

culturas das cepas isoladas da rizosfera de couve e de chicória comparadas à atividade lipásica nos sobrenadantes de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1) usada como controle positivo. Observamos os seguintes valores expressos em U/g de ptn: CH02 ($4,4 \pm 0,2$), C24 ($3,1 \pm 0,4$), C37 ($3,5 \pm 0,8$), C38 ($5,8 \pm 0,5$) e PAO-1 ($4,38 \pm 0,5$). Quando comparamos a atividade lipásica nos sobrenadantes dos isolados da rizosfera com a atividade lipásica dos sobrenadantes da cepa controle PAO-1 (100%) foi observado que a cepa C38 isolada da rizosfera da couve apresentou uma atividade lipásica de 32,4% superior ao controle positivo, embora não tenha sido estatisticamente diferente (Figura 2B). Os percentuais médios obtidos foram $97,8 \pm 4,2\%$ para a cepa CH02, $67,9 \pm 8,3\%$ para C24, $77,06 \pm 17,8\%$ para C37, $132,4 \pm 11,8\%$ para C38.

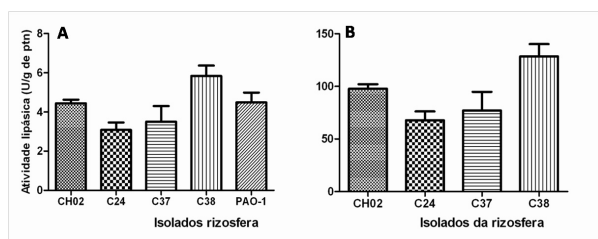


Figura 2. Atividade lipásica das cepas bacterianas isoladas de amostras de solo associadas à rizosfera. A. Determinação da atividade lipolítica de cepas isoladas da rizosfera e da cepa controle positivo PAO-1. Os resultados representam valores médios $\pm$ erro da média da atividade lipolítica dos sobrenadantes das cepas isoladas da rizosfera da couve e chicória em U/g de ptns. B - Percentual de aumento da atividade lipolítica de cepas isoladas da rizosfera da chicória e da couve. Resultados representam percentuais médios $\pm$ erros da média do aumento da atividade lipolítica de cepas isoladas na rizosfera de chicória e couve tendo como referência a cepa controle de *Pseudomonas aeruginosa* (100% de atividade lipolítica). As médias foram obtidas de resultados de três experimentos realizados em triplicata.

A figura 3A representa valores médios $\pm$ erros da média, expressos em U/g de ptn obtidos na determinação da atividade lipolítica de cepas isoladas de efluentes gordurosos domésticos provenientes de caixas de gordura comparadas à cepa controle PAO-1. A cepa Q1 ($6,2 \pm 0,36$ U/g de ptn) apresentou atividade lipásica significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparada a atividade lipásica de PAO-1 ($4,38 \pm 0,5$ U/g de ptn). Embora a cepa E4 tenha apresentado um aumento na atividade lipásica ($5,6 \pm 0,3$ U/g de ptn), quando comparada à cepa PAO-1, este não foi significativo. Por outro lado, as cepas Ni e Q2 apresentaram atividade lipásica inferior a PAO-1, sendo a atividade lipolítica de Ni foi significativamente menor ($p < 0,05$) que a cepa padrão. A figura 3B representa o percentual de aumento da atividade lipásica das cepas Q1 e E4 quanto comparadas à atividade lipásica da cepa controle PAO-1 (100% da atividade lipolítica). Observamos que as cepas isoladas de caixas de gordura obtiveram percentuais médios de $150,3 \pm 7,1\%$ (Q1) e $129,3 \pm 7,6$ (E4).

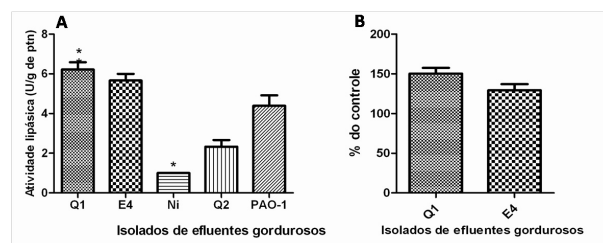


Figura 3- Determinação da atividade lipolítica de cepas isoladas de efluentes gordurosos domésticos (caixas de gordura). A. Atividade lipolítica de cepas isoladas de efluentes gordurosos domésticos (caixas de gordura). * $p < 0,05$ quando a atividade lipolítica das cepas isoladas de caixas de gordura foi comparada a cepa controle PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*. B. Percentual (%) de aumento da atividade lipolítica de cepas isoladas de efluentes gordurosos domésticos (caixas de gordura). Resultados representam percentuais médios $\pm$ erros da média do aumento da atividade lipolítica de cepas isoladas de caixas de gordura tendo por referência a cepa controle de *Pseudomonas aeruginosa* (100%). Os resultados representam médias $\pm$ erros da média de 2 experimento realizado em triplicata

3. Decaimento de óleos e graxas (O&G)

Para avaliar a eficiência do isolado com atividade lipolítica na degradação do efluente gorduroso, selecionamos a cepa de referência PAO-1 e a cepa Q1 que teve maior atividade lipásica. A Figura 4A representa médias $\pm$ erros da média dos resultados do decaimento de O&G (g.L⁻¹) obtida de 2 experimentos realizados em duplicata. Observamos que a cepa Q1 apresentou um teor de O&G de $2,05 \pm 1,3$ g.L⁻¹ enquanto que PAO-1 e o controle negativo apresentaram os valores de $3,9 \pm 1,6$ g.L⁻¹ e $7,16 \pm 0,13$ g.L⁻¹, respectivamente. O maior decaimento de O&G do sobrenadante da cepa Q1 pode ser melhor evidenciado na Figura 4B. Onde observamos um percentual de $28,6 \pm 18,8\%$ de teor de O&G em apenas 20 horas de tratamento com caldo bruto da cepa Q1. Ao passo que o tratamento com sobrenadante da cepa de referência PAO-1 teve $54,5 \pm 22,5\%$ de teor de O&G. Estes percentuais foram obtidos quando o teor de O&G encontrado na amostra de efluente gorduroso sem tratamento (controle negativo) foi considerado como 100%.

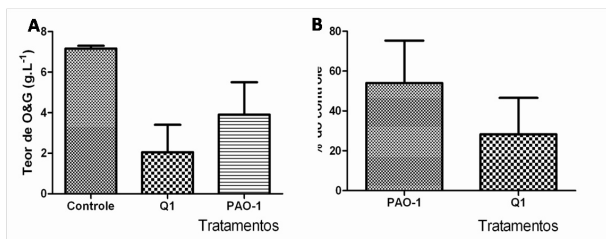


Figura 4- Decaimento de óleos e graxas (O&G). A. Os resultados representam médias $\pm$ erro da média de dois experimentos, onde o teor de gordura é expresso em g.L⁻¹. B. Representam os percentuais médios $\pm$ erro da média dos percentuais do teor de O&G quando o controle negativo foi utilizado como 100%.

DISCUSSÃO

O percentual de cepas com atividade lipásica positiva, isoladas de caixas de gordura, foi de 27,8% do total de cepas analisadas enquanto que o percentual de cepas com atividade lipásica isoladas da rizosfera da couve e da chicória foi de 4,8%, embora tenha sido testado um maior número de isolados oriundos do solo.

Rhaman et al. (2007) relatam que ambientes oleosos (esgoto, lixo, lixeiras, fábricas e efluentes gordurosos) são propícios ao surgimento de microrganismos lipolíticos. Em acordo com estes dados, Falcone (2009) pesquisando cepas produtoras de lipase e sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento, encontrou 24 cepas bacterianas com atividade lipolítica. Sendo que 17 isolados foram provenientes de espuma de caixa de gordura residencial e 7 de espuma de caixa de gordura do restaurante universitário. Nossos dados levam a ratificar que pressões ambientais são fatores cruciais para a expressão de enzimas por microrganismos, como lipases, tendo em vista que a atividade lipolítica de cepas isoladas de caixas de gordura foram maiores que as encontradas com as cepas da rizosfera. Além do fato da cepa Q1, isolada da caixa de gordura doméstica ter tido uma maior decaimento no teor de O&G que a cepa de referência PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Estes resultados nos levam a sugerir que os efluentes gordurosos parecem ser a melhor fonte de obtenção de novas espécies bacterianas produtoras de lipase.

CONCLUSÃO

O percentual de cepas positivas encontradas nos isolados de caixas de gorduras domésticas e a eficiência da degradação do teor de O&G pela cepa Q1 nos estimulam a buscar por novos produtores de lipase nestes efluentes gordurosos para futuras aplicações no saneamento ambiental.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro concedido pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) que possibilitou a realização deste trabalho. Ao Laboratório de Tecnologia Ambiental-UERJ (LABTAM/UERJ) e a professora Mônica Regina da Costa Marques pelo apoio na realização dos testes de decaimento de óleos & graxas.

Referências Bibliográficas

- BERTON AC, GEHM DH, SCHNITZLER DC, DURLI E. 2011. Tratamento de efluentes de indústrias de alimentos com lipase comercial para redução de altos teores de óleos e graxas. Sociedade Brasileira de Química.
- CAMMAROTA MC, FREIRE DMG. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 17, p. 2195–2210.
- CARVALHO PO, CALAFATTI SA, MARASSI M, SILVA DM, CONTESINI FJ, ZIBACO R. 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, V.28: 614-621.
- CASTRO HF, MENDES AA, SANTOS JC, AGUIAR CL. 2004. Modificação de Óleos e Gorduras por biotransformação. *Química Nova*, V.27.: 146-156.
- MENDES AA, CASTRO HF. 2005. Aplicação de Lipases no Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos. *Química Nova*, V.28: 296-305.
- DUEHOLM TE, ANDREASEN KH, NIELSEN PH. 2001. Transformation of lipids in activated sludge. *Water Science & Technology*, 42: 165-172.
- FALCONE CO. Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental)-Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- FERREIRA, JVR. Bioprospecção e identificação de microrganismos com potencial biotecnológico para biorremediação na interface solo-planta-microrganismos. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação Tecnologia em Biotecnologia) — Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro.
- HABA E, BRESCO O, FERRER C, MARQUES A, BUSQUETS M, MANRESA A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*. n. 26: p40-44.
- JAEGER KE, REETZ MT. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. vol. 16, p. 396-403.
- KRIEGER N. 1995. Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum*. Curitiba. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências– Bioquímica)– Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MENDES AA, CASTRO HF, PEREIRA EB, FURIGO JÚNIOR A. 2005. Aplicação de Lipases no Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos. *Química Nova*.
- PETERSON GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal. Biochem*. p.83: 346-356.

RAHMAN RNZRA, LEOW TC, SALLEH AB, BASRI M. 2007. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *Microbiology*. 7:77.

VIDAL G, CARVALHO A, MENDEZ R, LEMA JM. 2000. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 3, p. 231-239.

WILLEY R. 2001. Fats, oils and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 50, n. 2, p. 127-133.

WINKLER, UK, STUCKMANN M. 1979. Glycogen, Hyaluronate and some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. vol. 138, n. 3, p. 663-670.