

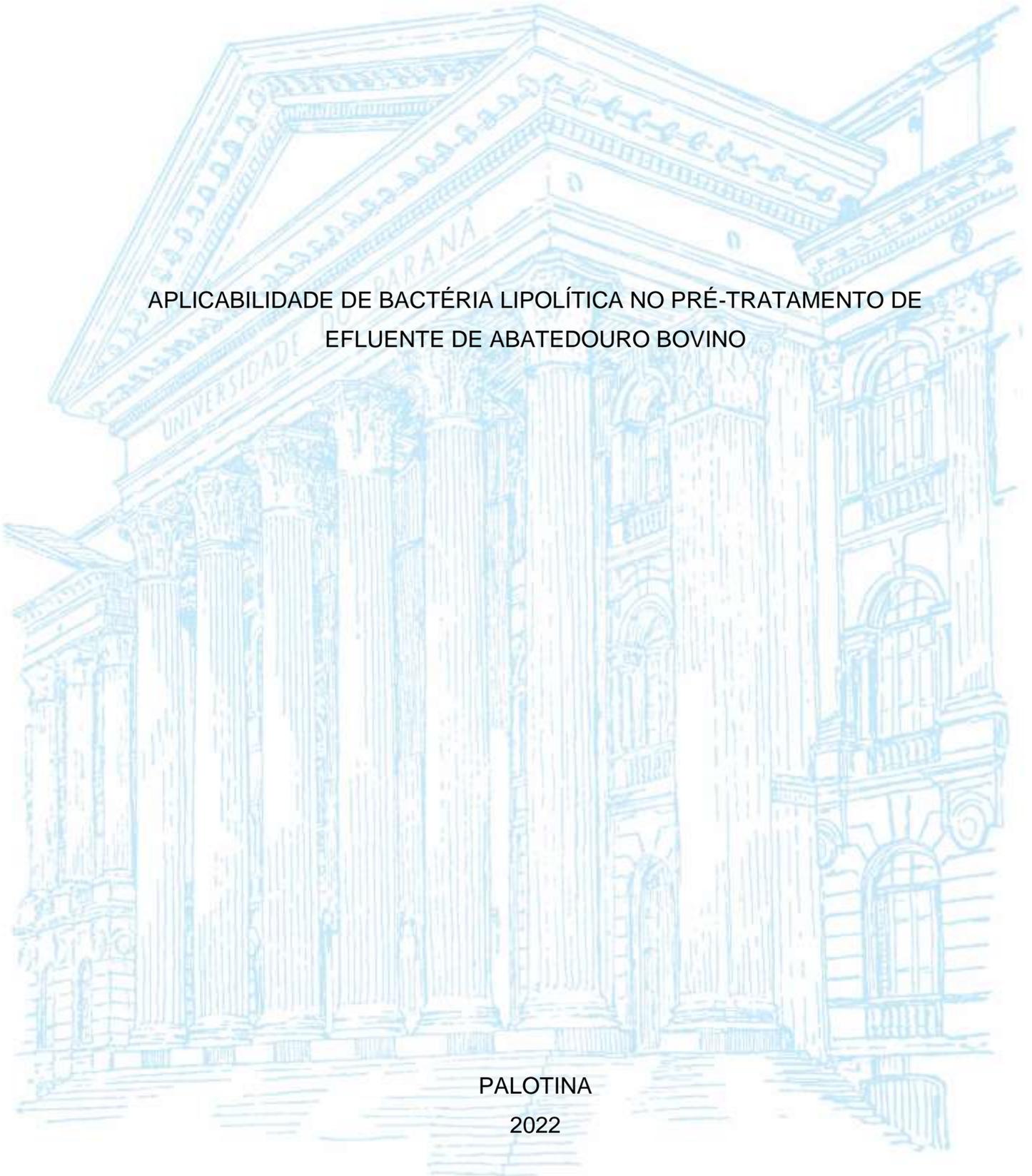
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAREN JAQUELINE HASELROTH

APLICABILIDADE DE BACTÉRIA LIPOLÍTICA NO PRÉ-TRATAMENTO DE
EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO

PALOTINA

2022



KAREN JAQUELINE HASELROTH

APLICABILIDADE DE BACTÉRIA LIPOLÍTICA NO PRÉ-TRATAMENTO DE
EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliane Hermes

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos três dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois, às catorze horas, na Sala virtual https://teams.microsoft.com/join/19-gLStwWxD1vKVURwi7kFegtoK_RK1sGP-yVaRVYEc2pM1@thread.tacv2/1650309668343?context=%7B%22id%22:%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22,%22oid%22:%22a3259794-2233-44ec-9103-67b93c0e2eeb%22%7D da Plataforma Microsoft Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Aplicabilidade de Bactéria Lipolítica no Pré-Tratamento de Efluente de Abatedouro Bovino" apresentado pela discente Karen Jaqueline Haselroth, orientada pela Profa. Dra. Eliane Hermes, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Eliane Hermes, nota: 100 (cem), Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem), e Profa. Dra. Raquel Stroher, nota: 100 (cem). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 100 (cem). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ELIANE HERMES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/05/2022, às 16:08, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/05/2022, às 16:11, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/05/2022, às 14:42, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4449518** e o código CRC **7BC0C4D0**.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me iluminado e me dado forças durante esta caminhada.

À minha orientadora, Professora Dra. Eliane Hermes, pela orientação, dedicação, paciência, amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dra. Adriana Fiorini Rosado e Prof. Dra. Raquel Ströher. Muito obrigada por aceitaram a fazer parte da banca e disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

À minha família, pelo incentivo e por todo o apoio.

Aos colegas de laboratório Ingrid, Poline e Victor, pelo auxílio incondicional nos experimentos.

À Prof. Adriana e Gabriéli por toda dedicação e auxílio na identificação dos microrganismos.

Aos técnicos Raquel, Maiara e Guilherme por toda ajuda e paciência.

Aos meus amigos, em especial a vocês, Cassia, Ingrid e Poline, por toda ajuda, incentivo e conforto transmitidos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Considerando a crescente geração de efluentes bovinos e seu alto potencial poluidor, aliado aos poucos estudos referentes ao uso de lipases microbianas na remoção de matéria orgânica de efluente do processamento de carnes, é fundamental identificar métodos de tratamento que possam auxiliar na redução do poder poluente de tais efluentes. Uma possibilidade que tem se tornado cada vez mais empregada é o pré-tratamento dos efluentes com o uso de enzimas microbianas, tais como as lipases. Essas enzimas apresentam grande importância pois promovem a hidrólise de óleos e graxas, resultando em uma melhor eficiência nos tratamentos posteriores. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o pré-tratamento de efluentes de um abatedouro de bovinos por meio de microrganismos produtores de lipase isolados do próprio resíduo. Inicialmente foi realizada a caracterização físico-química do efluente e a partir desse resíduo foram selecionados e isolados microrganismos com potencial de produção de lipase. Posteriormente, foi realizado o cálculo do índice enzimático dos microrganismos e as três bactérias que apresentaram os maiores índices foram selecionadas para identificação. A bactéria que obteve a maior atividade lipolítica foi utilizada para o preparo do inóculo a ser utilizado na etapa do pré-tratamento do efluente. Para tal, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como variáveis independentes: pH, temperatura e concentração de inóculo e variáveis respostas: atividade lipolítica, demanda química de oxigênio (DQO) e óleos e graxas (O&G) ao longo de 72 h. A água residuária de abatedouro bovino apresentou alto potencial poluidor, tendo uma concentração de O&G de 2553,3 mg L⁻¹ e DQO de 8914,4 mg L⁻¹. Das seis culturas microbianas isoladas, três microrganismos foram selecionados, apresentando um alto potencial de produção de lipase, com índice enzimático de 3,50, 3,12 e 2,11 e destes o microrganismo com maior atividade lipolítica (2,46 U mL⁻¹) foi utilizado como inóculo no pré-tratamento, sendo identificado como *Aeromonas hydrophila*. Após 72 h de experimento foram alcançadas atividade lipolítica de 1,40 U mL⁻¹, remoções de 67% de DQO, 59% de O&G. Foi possível concluir que o efluente de abatedouro bovino é uma excelente fonte para a obtenção de microrganismos produtores de lipase e que a utilização de enzimas, como lipases bacterianas no tratamento deste efluente se mostra uma alternativa promissora.

Palavras-chave: lipase, matéria orgânica, pré-tratamento enzimático, resíduos.

ABSTRACT

Considering the growing generation of bovine effluents and their high polluting potential, associated with few studies regarding the use of microbial lipases in the removal of organic matter from meat processing effluents, it is essential to identify treatment methods that can help reduce the polluting power of such effluents. An alternative that has become increasingly used is effluent pretreatment using microbial enzymes, such as lipases. These enzymes are important because they promote the oils and greases hydrolysis, resulting in better efficiency in subsequent treatments. Therefore, this study aimed to evaluate the pretreatment of cattle slaughterhouse effluents through lipase producer's microorganisms, isolated from residues. Initially, was performed the physical-chemical characterization of the effluent, and from that residue was selected and isolated microorganisms with the potential to produce lipases. Subsequently, the enzymatic index of the microorganisms was calculated, and three bacterial isolates with the highest indexes were selected for identification. The bacterium that had the highest lipolytic activity was used to prepare the inoculum for the effluent pretreatment stage. For that, a central rotational compound design (DCCR) was used, with these independent variables: pH, temperature and inoculum concentration, and responses variables: lipolytic activity, chemical oxygen demand (COD), and oils and greases (O&G), over 72 h. Bovine slaughterhouse wastewater had high polluting potential, with a 2553.3 mg L⁻¹ O&G concentration and an 8914.4 mg L⁻¹ COD. Of the six isolated microbial cultures, three microorganisms were selected, showing a high lipase production potential, with a 3.50, 3.12 and 2.11 enzymatic index and the highest lipolytic activity microorganism (2.46 U mL⁻¹) was used as inoculum in the pre-treatment, identified as *Aeromonas hydrophila*. After a 72 h experiment, was obtained the lipolytic activity of 1.40 U mL⁻¹, 67% COD removal, 59% O&G. It is therefore concluded that bovine slaughterhouse effluent is an excellent source of lipase-producing microorganisms and the use of enzymes, as the bacterial lipases, in this effluent treatment is a promising alternative.

Keywords: lipase, organic matter, enzymatic pretreatment, residues.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO GERAL DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO OU A REAÇÃO REVERSA, SÍNTESE, CATALISADA POR LIPASES.....	22
FIGURA 2 - FOTOS ILUSTRATIVAS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO OBSERVADOS NOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.	41
FIGURA 3 - BACTÉRIA 1: A) BACILOS GRAM NEGATIVOS; B) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. BACTÉRIA 2: C) BACILOS GRAM NEGATIVOS; D) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. 3: E) BACILOS GRAM NEGATIVOS; F) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS.....	43
FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.	48
FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO PH (A). GRÁFICO DE CONTORNO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).	49
FIGURA 6 - GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE DQO.....	53
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INOCULO E PH (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DE PH E TEMPERATURA (B).	55
FIGURA 8 - GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G.....	66
FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CONFORME A UNIÃO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR.	21
TABELA 2 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS E METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	28
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO DOS MICRORGANISMOS.....	33
TABELA 4 - VALORES CODIFICADOS E REAIS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (DCCR).....	37
TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO (DCCR) COM QUADRUPLICATA NO PONTO CENTRAL EM SEUS VALORES CODIFICADOS E REAIS.....	38
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO.	39
TABELA 7 - MÉDIA DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE) ENCONTRADO PARA CADA MICRORGANISMO, BASEADO NA RELAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA COLÔNIA E O DIÂMETRO DO HALO.	41
TABELA 8 - DADOS DE TESTE DE GRAM, CATALASE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.....	42
TABELA 9 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO RDNA 16S DOS ISOLADOS 1, 2 E 3.....	44
TABELA 10 - ATIVIDADE LIPOLÍTICA E DOSAGEM PROTEICA PARA CADA MICRORGANISMO.....	45
TABELA 11 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	47
TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.	48
TABELA 13 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE DQO.....	52
TABELA 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE DQO.	54
TABELA 15 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES A REMOÇÃO DE DQO COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.....	56
TABELA 16 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE O&G.....	65

TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE O&G.	67
TABELA 18 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES A REMOÇÃO DE O&G COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

A – Atividade lipolítica

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

APHA - American Public Health Association

AGL – Ácidos Graxos Livres

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

DQO - Demanda Química de Oxigênio

F_{calc} – F calculado (teste “F”)

F_{tab} – F tabelado (teste “F”)

F_{faltadeajuste} - Valor de F tabelado para a falta de ajuste

IE – Índice Enzimático

I – Concentração de inóculo

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio

MgSO₄ .7H₂O - Sulfato de Magnésio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl

O&G - Óleos e Graxas

PIB – Produto Interno Bruto

p/v – Peso por volume

pH - Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotação por minuto

R² – Coeficiente de Determinação

ST – Sólidos Totais

SF – Sólidos Fixos

SV – Sólidos Voláteis

UFC – Unidades formadoras de colônia

v/v – Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PRODUÇÃO E ABATE DE BOVINOS	16
2.2 EFLUENTES GERADOS EM ABATEDOUROS DE BOVINOS	16
2.3 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DE EFLUENTES DE ABATEDOUROS BOVINOS	18
2.4 ENZIMAS	20
2.5 LIPASES	21
2.6 PRODUÇÃO DE LIPASES.....	22
2.7 ATIVIDADE LIPOLÍTICA	24
2.8 APLICAÇÃO DE LIPASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	27
3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	27
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	27
3.3.1 pH.....	28
3.3.2 DQO Total	28
3.3.3 Óleos e graxas	29
3.3.4 Sólidos totais, fixos e voláteis.....	29
3.3.5 Nitrogênio Total	30
3.3.6 Ácidos Graxos Livres.....	31
3.3.7 Proteína Solúvel	32
3.3.8 Carboidrato.....	32
3.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	33
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	34
3.6 PROCESSO FERMENTATIVO	34
3.6.1 Atividade lipolítica.....	35
3.6.2 Dosagem proteica	36

3.7 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO	36
3.7.1 Preparo do inóculo	36
3.7.2 Delineamento experimental.....	36
3.7.3 Análise estatística	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	39
4.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	40
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	41
4.4 PROCESSO FERMENTATIVO	45
4.5 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO	46
4.5.1 Atividade lipolítica detectada no efluente de abatedouro bovino.....	46
4.5.2 Demanda Química de Oxigênio	51
4.5.3 Óleos e graxas	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE.....	88

1 INTRODUÇÃO

O alto consumo de água pelos frigoríficos resulta em grandes volumes de efluentes, que requerem tratamento adequado, e por sua vez, dependem de fatores como a fonte de descarte, composição química, componentes suspensos e dissolvidos, entre outros (TAHREEN, JAMI e ALI, 2020).

As unidades de processamento de carnes estão classificadas entre as indústrias mais poluidoras, seus efluentes, possuem em sua composição elevado teor de lipídeos e proteínas e ao serem lançados nos corpos hídricos podem causar a diminuição do oxigênio dissolvido no meio e luz solar, resultando em efeitos adversos no ecossistema aquático (MENDES e CASTRO, 2005; ROSA et al., 2009). Conseqüentemente, águas residuais requerem um tratamento eficiente para um lançamento adequado para o meio ambiente, se adequando aos padrões de lançamentos exigidos pelas legislações vigentes (PANDEY et al., 2017; KLAUCANS e SAMS, 2018).

Grande parte das indústrias utiliza métodos físico-químicos para a remoção de óleos e graxas durante as etapas de tratamento de seus efluentes, no entanto, estes apresentam como principais desvantagens a geração de lodos impróprios para descarte e a baixa taxa de eficiência (KURNIAWAN et al., 2006; ADULKAR e RATHOD, 2013). Além disso, os altos teores de óleos e graxas presentes em tais efluentes representam um grande desafio para o subsequente tratamento biológico (BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2015). Visando aumentar a eficiência de tais tratamentos, uma alternativa é a utilização de uma etapa de pré-tratamento enzimático destes efluentes (DORS et al., 2013; AFFES et al., 2017; CHENG et al., 2020).

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações bioquímicas ao reduzir a energia de ativação, melhorando a taxa de reação de hidrólise dos lipídeos (ROBINSON, 2015; SHARMA; DANGI e SHUKLA, 2018; SAMARASIRI, RATHNASIRI e DAVE, 2020). Além disso, a catálise enzimática tem mais vantagens na degradação de moléculas em águas residuais e dejetos animais do que a catálise físico-química devido a sua atuação sob condições de reação brandas, altamente eficiente e ecologicamente correta e de especificidade catalítica, sem afetar outros nutrientes na amostra (BRANDELLI, SALA e KALIL, 2015; JAMIE et al., 2016; YAO et al., 2020).

As lipases desempenham um importante papel no pré-tratamento de águas residuais contendo gorduras e graxas, elas catalisam a hidrólise do triacilglicerol em ácidos graxos de cadeia longa e glicerol (BEHERA, VELUPPAL e DUTTA, 2019; HITCH e CLAVEL, 2019; CHENG et al., 2020). O pré-tratamento enzimático com o uso de lipases proporciona significativas remoções de DQO de águas residuais, também possibilita melhorar a produção de biogás no tratamento anaeróbio de águas residuais com alto teor de óleos e graxas (DUARTE et al., 2015; CHENG et al, 2020). Além disso, para tal aplicação elas não exigem purificação, o que possibilita serem produzidas pela própria indústria, resultando em redução no custo de sua produção (RIGO et al., 2008; VERMA et al., 2012).

1.1 JUSTIFICATIVA

No ano de 2020, o Brasil se posicionou como o detentor do maior rebanho bovino do mundo, terceiro maior e o maior exportador (ABIEC, 2021a). O aumento da produção e o elevado número de abates de bovinos no país contribuem diretamente para o aumento da geração dos efluentes líquidos e dos impactos ambientais provenientes desta atividade (CAVALLINI; SILVA e GONZAGA, 2017).

O efluente oriundo do abate bovino possui em sua composição elevada carga orgânica decorrente da presença de lipídeos, que juntamente com proteínas e carboidratos se caracterizam como um dos principais componentes orgânicos de águas residuárias (PEREIRA et al., 2006; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2015). Quando lançados nos corpos hídricos sem um tratamento adequado, afetam a qualidade da água, principalmente por causar uma redução do oxigênio dissolvido, o que pode provocar sérios danos a esse ecossistema, podem aumentar a Demanda Química de Oxigênio (DQO), além de provocar à morte de peixes e outros organismos aeróbios. Além disso, macronutrientes, como nitrogênio e fósforo, podem causar eventos de eutrofização (BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2017; CHENG et al., 2020; NIMKANDE e BAFANA, 2022). Como consequência, as legislações referentes ao descarte destas águas residuais em corpos d'água tem sido intensificadas, devido à preocupação com o meio ambiente, sendo obrigatório o tratamento dos efluentes antes do seu descarte (PANDEY et al., 2017; KLAUCANS e SAMS, 2018).

Uma das alternativas para o tratamento desses resíduos se refere a utilização de enzimas, como as lipases, visto que podem reduzir significativamente o teor de

óleos e graxas no efluente, e consequente redução da quantidade de sólidos suspensos. Com isso, pode-se melhorar o desempenho da população microbiana nos estágios do tratamento subsequentes, além de respeitar as rigorosas regulamentações ambientais, por ser uma alternativa limpa e sustentável (VALLADÃO, CAMAMAROTA e FREIRE, 2011; ALEXANDRE et al., 2011; DUARTE et al., 2015; PANDEY et al., 2017; MENG et al., 2017; DAMASCENO et al., 2018; CHENG et al., 2020).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de bactéria lipolítica no pré-tratamento enzimático de efluente de abatedouro bovino.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a água residual proveniente de abatedouro bovino, quanto as suas características físico-químicas;
- Realizar o isolamento de microrganismos com atividade lipolítica do efluente em estudo;
- Selecionar e identificar o microrganismo com maior potencial lipolítico por meio da atividade enzimática;
- Avaliar a aplicação do microrganismo selecionado no pré-tratamento do efluente em estudo;
- Determinar o efeito das variáveis de pH, temperatura e concentração de inóculo, nos parâmetros de atividade lipolítica, DQO e óleos e graxas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E ABATE DE BOVINOS

A carne é considerada uma excelente fonte de nutrientes de qualidade e tem se destacado como parte integrante da dieta da maioria das pessoas em todo o mundo (BETHI et al., 2020). A pecuária brasileira é uma das atividades mais importantes do agronegócio, e considerada uma das mais competitivas do mundo (TEIXEIRA e HESPANHOL, 2014; DE CARVALHO e DE ZEN, 2017). Em 2020, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC) o PIB da pecuária de corte cresceu 20,8%, representando 10% do PIB total (ABIEC, 2021a).

No ano de 2020, o Brasil se posicionou como o detentor do maior rebanho bovino do mundo com cerca de 187,5 milhões de cabeças, terceiro maior consumidor (35,7 kg/habitante/ano) e o maior exportador (2,7 mil de toneladas equivalente carcaça) (ABIEC, 2021a). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), no 2º trimestre de 2021 foram abatidas 7,08 milhões de cabeças de bovinos sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária, sendo que essa quantidade foi 7,4% maior que a do 3º trimestre de 2020. A região que apresentou a maior proporção de abate no período foi a Centro-Oeste, responsável por 38,1% do total, seguida pelas Regiões Norte (21,6%), Sudeste (21,3%), Sul (11,0%) e Nordeste (8,0%).

2.2 EFLUENTES GERADOS EM ABATEDOUROS DE BOVINOS

O aumento da produção e o alto número de abates de bovinos no país contribuem diretamente para o aumento da geração dos efluentes líquidos e dos impactos ambientais provenientes desta atividade (CAVALLINI; SILVA e GONZAGA, 2017; GREENWOOD, 2021). Essa relação é decorrente do grande uso de água durante todo o processo. Estima-se que a atividade de abate de bovinos consome de 2,5 a 9 m³ de água por animal (CAVALLINI; SILVA e GONZAGA, 2017). As águas residuárias de abatedouros são geradas em diferentes etapas do processo de abate, tais como lavagem dos animais, sangria, esfolagem, limpeza das carcaças dos animais e limpeza das salas de abate (MANIOS et al., 2003; PACHECO e YAMANAKA, 2008; CUADROS et al., 2011; MAMHOBU-AMADI et al., 2019).

Os efluentes de abate de bovinos apresentam uma elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), além de elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), principalmente devido à presença de sangue, que apresenta a maior DBO (200.000 mg L⁻¹) e DQO (375.000 a 400.000 mg L⁻¹) de todos os resíduos líquidos provenientes do processamento da carne (PACHECO e YAMANAKA, 2008; BOTIŞ, 2015). Além disso, contêm elevada carga orgânica devido a presença de lipídeos, que juntamente com proteínas e carboidratos se caracterizam como um dos principais componentes orgânicos de águas residuárias (PEREIRA et al., 2006; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2015). A concentração dos lipídeos nessas águas é muito variável e depende das características industriais, podendo variar de 1407 a 4680 mg L⁻¹ (JENSEN et al., 2015).

Os lipídeos, são moléculas orgânicas, hidrofóbicas, classificadas como: ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteroides. Os óleos, gorduras e graxas são as moléculas lipídicas mais abundantes na natureza, constituídas de triacilgliceróis formados de três ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008; ALBERTS et al., 2010; HUSAIN et al., 2014). O descarte de efluentes com alto teor de óleos e graxas em corpos d'água provoca sérios danos a esse ecossistema. Além de aumentar a DQO, também podem provocar a formação de filmes na superfície aquática, os quais reduzem a difusão de oxigênio da atmosfera para a água, diminuindo os níveis de oxigênio dissolvido (OD), podendo provocar a morte de peixes e outros organismos aeróbios (BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2017; CHENG et al., 2020; NIMKANDE e BAFANA, 2022).

Nesse sentido, para que a disponibilidade de água seja garantida às futuras gerações, e os impactos ambientais sejam reduzidos, órgãos governamentais estabeleceram parâmetros de qualidade para o lançamento de efluentes em corpos hídricos, os quais devem ser seguidos pelas industriais para descarte de seus efluentes nos corpos hídricos (OLIVEIRA, COELHO e DE SÁ, 2017). De acordo com a resolução 430 (CONAMA, 2011) e a legislação ambiental do Instituto Água e Terra -IAT Portaria Nº 29 (2018), o parâmetro de pH deve estar na faixa de 5 a 9, óleos e graxas e DBO o valor máximo de 50 mg L⁻¹, DQO o valor máximo de 150 mg L⁻¹ e temperatura menor que 40 °C.

2.3 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DE EFLUENTES DE ABATEDOUROS BOVINOS

Para a escolha do nível de tratamento de tais efluentes, deve ser levado em conta o tipo, a sua composição e os padrões que se pretende atingir, pois afetam diretamente a escolha do processo a ser empregado (anaeróbio ou aeróbio), os custos operacionais associados e o desempenho do sistema. Sem uma caracterização adequada, pode ocorrer um sub ou superdimensionamento da estação de tratamento, resultando em um sistema inadequado ou ineficiente (METCALF e EDDY, 2015).

O tratamento de águas residuárias pode dividir-se em preliminar, primário, secundário e terciário, utilizando métodos físicos, químicos ou biológicos (MENDES et al., 2005; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2017; PANDEY et al., 2017).

No tratamento preliminar, por ação de processos físicos ocorre a remoção dos sólidos em suspensão, partículas grandes, areia e lipídeos da porção líquida. As operações unitárias mais comuns incluem grades, desarenadores (caixa de areia), caixas de retenção de óleo e gordura, peneiras e filtros (MENDES et al., 2005; MITTAL, 2006).

O tratamento primário consiste na remoção de matéria orgânica em suspensão que pode ser realizado através de decantação, flotação ou coagulação, por ação de fatores físico-químicos (DE SENA, MOREIRA e JOSÉ, 2008; DE NARDI, FUZI e DEL NERY, 2008). Destes, a flotação por produtos químicos ou ar dissolvido é a mais utilizada na retirada de lipídeos (DE SENA, MOREIRA e JOSÉ, 2008). Apesar da eficiência de remoção melhorar significativamente, a flotação apresenta elevados custos operacionais além de gerar lodo químico, que deve ter uma destinação adequada. Ademais, ao serem encaminhados para o tratamento secundário os efluentes podem afetá-lo, visto que a adição de produtos químicos pode inibir a ação microbiana do mesmo (MENDES et al., 2005; ROSA, CAMMAROTA, FREIRE, 2006).

Os tratamentos preliminares e primários não são suficientes para tratar completamente e adequar as águas residuárias da indústria de carne aos padrões estabelecidos pela legislação. Desta forma, o tratamento secundário é utilizado para a remoção da matéria orgânica em suspensão e dissolvida restante dos tratamentos anteriores, utilizando etapas biológicas anaeróbias e aeróbias (BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2017).

O processo de tratamento anaeróbio apresenta como vantagens o menor consumo de energia, alta remoção de DQO, além da produção de biogás, no entanto, o alto teor de óleos e graxas (O&G) presente nesses efluentes pode provocar a desestabilização e redução da eficiência do mesmo (DEMIREL, YENUGUN e ONAY, 2005; PEREIRA et al., 2005; JEGANATHAN; NAKHLA E BASSI, 2007; RANI et al., 2012). A água residuária com excesso de carga lipídica pode provocar a formação de lodo com características físicas inadequadas e com elevada tendência de flotação, devido ao acúmulo de gases, além de poder provocar a formação de espuma nos biodigestores (JEGANATHAN; NAKHLA e BASSI, 2007; BOROWSKI e KUNACKI, 2015). Ademais, em temperaturas mais baixas os lipídeos podem solidificar e causar danos operacionais associados a obstruções de bombas e tubulações e odores desagradáveis (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; KLAUCANS e SAMS, 2018). No trabalho de Yasin, Mumtaz e Hassan (2013), os autores observaram que a presença de lipídeos em um biorreator anaeróbio resultou em problemas de flotação, entupimento e de transferência de massa.

No tratamento biológico aeróbio, destaca-se o processo de lodo ativado, em que ocorre o fornecimento de oxigênio para que os microrganismos possam degradar a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, gerando ao final do processo gás carbônico e água. No entanto, a elevada concentração de O&G nesse sistema pode reduzir a capacidade de trocas gasosas, possibilitando o desenvolvimento de bactérias filamentosas dificultando a sedimentação do lodo, e conseqüentemente afetando o desempenho do sistema (JUNG, CAMMAROTA e FREIRE, 2002; CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Além disso, de acordo com Chipasa e Mędrzycka (2006) os lipídeos são mais lentamente degradados pelos microrganismos em comparação às outras moléculas orgânicas, aumentando o tempo de detenção hidráulica do sistema.

Uma alternativa aos tratamentos prévios convencionais que tem atraído crescente interesse é o uso de pré-tratamento enzimático, especificamente por meio de lipases. Tais enzimas, podem reduzir significativamente o teor de O&G no efluente, melhorando o desempenho da população microbiana nos últimos estágios do tratamento biológico, além de respeitarem as regulamentações ambientais, por serem uma alternativa limpa e sustentável (CAMMAROTA e FREIRE, 2006 ; ROSA et al., 2009; MENDES et al., 2010; VALLADÃO, CAMAMAROTA e FREIRE, 2011;

ALEXANDRE et al., 2011; DUARTE et al., 2015; PANDEY et al., 2017; MENG et al., 2017).

2.4 ENZIMAS

As enzimas são consideradas biocatalisadores da natureza, tornando possíveis os processos metabólicos que ocorrem nas células. São sintetizadas nas células e formadas por longas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, articuladas em estruturas tridimensionais (KOOLMAN e ROEHN, 2005; NELSON e COX, 2011).

As enzimas podem ser obtidas por meio de plantas, animais ou microrganismos, sendo as de fonte microbiana de maior interesse industrial devido ao elevado número de microrganismos produtores, estabilidade da enzima, especificidade do substrato, menor custo de produção, fornecimento regular pela ausência de sazonalidade e facilidade de manipulação genética (CARVALHO et al., 2005; ROVEDA; HEMKEMEIER e COLLA, 2010; KANMANI; ARAVIND e KUMARESAN, 2015). As enzimas microbianas respondem por 90% do mercado global e seus produtores estão localizados principalmente na Europa e Ásia (GUERRAND, 2017).

A base da classificação das enzimas depende das reações químicas que catalisam. A nomenclatura enzimática foi estabelecida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), com divisão em sete grupos principais, nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 1).

TABELA 1- CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CONFORME A UNIÃO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR.

Classes	Função
1-Oxidoredutases	Catalisam reações de oxirredução, envolvendo oxigenações ou adição de elétrons
2-Transferases	Catalisam a transferência de grupos de um composto para outro (doador-receptor)
3-Hidrolases	Catalisam a hidrólise de várias reações, atuam em ligações éster, peptídicas e outras funções contendo a ligação CN
4-Liases	Catalisam reações de clivagem de ligações como CC, CN e CO e também os processos reversos
5-Isomerases	Catalisam a transferência de grupo de uma posição para outra
6-Ligases	Catalisam a união de ligações CC, CO, CS, CN, ésteres de fosfato e N-metal
7-Translocases	Catalisam a translocação de próton H ⁺ , cátions inorgânicos, ânions inorgânicos e seus quelatos, aminoácidos e peptídeos, carboidratos e seus derivados e outros compostos

Fonte: Adaptado de ENZYME EXPASY

Com a escolha da enzima adequada é possível controlar os produtos requeridos e minimizar as reações indesejáveis. Isso ocorre devido a diversas características enzimáticas, tais como especificidade sobre determinado substrato, atuam em altas e baixas concentrações de contaminantes, ampla faixa de pH, temperatura e salinidade, ausência de atrasos associados à aclimatação da biomassa e aumentam a taxa de reação, diminuindo a energia de ativação da reação (JOHNSON, 2013; RAY e ROSELL, 2017; SARMAH et al., 2018).

2.5 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C.3.1.1.3), são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações ésteres de triacilgliceróis, produzindo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, gliceróis e ácidos graxos, atuando na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa (Figura 1) (ALMEIDA, TAUK-TORNISIELO e CARMONA, 2013; LEE et al., 2015). Algumas lipases apresentam afinidade por ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, butírico, cáprico, decanóico, etc), enquanto outras têm preferência por ácidos graxos insaturados (ácido oleico, linolênico, etc.). Outras não apresentam especificidade e dividem aleatoriamente os ácidos graxos dos triglicerídeos. Assim, a atividade da lipase depende do comprimento da cadeia do ácido graxo, localização do

leveduras (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; ANBU et al. 2011; CHOUDHURY e BHUNIA, 2015; SILVA-BEDOYA et al., 2016).

Muitas cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas produzem a enzima lipase. Algumas das bactérias produtoras de lipase comercialmente mais importantes são reconhecidas como pertencentes ao gênero de *Bacillus*, que inclui *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* e algumas outras cepas bacterianas, como *pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Staphylococcus* sp. (SANGEETHA, GEETHA e ARULPANDI, 2010; DAOUD et al., 2013; GOWTHAMI et al., 2015; MABIZELA-MOKOENA et al., 2017; SUCI, ARBIANTI E HERMANSYAH, 2018). Bactérias lipolíticas têm sido encontradas e isoladas de diversos ambientes, como em efluentes de laticínios (PEIL et al., 2016), abatedouros (BALDO et al., 2013), fábricas de processamento de óleo vegetal (ROCHA et al., 2013) e solo contaminado com óleo (LEE et al., 2015; PATEL e DESAI, 2018).

Vários fatores físicos e químicos podem influenciar a produção de lipases, como temperatura, pH, agitação, aeração e tempo de incubação, sendo o conhecimento dessas propriedades de fundamental importância para a obtenção de alto rendimento na produção de lipases (SALIHU e ALAM, 2012; LAI et al., 2019). A determinação da melhor temperatura de produção de lipases tem como objetivo identificar o estado termodinâmico mais estável, de forma a preservar a estrutura tridimensional (evitar a desnaturação) e favorecer o aumento da atividade lipolítica (LEHNINGER, 1986). Na literatura, encontram-se temperaturas ótimas desde 15 a 80 °C (PATIL et al., 2011; KIRANA et al., 2016; JAVED et al., 2018). O pH também é um importante fator na produção de lipase e pode variar em diferentes microrganismos, apresentando atividade máxima em pH entre 5 e 10 (RAMANI et al., 2010; PATIL et al., 2011; KIRANA et al., 2016; JAVED et al., 2018). Outro fator que apresenta influência é a taxa de agitação, visto que um aumento da mesma melhora a taxa de transferência de oxigênio e a eficiência da reação. No entanto, altas taxas de agitação podem ocasionar estresse de cisalhamento, levando a efeitos negativos sobre o crescimento celular (LIU et al., 2011). De acordo com a literatura, a taxa de agitação pode variar de 100 a 250 rpm (SALIHU e ALAM, 2012). Com relação ao período de incubação necessário para atingir o máximo de produção de lipases, este varia de acordo com a espécie, podendo ser de 24 até 96 h (VISHNUPRIYA et al., 2010; DUZA e MASTAN, 2014).

A produção de lipases envolve também condições nutricionais, como tipo e concentração de carbono e nitrogênio, surfactantes e íons metálicos (RAY e ROSELL, 2017). A fonte de carbono é um dos principais fatores para expressão da atividade lipolítica pois as lipases são, em geral, enzimas indutíveis e, portanto, são produzidas na presença de um lipídeo como o óleo, ou qualquer outro indutor, como triacilgliceróis, ácidos graxos, glicerol e Tweens (VEERAPAGU et al., 2013; ALHAMDANI e ALKABBI, 2016). Como fonte de nitrogênio, a peptona, triptona e o extrato de levedura estão entre os elementos mais utilizadas para a síntese de lipases (GUPTA, GUPTA E RATHI, 2004; SOLEYMANI et al., 2017).

As lipases, são enzimas induzíveis e produzidas na presença de uma fonte lipídica, sendo assim para que sua atividade seja expressa, necessitam-se de fontes de carbono, nitrogênio e alguns micro nutrientes (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). A seleção do microrganismo que produza a lipase, juntamente com um indutor de baixo custo e que permita alta produção enzimática, é necessária e adequada para alavancar o desenvolvimento de bioprocessos para aplicações industriais de grande porte (SILVEIRA; TARDIOLI; FARINAS, 2016).

As lipases bacterianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa, como por fermentação em estado sólido. Têm sido produzidas principalmente por fermentação submersa, que faz uso de um meio de cultura líquido, facilitando a recuperação de enzimas extracelulares através de filtração simples ou centrifugação (GUPTA; GUPTA e RATHI, 2004; VEERAPAGU et al., 2013; ROBINSON, 2015; SUCI, ARBIANTI e HERMANSYAH, 2018).

2.7 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A reação com lipase libera ácidos graxos do substrato por meio da sua ação hidrolítica. A atividade de lipases pode ser determinada direta ou indiretamente pelo consumo do substrato ou pela formação dos produtos (liberação de ácidos graxos) (GONÇALVES, 2007). Diversos métodos, quantitativos e qualitativos, foram desenvolvidos para indicar a atividade em soluções de lipase bruta ou purificada, não existindo um método universal de ensaio de lipase (GUPTA; GUPTA e RATHI, 2004).

O cultivo em meio sólido suplementado com triacilglicerídeos é uma metodologia para a seleção qualitativa prévia de microrganismos produtores de lipase. O método consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia do microrganismo,

por meio da atuação da enzima sobre substratos indutores que foram adicionados ao meio, como óleos vegetais, tributirina e Tween (CARDENAS et al., 2001; DAMASO et al., 2008). Além disso, com a formação do halo é possível quantificar o Índice Enzimático (IE), que pode ser expresso pela relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato e o diâmetro de crescimento da colônia do microrganismo (HANKIN, ZUCKER e SANDS, 1971; HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

A capacidade de produção de lipase de um microrganismo também pode ser determinada usando vários métodos quantitativos, como método titulométrico, espectrofotométrico, cromatográficos e métodos moleculares. O mais comum é o método titulométrico, no qual é realizado a titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto, sobre os triglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica (FREIRE et al., 1997; CARDENAS et al., 2001). A atividade da lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μmol de ácido graxo livre do óleo por minuto, nas condições do teste, que é dependente da concentração de substrato do meio, pH e temperatura ótimos da enzima e tempo de reação de hidrólise (GONÇALVES, 2007).

Já o método espectrofotométrico, é baseado na hidrólise lipolítica do p-nitrofenilpalmitato em p-nitrofenol e ácido palmítico, resultando em coloração amarela que é intensificada em pHs alcalinos. O p-nitrofenol liberado é detectado em espectrofotômetro a 410 nm (GILHAM e LEHNER, 2005). No entanto, segundo Gilham e Lehner (2005) a utilização deste método não é indicada no caso de extratos enzimáticos, sendo mais recomendado para o emprego em amostras de lipase purificada, por não conterem substâncias interferentes.

2.8 APLICAÇÃO DE LIPASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

A hidrólise de óleos e graxas em águas residuais por enzimas lipases é tecnologia alternativa (CHENG et al., 2020; NIMKANDE e BAFANA, 2022). Como biocatalisadores, as enzimas têm se mostrado eficazes para a degradação e transformação de triglicerídeos complexos em ácidos graxos livres mais simples, potencializando a atuação dos microrganismos em um processo de tratamento biológico posterior, consequentemente reduzindo o tempo de detenção hidráulica no sistema (JAMIE et al., 2016; CAVALEIRO et al., 2013; DUARTE et al., 2015; VALLADÃO et al., 2011; HITCH e CLAVEL, 2019). Para esta aplicação, as lipases

podem ser utilizadas sem purificação, apresentando uma vantagem econômica (MENDES et al., 2005; RIGO et al., 2008).

Affes et al. (2017) investigaram o pré-tratamento enzimático de águas residuais de abatedouro de aves e posterior codigestão anaeróbia utilizando como inóculo cultura de *Staphylococcus xylosus* a 37°C, pH 7. Os autores verificaram aumento de 100% na produção de metano em comparação com o controle.

Mobarak-Qamsari et al. (2012) avaliaram o efeito do pré-tratamento de efluentes lácteos sintéticos com teor de gordura total de 1000 mg L⁻¹ utilizando extrato enzimático de *Pseudomonas aeruginosa*, e posterior digestão anaeróbia. Os autores verificaram que, a utilização do biorreator descontínuo alimentado com águas residuais pré-hidrolisadas com 10% v/v de lipase apresentando atividade de 0,3 U mL⁻¹ durante 48 h foi eficiente na remoção de DQO (90%), comparado ao efluente bruto (66%). Além disso, a produção de biogás após 13 dias também apresentou resultados satisfatórios, aumentando de 2330 mL para 4710 mL.

Rigo et al. (2008) investigaram o efeito de duas lipases, uma comercial (Lipolase 100T, Novozymes) e uma obtida por fermentação em estado sólido (Lipase SEP) sobre o efluente de uma indústria de carne bovina e suína. As águas residuárias com diferentes concentrações de O&G (250 a 3000 mg L⁻¹) foram tratadas em reatores anaeróbios em batelada com e sem pré-tratamento enzimático, utilizando duas quantidades de preparações enzimáticas [0,1 e 5,0% (p / v)]. Os benefícios da pré-hidrólise enzimática tornaram-se evidentes quando houve o uso de 0,1% (p/v) da lipase SEP, em águas residuais contendo 1200 mg L⁻¹ de O&G, apresentando um aumento de 22% na remoção da DQO, comparado a um reator de controle alimentado com água residual sem nenhum pré-tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Química Analítica e Análises Ambientais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina.

3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

A água residuária utilizada nos experimentos foi obtida de um abatedouro bovino localizado em um município do Noroeste do estado do Paraná. A indústria possui uma capacidade de abate de até 56 bovinos dia⁻¹, com área construída de 600 m², sendo considerado um frigorífico de pequeno porte. As amostras foram coletadas em galões plásticos (para a caracterização e para o pré-tratamento) e em frascos de vidro previamente autoclavados (para isolamento microbiano) da caixa de retenção de gordura que compõem o sistema de tratamento da indústria. Até o momento de uso, os galões foram armazenados sob refrigeração, a -20 °C, enquanto os frascos a 4 °C.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

Foram realizadas análises das características físico-químicas iniciais da água residuária em estudo, quanto aos parâmetros de pH, DQO, O&G, sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SV), nitrogênio total, ácidos livres, proteína solúvel e carboidrato, seguindo metodologias descritas na Tabela 2. As análises foram realizadas em duplicata.

TABELA 2 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS E METODOLOGIAS UTILIZADAS.

Parâmetro	Metodologia	Referência
pH	Potenciometria	APHA (2005)
DQO Total (mg L ⁻¹)	Espectrofotometria	APHA (2005)
O&G (mg L ⁻¹)	Gravimetria	Suehara et al. (2005)
Sólidos Totais (mg L ⁻¹)	Gravimetria	APHA (2005)
Sólidos Fixos (mg L ⁻¹)	Gravimetria	APHA (2005)
Sólidos Voláteis (mg L ⁻¹)	Gravimetria	APHA (2005)
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	Kjeldahl	APHA (2005)
Ácidos Graxos livres (µmol mL ⁻¹)	Titulometria	Rosa (2004)
Proteína Solúvel (mg mL ⁻¹)	Espectrofotometria	Bradford (1976)
Carboidrato (mg L ⁻¹)	Espectrofotometria	Dubois et al. (1956)

FONTE: O autor (2022).

3.3.1 pH

Para determinar o pH das amostras foi utilizado um pHmetro da marca NS TECNOPON, modelo mPA 220, devidamente calibrado.

3.3.2 DQO Total

Para a determinação da DQO total uma amostra de 2,5 mL (concentrada ou diluída) foi adicionada em tubos de borossilicato com tampas rosqueáveis, ou 2,5 mL de água destilada (para o branco), ou das soluções de padrão preparadas para a curva de calibração. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL da solução de dicromato de potássio e, vagarosamente, 3,50 mL da solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico. O tubo foi então fechado hermeticamente e agitado por inversão. Colocou-se os tubos no digestor previamente aquecido à temperatura de 150 °C, e mantendo-o durante 2 h. Após resfriamento dos tubos, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro da marca Femto, modelo 600 s com comprimento de onda em 620 nm, zerando o equipamento com o branco. Para obtenção da curva de calibração, plotou-se as absorvâncias das soluções do padrão no eixo Y contra os valores de DQO em mg L⁻¹ das soluções de biftalato ácido de potássio no eixo X, e determinou-se a equação da reta obtida.

3.3.3 Óleos e graxas

Para a determinação de óleos e graxas foi utilizada a metodologia proposta por Suehara et al. (2005), no qual foi adicionado em um tubo cônico uma alíquota de 15,0 mL da água residuária, e esta foi acidificada com 0,18 mL de HCl 2N, previamente preparada. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de éter e centrifugado em centrífuga da marca NOVA instruments, modelo NI1812 por 5 min a 3.000 rpm. Após centrifugada a amostra, foi retirado, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante e este foi colocado em um Becker previamente pesado (M_1). O procedimento de acidificar, adicionar o éter e centrifugar foi repetido 3 vezes. O Becker foi levado a estufa a 80 °C por 24 h, em seguida o Becker com a amostra foi levado ao dessecador a fim de alcançar a temperatura ambiente, e posteriormente a isso foi pesado para obter o (M_2). Os dados obtidos foram substituídos na equação 1.

$$\text{O\&G (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_1) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

M_1 = Massa do becker vazio

M_2 = Massa do becker e amostra retirado da estufa

V_1 = Volume do efluente inserido no cadinho (mL)

x1000 = transformar de gramas para miligramas.

3.3.4 Sólidos totais, fixos e voláteis

Para a análise da concentração dos sólidos totais (ST), uma amostra de 15 mL foi adicionada aos cadinhos previamente calcinados e de massa conhecida (M_1), em seguida foram levados para estufa com circulação de ar, da marca SOLAB, modelo SL-102, na qual permaneceram por 24 h a temperatura de 105 °C. Após este período a massa do conjunto cadinho e amostra foi determinada em balança analítica da marca SHIMADZU modelo AY220.

Para determinação dos sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV), foram levados os conjuntos (cadinho + amostra) até a mufla, onde permaneceram por 90

min a temperatura de 550 °C. Logo em seguida esperou-se que os cadinhos esfriassem em um dessecador e depois estes foram pesados.

Os dados obtidos foram substituídos nas Equações 2, 3 e 4, respectivamente.

$$ST \text{ (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_1) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$SF \text{ (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_3 - M_1) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$SV \text{ (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_3) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que:

M_1 = Massa do cadinho vazio

M_2 = Massa do cadinho e amostra retirado da estufa

M_3 = Massa do cadinho e amostra após combustão da mufla

V_1 = Volume do efluente inserido no cadinho (mL)

ST = Sólidos Totais

SF = Sólidos Totais Fixos

SV = Sólidos Totais Voláteis

3.3.5 Nitrogênio Total

Em um tubo de digestão adicionou-se 5 mL de cada amostra com uma pequena porção (ponta da espátula) de mistura digestora de nitrogênio, composta por sulfato de cobre e sulfato de potássio, e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, este tubo de digestão foi levado a um bloco digestor da marca TECNAL, modelo TE-007MP, no qual aumentou-se gradativamente a temperatura em 50 °C, até atingir a temperatura de 385 °C, mantendo essa temperatura até a amostra ficar na cor azulado-transparente.

Para a destilação, a amostra digerida foi colocada no destilador de nitrogênio da marca TECNAL, modelo TE-0363, onde a amostra foi aquecida previamente. Adicionou-se 25 mL da solução NaOH (40%), no qual foi liberado o nitrogênio na forma de gás, este gás foi recolhido após passar no condensador em 100 mL de ácido bórico

4% e 5 gotas dos indicadores verde de bromocresol 0,1% e vermelho de metila 0,2%, e então foi realizado a titulação com HCl 0,04794 mol L⁻¹ e o volume gasto foi anotado para posterior cálculo.

Com os dados calculou-se a concentração do nitrogênio total através da Equação 5.

$$mgNitrogênio_{(total)}.L^{-1} = \frac{(V_1 - V_2)}{V} \times N_{HCl} \times 14.000 \quad \text{Eq. (5)}$$

Em que:

V₁ = Volume de ácido utilizado para titular a amostra (mL);

V₂ = Volume de ácido utilizado para titular o branco (mL);

V = Volume da amostra (mL);

N_{HCl} = Concentração do ácido utilizado na titulação;

14.0= Equivalente grama do nitrogênio contido no NH₄.

3.3.6 Ácidos Graxos Livres

Para a determinação de ácidos graxos livres uma amostra de 5 mL foi transferida para um becker e acionado 5 mL de uma mistura de acetona:etanol (1:1v/v). As amostras foram tituladas com solução NaOH 0,01 mol L⁻¹ com fenolftaleína como indicador. O teor final de ácidos graxos livres foi obtido pela Equação 6.

$$AGL(\mu\text{mol/mL}) = \frac{V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1000}{V_a} \quad \text{Eq. (6)}$$

Em que:

AL = teor de ácidos livres (μmol mL⁻¹);

V(NaOH) = volume de solução de NaOH usado na titulação (mL);

M(NaOH) = concentração da solução de NaOH (mol L⁻¹);

V_a = volume da amostra (mL).

3.3.7 Proteína Solúvel

A dosagem de proteínas totais solúveis foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg do corante Coomassie Blue G250 em 50 mL de etanol a 95%. Essa solução foi misturada com 100 mL de ácido fosfórico 85% e diluída com 1 L de água destilada. O reagente foi então filtrado com papel de filtro. Para elaborar a curva-padrão foi utilizada uma solução estoque de soro de albumina bovina em uma concentração de 1 mg mL^{-1} em água destilada. Para a curva de calibração, foram pipetados volumes de 10, 20, 40, 60, 80, e 100 μL da solução padrão de BSA em tubos de ensaio, completando-se com água destilada até 100 μL . Em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Bradford a cada tubo de ensaio e agitados no vortex. Foram medidas a absorbância das amostras e do branco (5 mL de reagente de Bradford e 100 μL de água destilada esterilizada) em comprimento de onda de 595 nm entre 2 min e 1 h após a agitação. Para a dosagem proteica do efluente foi utilizado 100 μL do mesmo no lugar da solução de BSA. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.3.8 Carboidrato

A análise foi realizada de acordo com Dubois et al. (1956). Uma alíquota de 0,5 mL do efluente foi transferido para tubos de ensaio de vidro, adicionado 0,5 mL de solução de fenol 5% e agitado levemente. Em seguida foi adicionado 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado diretamente sobre a amostra e homogeneizado levemente. Após esse processo a amostra foi incubada 20 min a temperatura ambiente para o resfriamento da solução. Uma curva de calibração foi obtida utilizando glicose como padrão. Foram realizadas soluções padrão de glicose através de diluições seriadas (a partir de uma solução de 50 mg L^{-1}) nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg L^{-1} . Após o preparo de todos os padrões e amostras, foram realizadas leituras da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, para gerar a curva de calibração. Para o preparo do branco foi utilizado 0,5 mL de água destilada como amostra.

3.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

A seleção dos microrganismos foi realizada utilizando-se a técnica de diluição em série de amostras do efluente de abatedouro bovino em solução salina 0,8%. Alíquotas de 100 µL das diluições com concentração 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram inoculadas, por espalhamento, em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo descrito por Sierra (1957), conforme apresentado na Tabela 3, esterilizando o Tween separadamente dos demais reagentes. As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C para o crescimento dos microrganismos. As bactérias que apresentaram halo de degradação (método qualitativo de atividade lipolítica), foram isoladas em placas contendo ágar nutriente através do método *Streak-Plate* (esgotamento) (BECKER, CALDWELL e ZACHGO, 1996) e mantidas em BOD a 30 °C.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO DOS MICRORGANISMOS.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Peptona	10
Cloreto de Sódio (NaCl)	5
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,1
Ágar	18
Tween 20	1% (v/v)

Posteriormente ao isolamento das bactérias foi determinado o IE das mesmas. Para isso, uma alçada de cada bactéria foi inoculada em placa de Petri contendo um meio de cultura específico (Tabela 3). As placas foram incubadas a 30 °C por 96 h e o IE foi determinado após este tempo, mensurando-se o diâmetro médio do halo de degradação e diâmetro médio da colônia pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975):

$$IE = D^H / D^C \quad \text{Eq. (7)}$$

Em que:

IE = Índice Enzimático

D^H = Diâmetro médio do Halo de Degradação

D^C = Diâmetro médio da Colônia

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Após o cálculo do IE foram selecionadas, para a identificação, três bactérias que apresentaram os maiores índices. Os isolados foram primeiramente caracterizados com base nos aspectos morfo-tintoriais e bioquímicos, através da coloração de Gram e teste da catalase. A caracterização molecular foi realizada através do sequenciamento da região 16S rDNA, para definição no nível de gênero e espécie.

O DNA dos isolados bacterianos foi extraído utilizando o kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), e a confirmação da espécie foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento. Para o sequenciamento, a região 16S rDNA foi amplificada por PCR utilizando os *primers* Y1 *forward* (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'), conforme Young et al. (1991) e Y3 *reverse* (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3'), segundo Cruz (2001), produzindo um *amplicon* de aproximadamente 1500 pb. As condições de amplificação foram: 5 min iniciais a 94 °C, e 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 57 °C e 45 s a 72 °C, como extensão final de 5 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram purificados por eluição em gel de agarose, usando o kit de extração Easypure. Uma alíquota de 2 µL dos produtos de PCR eluídos foi quantificada com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop2000 (ThermoScientific). O grau de pureza foi determinado pela relação A260/280. Após quantificação, 60 ng do produto de PCR juntamente com 0,45 pmol dos *primers forward* e *reverse* foram secos em estufa e enviados para a empresa Ludwig Biotecnologia (Alvorada, RS), para a realização do sequenciamento, usando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e os resultados de cada amostra foram analisados utilizando o BLASTn (Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico - versão 2.215 do BLAST 2.0).

3.6 PROCESSO FERMENTATIVO

Os três microrganismos que apresentaram os maiores índices enzimáticos foram cultivados em erlenmeyers de 250 mL em agitador-incubador a 150 rpm e 37 °C por 24 h contendo 50 mL do meio de cultura proposto por Bueno et al. (2014) com

modificações: extrato de levedura (2 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹), KH₂PO₄ (3,0 g L⁻¹), MgSO₄ .7H₂O (0,2 g L⁻¹) e 1% (v/v) de óleo de soja. A suspensão de células obtida foi padronizada em 1,0 de absorvância em espectrofotômetro em 600 nm de comprimento de onda e inoculada 5 mL da suspensão padronizada em outro erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio descrito anteriormente e nas mesmas condições anteriores. O cultivo foi interrompido por centrifugação (15 min a 3000 rpm) e o sobrenadante foi usado para análise da atividade lipolítica e dosagem proteica.

3.6.1 Atividade lipolítica

A determinação da atividade lipolítica foi realizada pelo método titulométrico segundo Dellamora-Ortiz et al. (1997) com modificações, em que utilizou-se 5 mL de emulsão de óleo de oliva 20% (v/v) em goma arábica 5% (p/v) e 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. O ensaio foi realizado em shaker marca CIENLAB, modelo CE-725/R com agitação de 180 rpm, a 37 °C, sendo iniciado pela adição de 3 mL da preparação enzimática e após 20 min de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura etanol e acetona (1:1). Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação com NaOH 0,05 N, aplicando-se fenolftaleína como indicador. Também foi utilizado um branco, contendo 3 mL do tampão fosfato de sódio em vez do preparo enzimático. A atividade lipolítica foi calculada com a Equação 8 e expressa em micromoles de ácidos graxos liberados, por minuto de reação, por mililitro de amostra.

$$A \text{ (U. mL}^{-1}\text{)} = \frac{V_1 - V_2 * N * 1000}{V_3 * T} \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que:

A = atividade enzimática;

V₁ = volume de NaOH gasta na titulação da amostra;

V₂ = volume de NaOH gasta na titulação do branco;

N = normalidade corrigida do NaOH utilizado;

V₃ = volume utilizado do preparo enzimático;

T = tempo de reação (minutos).

3.6.2 Dosagem proteica

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) descrito anteriormente no item 3.3.7.

3.7 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO

3.7.1 Preparo do inóculo

Após a análise da atividade lipolítica dos microrganismos, aquele que apresentou a maior atividade foi utilizado para o preparo do inóculo. Primeiramente fez-se a ativação da bactéria lipolítica selecionada, adicionando-se em erlenmeyers de 250 mL, uma alçada de colônia em 100 mL de meio de cultivo esterilizado contendo: extrato de levedura (2 g L^{-1}), peptona (5 g L^{-1}), KH_2PO_4 ($3,0 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e 1% (v/v) de óleo de soja. Os erlenmeyers foram mantidos em agitador incubadora shaker da marca CIENLAB, modelo CE-725/R a 150 rpm, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h (BUENO et al.,2014; LIMA, 2015).

A suspensão de células obtida foi inoculada em outro erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL do efluente em estudo (água residuária de abatedouro bovino) esterilizado. A inoculação foi realizada na proporção de 10% (v/v) e incubada nas mesmas condições anteriormente descritas. Posteriormente, a suspensão obtida foi padronizada por densidade óptica, ajustando-se a absorbância do inóculo em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda, pela adição de suspensão celular em solução salina 0,8%, até alcançar a absorbância de 1,0. A concentração de células nos inóculos foi mensurada pelo método de diluição em placa, inoculando 100 μL da diluição 10^{-6} em placa de Petri contendo ágar nutriente como meio de cultivo.

3.7.2 Delineamento experimental

Para realização do pré-tratamento do efluente em estudo, propôs-se a utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Este tipo de delineamento tem como finalidade identificar e otimizar as variáveis que influenciam determinado processo, por meio dos resultados experimentais obtidos nos ensaios

elaborados, além de obter a análise de variância (ANOVA) para verificar o ajuste do modelo, superfícies de resposta e gráficos de contorno (GHAEDI et al., 2016).

O planejamento DCCR utilizado contemplou 3 variáveis (pH, temperatura e concentração de inóculo), com os níveis (-1 e +1), os pontos axiais (-1,68 e +1,68) e três repetições no ponto central (0), resultando em 17 ensaios (Tabela 4 e 5). O ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste e os pontos axiais estimam a curvatura do modelo (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Os valores de referência das variáveis estudadas foram baseados em dados encontrados na literatura (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007; RIGO et al., 2008; VALENTE et al., 2010; ROCHA et al., 2013; MAZZUCOTELLI et al., 2014; AFFANDI et al., 2014; LIMA, 2015; SONUNE e GARODE, 2018).

TABELA 4 - VALORES CODIFICADOS E REAIS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (DCCR).

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	6,7	7,0	7,5	8,0	8,3
Temperatura (°C)	26,6	30	35	40	43,40
Inóculo (%)	6,6	10	15	20	23,4

FONTE: O autor (2022).

Na Tabela 5 apresenta-se a matriz do planejamento DCCR, com os valores codificados e reais das variáveis de cada ensaio.

TABELA 5- MATRIZ DO PLANEJAMENTO (DCCR) COM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL EM SEUS VALORES CODIFICADOS E REAIS.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais		
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	pH	T (°C)	Inóculo (%)
1	-1	-1	-1	7,0	30,0	10,0
2	-1	-1	1	7,0	30,0	20,0
3	-1	1	-1	7,0	40,0	10,0
4	-1	1	1	7,0	40,0	20,0
5	1	-1	-1	8,0	30,0	10,0
6	1	-1	1	8,0	30,0	20,0
7	1	1	-1	8,0	40,0	10,0
8	1	1	1	8,0	40,0	20,0
9	-1,68	0	0	6,7	35,0	15,0
10	1,68	0	0	8,3	35,0	15,0
11	0	-1,68	0	7,5	26,6	15,0
12	0	1,68	0	7,5	43,4	15,0
13	0	0	-1,68	7,5	35,0	6,60
14	0	0	1,68	7,5	35,0	23,4
15	0	0	0	7,5	35,0	15,0
16	0	0	0	7,5	35,0	15,0
17	0	0	0	7,5	35,0	15,0

FONTE: O autor (2022).

Nesses 17 ensaios, inoculou-se o efluente com concentrações de inóculo determinadas para cada tratamento, obtendo-se em cada erlenmeyer o volume total de efluente e inóculo igual a 100 mL. Os erlenmeyers foram incubados em incubadora shaker por 72 h a 180 rpm, variando-se temperatura e pH conforme determinados nos tratamentos do DCCR. As amostras foram coletadas em 0 h, 24 h, 48 h e 72 h, para o monitoramento dos parâmetros de DQO, teor de O&G e a atividade lipolítica de acordo com metodologias descritas anteriormente no item 3.6.1 Para a análise da atividade lipolítica, a amostra coletada era centrifugada a 3000 rpm por 15 min, o precipitado era descartado e o sobrenadante era analisado. Foi realizado um controle para cada um dos 17 tratamentos, sem adição do inóculo.

3.7.3 Análise estatística

O *software* STATISTICA 12 foi utilizado para determinar o efeito das variáveis independentes, o cálculo dos coeficientes de regressão, a análise de variância (ANOVA), utilizando-se do teste F a 5% de probabilidade e a obtenção dos gráficos de superfícies de resposta sobre as variáveis respostas atividade lipolítica, DQO e O&G.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

Os valores obtidos na caracterização do efluente em estudo, bem como dados da literatura de caracterização de efluente de abatedouro bovino podem ser observados na Tabela 6.

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO.

Parâmetro	Efluente em estudo	Caixeta et al. (2002)	Rigo (2008)	McCabe et al. (2013)	Jensen et al. (2015)
pH	6,48	6,3-6,6	5-6	-	-
Óleos e graxas (mg L ⁻¹)	2553,3 ± 220	40-600	3080	5-2110	1407
DQO (mg L ⁻¹)	8914,4 ± 69,4	2000-6200	32000	1040-12,100	5919
ST (mg L ⁻¹)	5224,4 ± 100,0	-	8462	457-6870	3378
SV (mg L ⁻¹)	4606,7 ± 74,2	-	-	-	-
SF (mg L ⁻¹)	617,8 ± 30,8	-	-	-	2834
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	1201,7	-	-	296-785	190,2
Ácidos livres (μmol mL ⁻¹)	11 ± 0	-	-	-	-
Proteína Solúvel (mg L ⁻¹)	4805,7 ± 51,3	-	-	-	-
Carboidrato (mg L ⁻¹)	81,2 ± 1,2	-	-	-	-

FONTE: O autor (2022).

A composição de efluentes de abatedouro bovino podem sofrer variação devido a diversos fatores, como o processo industrial, a quantidade de água utilizada, o tipo e idade do animal abatido, temperatura, entre outros (CAIXETA et al., 2002; BUSTILLO-LECOMPTE, MEHRVAR e QUIÑONES-BOLAÑOS, 2013)

Os parâmetros pH e sólidos totais encontram-se dentro do intervalo apresentado na literatura para efluentes de abatedouros bovinos. Quanto as diferenças observadas para os outros parâmetros neste estudo e os valores obtidos pelos autores em questão podem ter vários motivos. No estudo de Caixeta et al. (2002) o efluente foi coletado após passar por um tratamento primário de deposição e flotação, podendo explicar os baixos valores de O&G. Rigo (2008) utilizou o efluente de um matadouro que abate bovinos e suínos, o que possivelmente justifica os valores elevados de O&G e DQO.

Apenas o pH do efluente em estudo apresenta valor dentro dos parâmetros para lançamento de efluente, estabelecidos pela resolução Conama nº 430 (2011), e pela legislação ambiental do Instituto Água e Terra -IAT Portaria Nº 29 (2018). Enquanto os demais parâmetros apresentam valores elevados, necessitando de

tratamento prévio ao seu descarte no ambiente, visto que as legislações determinam que a concentração máxima de gordura animal e DQO presente no efluente seja de 50 mg L⁻¹ e 150 mg L⁻¹, respectivamente.

4.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Um indicativo da atividade lipolítica pode ser observado pela liberação hidrolítica do ácido graxo do Tween e a sua subsequente precipitação como sal de cálcio (TIGERSTROM e STELMASCHUK, 1989; GOPINATH, ANBU e HILDA, 2005). Por meio da observação dos halos de degradação formados ao redor das colônias, foi possível selecionar e isolar 6 bactérias.

Lee et al. (2015), ao isolar bactérias produtoras de lipase de área de derramamento de óleo, observaram que das 10 estirpes bacterianas selecionadas 7 delas apresentaram halo de precipitação em meio de cultura que continha Tween 20. Silva-Bedoya et al. (2016) verificaram que 5 dos 22 isolados bacterianos se mostraram positivos para a presença de lipase em meio de cultivo com Tween 20.

No estudo de Vieira et al. (2006), que teve como intuito determinar a capacidade de degradação de biodiesel por bactérias, previamente isoladas de tanques de armazenamento do próprio resíduo, os autores concluíram que o teste de atividade enzimática utilizando o Tween 20 demonstrou ser efetivo para a seleção de bactérias com capacidade de utilização de O&G. Nos testes de degradação de biodiesel, os isolados bacterianos selecionados foram capazes de utilizar este produto, sendo que, das 25 bactérias isoladas, 16 (64%) apresentaram atividade lipolítica.

Li et al. (2018), com o objetivo de isolar e caracterizar bactérias degradadoras de DQO de água residuária de abate de bovinos, obtiveram 6 bactérias com tal capacidade. Furini et al. (2018), buscando selecionar o melhor microrganismo lipolítico isolado de um sistema de tratamento biológico de efluentes de um hotel, que apresentasse potencial para emprego em processos biotecnológicos, encontraram gêneros de *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.

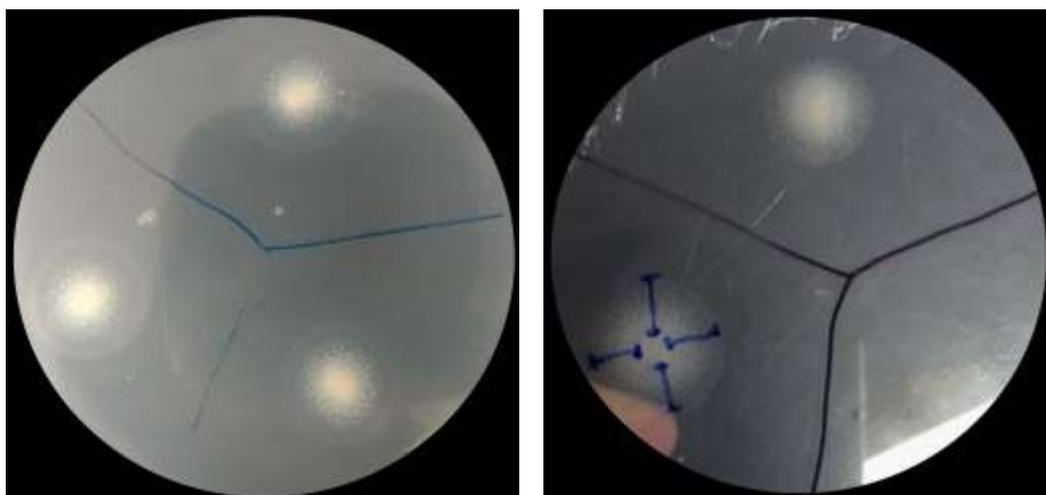
Ao mensurar os diâmetros médios dos halos de degradação e os diâmetros médios das colônias isoladas (Figura 2) foi possível calcular o IE de três bactérias, já que estas apresentaram os maiores halos. O maior valor (3,46) obtido foi referente a bactéria 1 (Tabela 7).

TABELA 7 - MÉDIA DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE) ENCONTRADO PARA CADA MICRORGANISMO, BASEADO NA RELAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA COLÔNIA E O DIÂMETRO DO HALO.

Microrganismo	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	IE
1	0,44±0,04	1,53±0,14	3,46±0,63
2	0,43±0,05	1,33±0,05	3,08±0,40
3	0,61±0,01	1,29±0,06	2,11±0,18

FONTE: O autor (2022).

FIGURA 2 – FOTOS ILUSTRATIVAS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO OBSERVADOS NOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.



FONTE: O autor (2022).

Padmapriya et al. (2011) ao isolar bactérias de vários ambientes ricos em O&G, como solo, fezes e leite, observaram que das 47 bactérias isoladas, 3 delas apresentaram as maiores formações de halo, com 1,5, 2,0 e 2,5 cm de diâmetro de halo. Silva et al. (2016), realizaram o estudo de isolamento de bactérias produtoras de lipase de efluente de planta piloto de biodiesel, e observaram IE de 1,03 a 2,37, próximo ao obtido no presente estudo. Alhamdani e Alkabbi. (2016) avaliaram a atividade lipolítica de oito microrganismos isolados de solo contaminado com óleo, e observaram IE de 2,9 e 2,8 para *Bacillus pumilus* cepa YHH-2 e *Bacillus pumilus* cepa NRC21.7, respectivamente.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Na Tabela 8 apresenta-se os dados do teste de Gram, catalase, bem como informações morfológicas de cada uma das três bactérias.

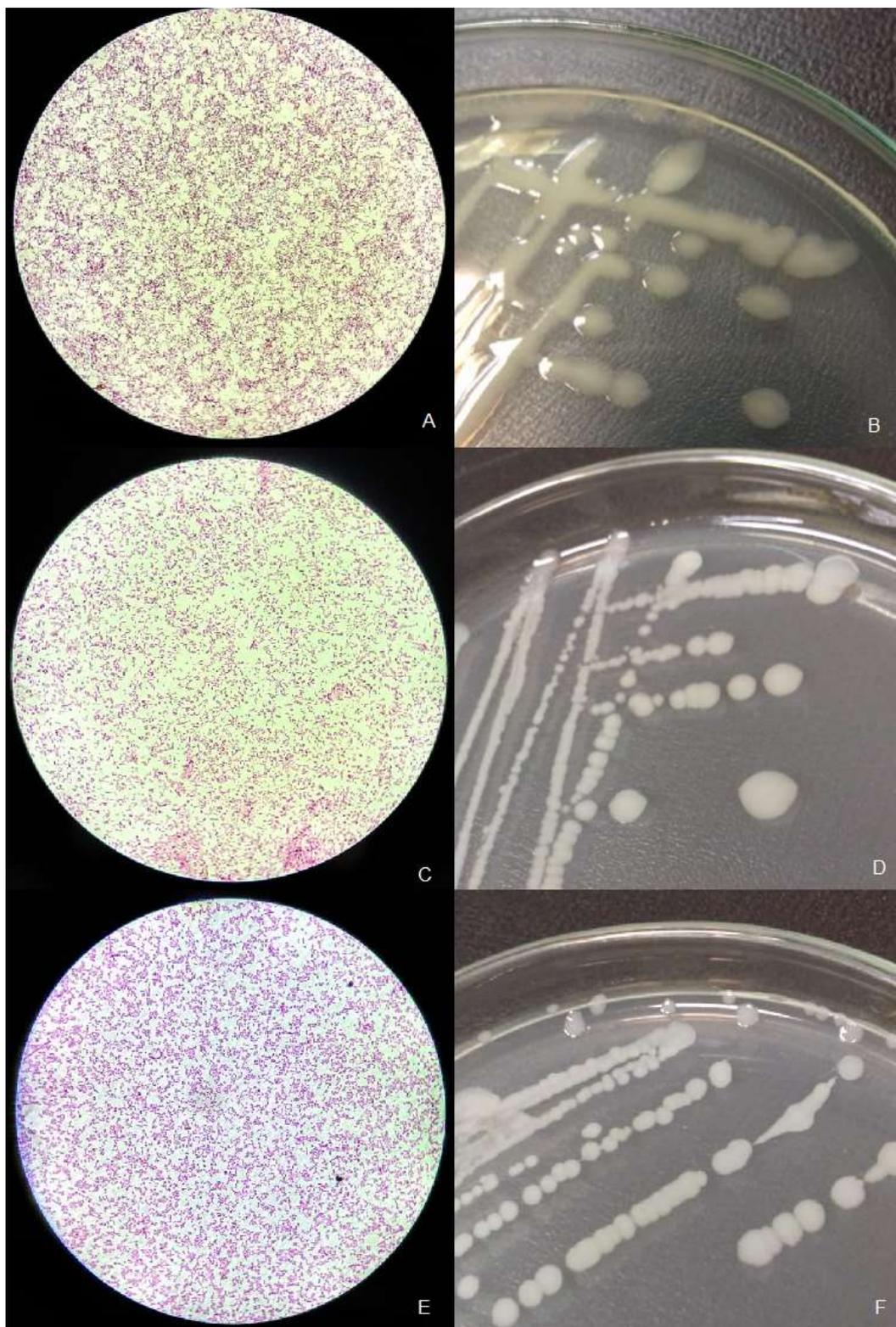
TABELA 8 - DADOS DE TESTE DE GRAM, CATALASE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.

Microrganismo	Gram	Catalase	Forma	Morfologia		
				Textura	Cor	Borda
1	Negativo	Positiva	Bacilos	Cremosa	Branca	Circular
2	Negativo	Positiva	Bacilos	Cremosa	Branca	Circular
3	Negativo	Positiva	Bacilos	Cremosa	Branca	Circular

FONTE: O autor (2022).

Pode ser observado na Tabela 8 e na Figura 3 que as três bactérias isoladas apresentaram Gram negativo e Catalase positiva. O resultado do teste de Gram está de acordo com a pesquisa de alguns autores, que afirmam que a maioria das bactérias lipolíticas encontradas na natureza são Gram-negativos (ROCHA et al., 2013; RAMNATH et al., 2016; FURINI et al., 2018).

FIGURA 3 – BACTÉRIA 1: A) BACILOS GRAM NEGATIVOS; B) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. BACTÉRIA 2: C) BACILOS GRAM NEGATIVOS; D) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. 3: E) BACILOS GRAM NEGATIVOS; F) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS.



FONTE: O autor (2022).

Apesar de algumas bactérias produtoras de lipase ser Gram-positivas, como é o caso dos gêneros *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Clostridium* sp, sua atividade lipolítica é menos expressiva que o das bactérias Gram-negativas (ROUSENAU e JAEGER, 2000). Oliveira, Hidalgo e Júnior (2014), isolaram e caracterizaram 23 microrganismos potencialmente produtores de lipase de uma estação de tratamento de esgoto, sendo a maioria das bactérias Gram Positivas (18), porém após a etapa de fermentação em meio líquido, os Gram Negativos (4) apresentaram as maiores atividades enzimáticas.

Quanto a morfologia todos os isolados apresentaram aspecto cremoso, coloração branca e borda circular (Figuras 3, 4 e 5).

As informações sobre as sequências obtidas por sequenciamento da região rDNA 16S do DNA dos isolados 1, 2 e 3 de estão apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO RDNA 16S DOS ISOLADOS 1, 2 E 3.

Bactéria	Espécie referência	% de ID	Número de acesso
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,93	MF079290.1
2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,86	MK089544.1
3	<i>Aeromonas</i> spp.	-	-

FONTE: O autor (2022).

Com relação aos isolados 1 e 2 foi possível a identificação a nível de espécie sendo identificadas como *Aeromonas hydrophila*. Quanto a bactéria 3 (*Aeromonas* spp.), a identificação a nível de espécie não foi possível.

Os resultados de trabalhos baseados em amplificação e sequenciamento da região rDNA 16S têm demonstrado que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é ampla. Apesar do sequenciamento de rDNA 16S ser universalmente aceito como um padrão para identificação bacteriana, a técnica pode não ser útil para algumas espécies, pois podem apresentar sequências similares, até mesmo entre gêneros diferentes (MIGNARD e FLANDROIS, 2006).

Desta forma, uma alternativa para a identificação da espécie do isolado 3, poderia ser a utilização de *primers* espécie-específicos ou com a técnica de PCR-RFLP (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism).

Aeromonas spp. são bactérias amplamente distribuídas, isoladas em amostras de várias origens, incluindo água (SCOARIS et al., 2008), peixes (ABD-ALLA, JASIM e HUSSEIN, 2014; YADAV et al., 2014), resíduos de lodo ativado

(NEILSON, 1978; YASIN, SANCHEZ-TORRES e MAEDA, 2014), águas residuais (POFFE e BEECK, 1991), águas residuárias de abatedouro bovino (MARTINELLI et al., 2010). A ocorrência de *Aeromonas* spp. foi avaliada no trabalho de Bizani e Brandelli, (2001), em 70 amostras de água de um abatedouro bovino. *A. hydrophila* foi isolado de 11,4% das amostras de água de abastecimento e de 25,7% da água drenada das carcaças, enquanto *A. sobria* foi isolado de 5,7% das amostras da água fornecida.

4.4 PROCESSO FERMENTATIVO

Ao consultar a identidade dos isolados utilizando o número de acesso da Tabela 9, nota-se que as bactérias 1 e 2, podem diferir a nível de espécie com a bactéria 3, ou ainda as três bactérias podem variar quanto a linhagem, o que pode explicar as diferenças nos resultados de atividade lipolítica e dosagem proteica da Tabela 10.

Com relação a atividade enzimática e a dosagem proteica, também constatou-se que os maiores valores foram encontrados para a bactéria 1, com 2,46 U mL⁻¹ e 13,12 mg mL⁻¹ (Tabela 10), respectivamente, sendo, portanto, esta aplicada no pré-tratamento do efluente de abatedouro bovino.

TABELA 10 - ATIVIDADE LIPOLÍTICA E DOSAGEM PROTEICA PARA CADA MICRORGANISMO.

Microrganismo	Atividade lipolítica (U mL ⁻¹)	Dosagem proteica (mg mL ⁻¹)
1	2,46±0,12	13,12±0,00
2	1,58±0,00	10,70 ±0,01
3	2,10±0,03	6,30±0,00

FONTE: O autor (2022).

No estudo de Peil et al. (2016), após isolar e caracterizar microrganismos produtores de lipase de efluentes provenientes de indústrias de matadouros e laticínios, os autores avaliaram a atividade enzimática das bactérias isoladas por meio do método titulométrico. Foi observado que a bactéria que apresentou atividade enzimática mais promissora foi a *Enterobacter aerogenes* (1,54 U ml⁻¹). Padmapriya et al. (2011) ao avaliarem a dosagem proteica de lipase a partir do cultivo de *Lactobacillus* sp. filtrado, obtiveram o valor de 6,2 mg mL⁻¹.

Ao avaliar o valor da atividade lipolítica obtida no estudo de Neelambari et al. (2011), nota-se que a bactéria isolada no presente trabalho tem grande potencial, visto

que no estudo de Neelambari et al. (2011), os autores avaliaram a otimização e purificação de lipase de *Aeromonas hydrophila* e observaram atividade máxima de 15 U mL⁻¹, valor próximo ao obtido neste trabalho.

4.5 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO

Visando acompanhar o processo de pré-tratamento do efluente em estudo, foram monitorados os parâmetros de atividade lipolítica, DQO e O&G durante 72 h, sendo as análises realizadas a cada 24 h. Com os resultados obtidos, foi possível observar que o tempo de reação de 72 h é o ideal para o pré-tratamento do efluente em estudo, visto que apresentou os maiores valores de remoção dos parâmetros avaliados. Períodos superiores podem ser inviáveis para aplicação industrial, principalmente pelo tamanho das unidades de tratamento. Desta forma, a análise estatística foi realizada com os resultados obtidos em 72 h de reação. O inóculo utilizado nos ensaios possuía microrganismos na faixa de 10¹⁰ células viáveis.

No Apêndice encontram-se as tabelas referente ao controle de cada um dos parâmetros monitorados.

4.5.1 Atividade lipolítica detectada no efluente de abatedouro bovino

Na Tabela 11 apresenta-se a matriz do delineamento experimental, com as variáveis pH, temperatura (T) e concentração de inóculo (I), nas suas formas codificadas e reais e os resultados obtidos para a atividade lipolítica no efluente, no decorrer dos ensaios realizados.

TABELA 11 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA.

Ensaio	Variáveis			Atividade lipolítica (U mL ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,27±0,02	0,20±0,12	0,70±0,07	0,82±0,05
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,08±0,00	0,20±0,04	0,60±0,02	0,53±0,05
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,05±0,00	0,02±0,05	0,58±0,00	0,82±0,05
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,00±0,02	0,07±0,00	0,48±0,00	0,65±0,02
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,20±0,04	0,16±0,00	0,53±0,10	0,77±0,00
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,35±0,14	0,20±0,04	0,63±0,00	0,73±0,05
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,00±0,02	0,05±0,02	0,68±0,10	0,82±0,00
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,00±0,00	0,15±0,02	0,53±0,15	0,68±0,00
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,18±0,02	0,10±0,05	0,15±0,00	0,40±0,05
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,13±0,02	0,30±0,05	0,28±0,02	0,50±0,05
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	0,02±0,02	0,10±0,00	0,77±0,05	0,73±0,05
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	0,05±0,05	0,51±0,02	0,58±0,00	0,73±0,05
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	0,15±0,05	0,15±0,00	0,30±0,00	0,30±0,05
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	0,10±0,00	0,08±0,02	0,10±0,00	0,40±0,05
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,29±0,05	0,51±0,10	1,06±0,05	1,30±0,00
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,19±0,15	0,46±0,05	1,21±0,00	1,40±0,00
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,24±0,00	0,31±0,00	0,97±0,05	1,35±0,05

FONTE: O autor (2022).

Como pode ser analisado na Tabela 11, logo no início da reação (0 h) foi apresentada atividade lipolítica, isso se deve possivelmente ao inóculo que continha certa quantidade de enzima quando inserido no sistema de pré-tratamento. No decorrer da reação, a atividade apresentou constante aumento, sendo observada a máxima atividade de 1,40 U mL⁻¹ em 72 h de reação, na condição de pH 7,5; temperatura de 35 °C e concentração de inóculo de 15% (Tabela 11).

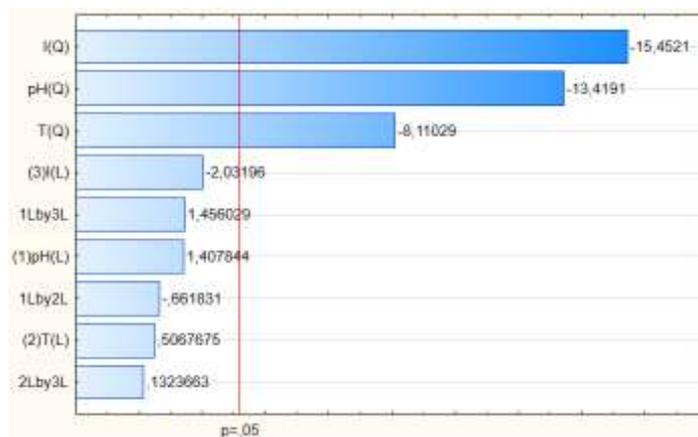
Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 11), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (Eq. 9), relacionando a atividade lipolítica com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O modelo de regressão apresentou $R^2 = 0,8215$, significando que 82,15% da variação da atividade lipolítica é explicada pelo modelo.

$$\text{Atividade Lipolítica (U mL}^{-1}\text{)} = 1,302 - 0,250 \times \text{pH}^2 - 0,146 \times \text{T}^2 - 0,279 \times \text{I}^2 \quad (\text{Eq. 9})$$

Para verificar e confirmar a influência das variáveis independentes nos níveis e intervalos estudados em relação às variáveis respostas, os resultados foram analisados por meio de gráficos de pareto, ANOVA e superfícies de resposta. A influência das variáveis independentes sobre a atividade lipolítica, foi avaliada através

do gráfico de Pareto, presente na Figura 4. Os efeitos que estão à direita da linha vermelha (p -valor = 0,05) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.



FONTE: O autor (2022).

Analisando a Figura 4 constata-se que as variáveis concentração de inóculo, pH e temperatura em seus termos quadráticos influenciaram significativamente de forma negativa a atividade lipolítica em um nível de significância de 95%, desta forma com aumento do valor destas variáveis não favorece a atividade enzimática.

A partir da análise de variância do sistema, realizando-se o teste F, apresentado na Tabela 12, e comparando-se o valor de F calculado com o F tabelado é possível afirmar que o modelo proposto é válido e que os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais, caso $F_{calc} > F_{tab}$. A falta de ajuste baseia-se no erro puro, neste caso, se $F_{faltaajuste}$ for menor que F_{tab} a falta de ajuste não é significativa e a regressão linear proposta é adequada para ajustar os pontos experimentais de forma satisfatória.

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.

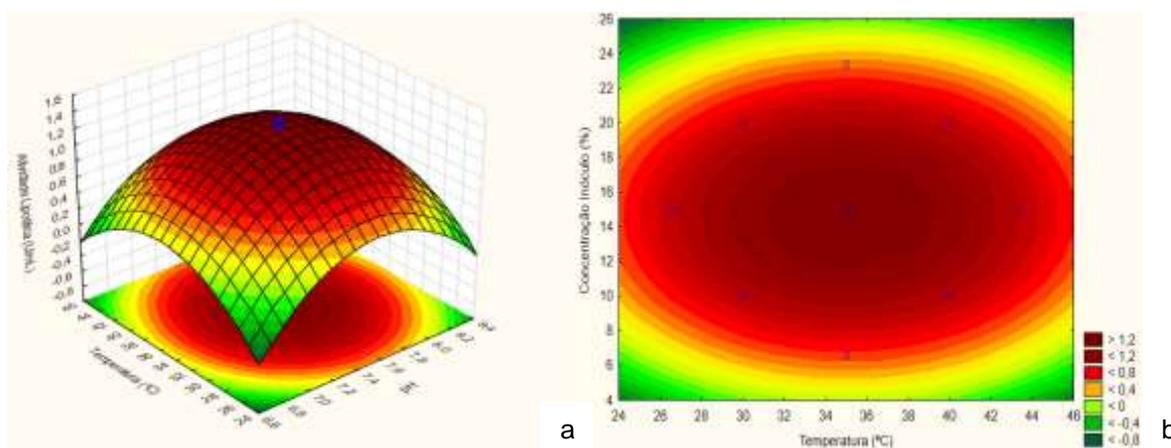
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	2,019	3	0,673	252,88	3,34	75,71
Resíduos	0,037	14	0,002			
Falta de ajuste	0,326	11	0,029	7,12	8,76	0,81
Erro puro	0,012	3	0,004			
Total	1,900	17				

FONTE: O autor (2022).

Observa-se na Tabela 12, que para a regressão o F_{cal} é maior que o F_{tab} e possui uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Além disso, não foi observada significância na falta de ajuste, pois a razão do F calculado pelo F tabelado foi inferior a 1 (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Ambos os resultados, indicam que o modelo se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo é válido.

A superfície de resposta apresentada na Figura 5a representa o modelo linear obtido para a atividade lipolítica em função da temperatura e do pH, e a Figura 5b representa o gráfico de contorno para atividade lipolítica em função da concentração de inóculo e temperatura.

FIGURA 5 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO PH (A). GRÁFICO DE CONTOURNO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).



FONTE: O autor (2022).

Nota-se que um pico foi obtido, que representa o ponto ótimo do processo, em temperatura, pH e concentração de inóculo de 35 °C, 7,5 e 15%, respectivamente.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram relatados por Suci, Arbianti e Hermansyah (2018) que avaliaram a atividade lipolítica de *Bacillus megaterium* pelo método titulométrico e obtiveram atividade de 3,30 U mL⁻¹ no cultivo de fermentação submersa na temperatura de 35 °C. Rocha et al. (2013) avaliando o pré-tratamento de água residuária de purificação de biodiesel em temperatura de 35 °C durante 120 h encontraram atividade lipolítica de 0,30 U mL⁻¹ utilizando o microrganismo isolado *Klebsilla oxytoca*.

Grande parte das lipases possuem capacidade de atuar em ampla faixa de pH e temperatura (JAVED et al., 2018). O pH apresenta grande influência nas reações de hidrólise enzimática, pois pode acarretar alteração da sua estrutura molecular e

consequentemente perda de atividade (MENDES et al., 2005; RAMANI et al., 2010; DORS et al., 2013). Segundo Borzani et al. (2001) a maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima, e a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, o qual é característico para cada enzima, mas, geralmente, ocorre em pH alcalino, conforme observado no trabalho de Mobarak-Qamsari et al. (2012), que estudaram a estabilidade da lipase extraída de *P. aeruginosa*, encontrando resultados melhores em pH 8,0. Nos estudos de Saadatullah et al. (2018) e Prasad e Manjunath (2012) foi encontrada máxima atividade lipolítica em pH 7,0, bem como no presente estudo.

Tripathi, Choudhary e Rawat (2018), avaliaram a atividade de lipase extracelular produzida por *A. hydrophila* isolada de um reservatório de água. Os autores observaram que a atividade enzimática em pH 5 a 6 foi quase insignificante, já em pH 7 a 9 ocorreu um notável aumento. Quanto a temperatura, foi observada boa atividade acima de 30 °C, apresentando máxima atividade em 40 °C. É importante ressaltar que o aumento da temperatura, promove o aumento da atividade enzimática, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. No entanto, temperaturas mais altas podem reduzir a estabilidade térmica da enzima, podendo haver desnaturação da mesma, ou seja, a perda de sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (BORZANI et al., 2001; GOMES et al., 2006; JI et al., 2010; PADILHA et al., 2012). Isso foi observado no trabalho de Chuang et al. (1997), avaliando a lipase extracelular (Lip) de *A. hydrophila*, em que após 30 min de incubação a 55 °C, apenas 20% da atividade enzimática foi mantida. Neste mesmo trabalho, foi encontrado maior atividade lipolítica em uma faixa de pH entre 7,5-8,0. No estudo de Neelambari et al. (2011), a máxima atividade lipolítica de *A. hydrophila* foi observada em 37 °C.

A atividade lipolítica foi detectada na bactéria do gênero *Aeromonas* no estudo de Serikovna et al. (2013), que teve como objetivo encontrar microrganismos produtores de lipase de águas residuais de abatedouro, de esgoto urbano, bem como solo de uma planta de laticínios, visando posterior aplicação no tratamento biológico de efluentes industriais contendo O&G. Dentre os microrganismos isolados, os autores observaram que as estirpes *Pseudomonas aeruginosa* G23, *Aeromonas punctata* G30 e *P. aeruginosa* Zb32, apresentaram maior atividade lipolítica, além de apresentarem redução nas frações de gordura de $88 \pm 4\%$, $60 \pm 8\%$ e $52 \pm 6\%$, respectivamente, em uma solução de sebo bovino.

4.5.2 Demanda Química de Oxigênio

Na Tabela 13 observa-se a matriz do delineamento experimental, com os níveis de cada variável (pH, temperatura e concentração de inóculo) e os resultados obtidos para concentração de DQO, no decorrer dos ensaios realizados.

TABELA 13 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE DQO.

Ensaio	Variáveis			DQO (mg L ⁻¹)				Eficiência (%)
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8486,7±150,0	7786,7±183,3	8070,0±200,0	5836,7±166,7	31,23
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	8086,7±66,7	7886,7±250,0	7003,3±0,0	6786,7±116,7	16,08
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	5186,7±400,0	4210,0±150,0	3510,0±16,7	2926,7±0,0	43,57
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	4320,0±133,3	3826,7±0,0	3343,3±83,3	2943,3±16,7	31,87
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8903,3±33,3	9003,3±33,3	9720,0±150,0	4860,0±66,7	45,41
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	9070,0±33,3	8870,0±233,3	5986,7±83,3	5126,7±66,7	43,48
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	5953,3±33,3	3776,7±50,0	3210,0±83,3	1943,3±83,3	67,36
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	5153,3±233,3	3543,3±83,3	3626,7±0,0	2293,3±0,0	55,50
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	8760,0±0,0	8650,0±16,7	8516,7±16,7	8250,0±16,7	5,82
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	8826,7±0,0	8600,0±33,3	8983,3±83,3	8816,7±16,7	0,11
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	7960,0±33,3	7926,7±0,0	7760,0±33,3	6126,7±0,0	23,03
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	9143,3±50,0	8360,0±33,3	8293,3±0,0	8160,0±33,3	10,75
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	8976,7±16,7	8883,3±16,7	8883,3±16,7	8916,7±50,0	0,67
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	9310,0±16,7	8850,0±216,7	9116,7±216,7	9083,3±116,7	2,43
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	8660,0±33,3	8510,0±50,0	6643,3±83,3	5316,7±16,7	38,61
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	8760,0±0,0	8826,7±66,7	4476,7±50,0	5216,7±50,0	40,45
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	8243,3±50,0	8776,7±16,7	7060,0±133,3	4816,7±16,7	41,57

FONTE: O autor (2022).

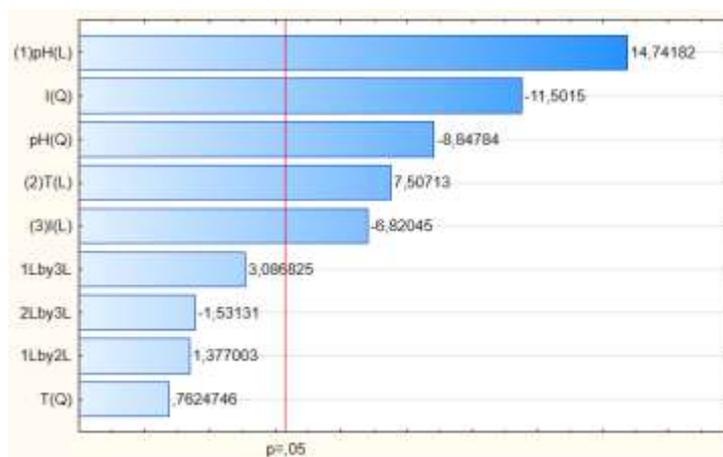
Na Tabela 13 é possível observar oscilações das concentrações iniciais de DQO, que podem estar relacionadas com os valores de inóculos adicionados. Nota-se que a menor concentração de DQO ocorreu no ensaio 7 que corresponde ao pH 8,0, temperatura de 40 °C e concentração de inóculo de 10%, alcançando uma média de 1943,3 mg L⁻¹ ou remoção de 67,4%. Observa-se na Tabela 13, que em maior porcentagem de inóculo, a redução foi menor, corroborando com o trabalho de Sonune e Garode (2018), que afirmaram que tal fato pode ter ocorrido devido à baixa disponibilidade de nutrientes e alta taxa de mortalidade dos microrganismos.

Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 13), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq. 10), relacionando a eficiência de remoção de DQO com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O modelo de regressão, apresentou R² = 0,1686, o que representa que 16,86% da variação da eficiência de remoção de DQO (%) é explicada pelo modelo apresentado.

$$\text{Remoção de DQO (\%)} = 36,39 + 6,09 \times \text{pH} - 4,25 \times \text{pH}^2 + 3,04 \times T - 2,78 \times I - 5,09 \times I^2 \quad (\text{Eq. 10})$$

Com base nos dados apresentados na Tabela 13, elaborou-se o gráfico de Pareto para avaliação da significância da temperatura, concentração de inóculo e pH em relação a remoção de DQO (Figura 6), para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 6– GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE DQO.



FONTE: O autor (2022).

A partir dos níveis testados, é possível identificar na Figura 6, que as variáveis pH em seus termos linear e quadrática, temperatura em seu termo linear e concentração de inóculo linear e quadrática influenciaram significativamente a eficiência de remoção de DQO em um nível de significância de 95%.

Observa-se na Tabela 14, que para a regressão $F_{cal} > F_{tab}$ e tem-se uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Entretanto, verifica-se que a falta de ajuste é significativa, pois F_{calc} é consideravelmente maior que F_{tab} . Ambos os resultados, além do coeficiente de determinação do modelo baixo ($R^2 = 0,167$), indicam que o modelo não se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo não é válido.

TABELA 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE DQO.

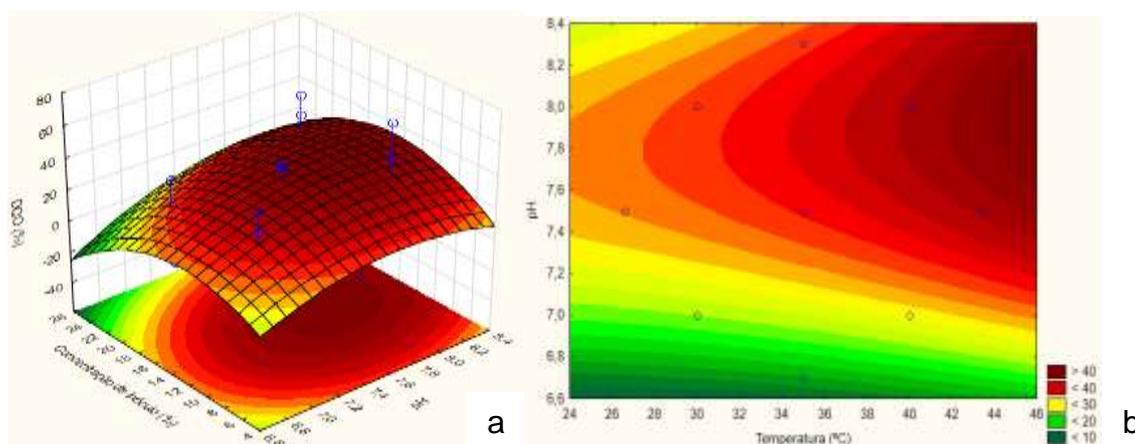
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	1187,50	5	237,500	81,36	3,20	25,43
Resíduos	32,108	11	2,918			
Falta de ajuste	5476,98	9	608,553	271,98	19,38	14,03
Erro puro	4,475	2	2,237			
Total	6673,481	16				

FONTE: O autor (2022).

Entretanto, apesar da não validação do modelo, é possível avaliar a influência das variáveis independentes sobre a eficiência de remoção de DQO a partir das superfícies de resposta, indicando a direção a ser tomada numa próxima etapa.

Na Figura 7 é apresentada a superfície de resposta obtida para a remoção de DQO em função da concentração de inóculo e do pH (Figura 7a), e o gráfico de contorno em função do pH e da temperatura (Figura 7b).

FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E PH (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DE PH E TEMPERATURA (B).



FONTE: O autor (2022).

Como pode ser observado, o pH em torno do intervalo de 7,5 a 8,0, concentração de inóculo em torno de 10 a 20% e temperaturas mais elevadas podem ser utilizadas para obter maior eficiência na remoção de DQO, afirmações estas certificadas pelos ensaios 7 (pH 8,0, 40 °C, 10% de inóculo e 67% de remoção) e 8 (pH 8,0, 40 °C, 20% de inóculo e 55% de remoção).

Na Tabela 15 estão apresentados resultados encontrados na literatura de remoção de DQO de diferentes efluentes industriais e também para água residuária municipal.

TABELA 15 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES A REMOÇÃO DE DQO COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.

Referência	Efluente	Inóculo	Condição	Tempo	DQO (%)
Rigo et al. (2008)	Indústria de carne bovina e suína	Lipase de <i>Penicillium restrictum</i>	Pré-tratamento com 0,1% de inóculo e posterior biodigestão, 35 °C, pH 7	96 h	65%
Verma et al. (2012)	Águas residuais contaminadas com petróleo	Isolado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10% de inóculo, 35 °C, 180 rpm	168 h	86,4%
Sreemoyee e Priti (2013)	Produtos lácteos	Cultura de <i>Neisseria sp.</i>	1% de inóculo, 24 °C, pH do efluente 8,5	120 h	67,1%
Dors et al. (2013)	Avícola	Lipase pancreática porcina (PPL)	3,0 g/L de inóculo, 35 °C, pH 8, 100 rpm	Pré-tratamento e posterior biodegradação anaeróbica por 30 dias	92%
Porwal, Mane e Velhal (2015)	Laticínio	Cultura mista (Isolado bacteriano e fúngico)	10 mL de inóculo em 1L de efluente, temperatura ambiente	48 h com aeração, 1 h de repouso e filtração	86,0%
Priyadharshini e Kumar (2016)	Laticínio	Isolado de <i>Bacillus sp.</i>	30 °C, 120 rpm	120 h	57%
Al-Wasify, Ali e Hamed (2017)	Laticínio	Isolado bacteriano	10 mL de inóculo em 1,5L de efluente, temperatura ambiente	48 h com aeração e posterior filtração	83,1%
Affes et al. (2017)	Avícola	Cultura de <i>Staphylococcus xylosus</i>	10% de inóculo, 37 °C, pH 7	144 h e posterior codigestão anaeróbica por 30 dias	72%
Sonune e Garode (2018)	Água residuária municipal	Isolado de <i>Bacillus licheniformis</i>	10% de inóculo, 37 °C, 120 rpm, pH 6,8	72 h	25%
Neste estudo	Abatedouro bovino	Isolado de <i>Aeromonas hydrophila</i>	10% de inóculo, 40 °C, pH 8	72 h	67,4%

FONTE: O autor (2022).

Segundo Sonune e Garode, (2018), o teste de DQO é um método rápido para estimar a matéria orgânica presente em amostras de águas residuais. Verifica-se que o resultado de remoção de DQO obtido para este estudo encontra-se dentro do intervalo apresentado na literatura para efluentes industriais. Além disso, quando comparado a outros trabalhos, este estudo mostrou-se bastante promissor; como por exemplo, comparado aos estudos de Priyadharshini e Kumar (2016), e Sonune e

Garode (2018), que observaram 57% e 25% de remoção de DQO, em um tempo maior e igual de reação, respectivamente. Como também, em relação ao trabalho de Rigo et al. (2008), em que ao avaliar o pré-tratamento e posterior biodigestão anaeróbica de efluentes de indústria de carne bovina e suína, encontraram 65% de remoção de DQO, valor inferior ao obtido para este estudo, em que apenas foi realizado o pré-tratamento do efluente. No entanto, esta discrepância pode ter sido causada devido ao uso de 10% de inóculo neste estudo e 0,1% de inóculo no trabalho supracitado.

Quanto as diferenças observadas neste estudo e os valores obtidos pelos autores da literatura podem ter vários motivos. O tempo de reação pode ter sido um deles, como observado nos estudos de Vida, Akbar e Zahra (2007) e Verma et al. (2012), os efluentes foram pré-tratados durante 30 e 7 dias, respectivamente, podendo explicar os resultados superiores de remoção de DQO. Outro motivo pode ter sido o uso de posterior filtração ou biodegradação anaeróbica, realizados respectivamente nos trabalhos de Al-Wasify, Ali e Hamed (2017) e Dors et al. (2013).

4.5.3 Óleos e graxas

Segundo Masse, Massé e Kennedy (2003), os lipídeos representam 40% da DQO total dos efluentes de abatedouros. A remoção de O&G de águas residuais é extremamente importante para garantir que estas águas sejam descartadas de forma eficiente e econômica evitando obstrução de tubulações de esgotos e problemas nas estações de tratamento de efluentes (TZIRITA, PAPANIKOLAOU e QUILTY, 2019).

Os resultados dos efeitos do pH, temperatura e concentração de inóculo (variáveis independentes) em relação a concentração de O&G (variável resposta), são apresentadas na Tabela 16.

TABELA 16 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE O&G.

Ensaio	Variáveis			Óleos e Graxas (mg L ⁻¹)				Eficiência (%)
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	3506,7±0,0	1660,0±126,7	1973,3±66,7	1060,0±60,0	58,49
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	3186,7±13,3	1760,0±66,7	2186,7±13,3	2046,7±86,7	19,84
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	2313,3±100,0	1400,0±173,3	1720,0±40,0	1906,7±420,0	25,33
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	1666,7±13,3	1106,7±66,7	1846,7±33,3	1213,3±53,3	52,48
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	2733,3±40,0	2646,7±180,0	2946,7±13,3	1573,3±280,0	38,38
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	2846,7±6,7	2820,0±220,0	2480,0±146,7	2506,7±213,3	1,83
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	2140,0±6,7	1640,0±53,3	1980,0±20,0	1766,7±100,0	30,81
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	1526,7±6,7	1440,0±26,7	880,0±13,3	1593,3±6,7	37,60
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	2413,3±160,0	2253,3±200,0	1073,3±100,0	1573,3±120,0	38,38
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	2180,0±113,3	2073,3±46,7	2053,3±13,3	1706,7±66,7	33,16
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	2993,3±86,7	2486,7±6,7	2613,3±53,3	2420,0±73,3	5,22
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	2746,7±80,0	2873,3±86,7	2240,0±133,3	1760,0±26,7	31,07
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	2606,7±260,0	2233,3±60,0	1693,3±173,3	1173,3±80,0	54,05
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	3360,0±93,3	2593,3±100,0	1886,7±73,3	2013,3±93,3	21,15
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	3346,7±93,3	2406,7±86,7	2226,7±13,3	1446,7±46,7	43,34
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	2760,0±160,0	2460,0±6,7	1960,0±40,0	1760,0±26,7	31,07
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	3586,7±93,3	2593,3±86,7	2393,3±33,3	1746,7±66,7	31,59

FONTE: O autor (2022).

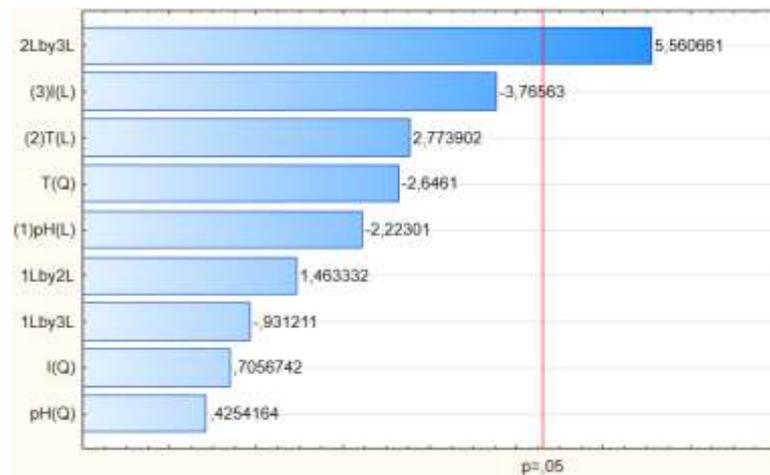
A Tabela 16 permite observar variações no teor de O&G, com remoção mais acentuada em 72 h, em torno de 60%. Tal observação também foi verificada por Rocha et al. (2013) utilizando a mesma metodologia de análise. Este fato pode ter sido causado pela baixa reprodutibilidade dos resultados pela metodologia utilizada. Observa-se na Tabela 16, que o ensaio 1 foi o que proporcionou melhores reduções da concentração de O&G, sendo conduzido em pH 7,0, temperatura de 30 °C e concentração de inóculo de 10%, alcançando uma média de 1060 mg L⁻¹ com remoção de 58,5%.

Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 16), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq.11), relacionando a eficiência de remoção de O&G com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de correlação (R²) foi de 0,9015, indicando que o modelo explicou 90,15% da variação dos dados observados.

$$\text{Remoção de O\&G (\%)} = 35,047 + 13,642 \times T_{xl} \quad (\text{Eq. 11})$$

A estimativa dos efeitos das variáveis independentes em relação a eficiência de remoção de O&G é ilustrada no gráfico de Pareto (Figura 8). Os efeitos que estão à direita da linha vermelha (p-valor =0,05) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 8– GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G.



FONTE: O autor (2022).

A Figura 8 indica que nos ensaios de remoção de O&G, a interação entre as variáveis temperatura e concentração de inóculo influenciaram significativamente e de forma positiva a eficiência de remoção de O&G em um nível de significância de 95%, ou seja, aumentando o valor destes parâmetros maiores remoções de O&G podem ser obtidos. Como o pH não afetou significativamente a remoção de O&G, este pode ser alterado de acordo com a aplicação.

Observa-se na Tabela 17, que para a regressão $F_{cal} > F_{tab}$ e tem-se uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Além disso, não foi observada significância na falta de ajuste, pois a razão do F calculado pelo F tabelado foi inferior a 1 (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Ambos os resultados, indicam que o modelo se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo é válido.

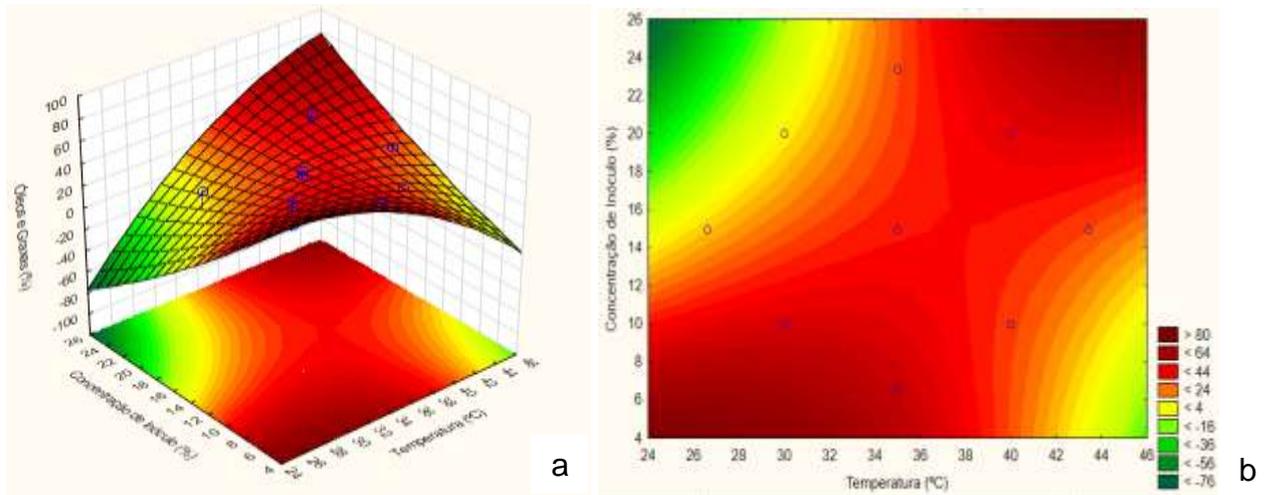
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE O&G.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	1488,898	1	1488,898	12,37	4,54	2,72
Resíduos	1805,960	15	120,397			
Falta de ajuste	276,446	13	21,265	0,44	19,42	0,02
Erro puro	96,304	2	48,159			
Total	3784,950	16	236,559			

FONTE: O autor (2022).

A superfície de resposta apresentada na Figura 9a representa o modelo linear obtido para a eficiência de remoção de O&G em função da concentração de inóculo e da temperatura, e a Figura 9b representa o gráfico de contorno para a eficiência de remoção de O&G em função da concentração de inóculo e da temperatura.

FIGURA 9- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).



FONTE: O autor (2022).

A condução do processo de pré-tratamento do efluente de abatedouro de bovinos nos extremos de maiores e menores condições de temperatura e concentração de inóculo proporcionam as máximas remoções de O&G, enquanto que o pH não afetou significativamente a remoção de O&G. Fatos estes também observados no ensaio 1 conduzidos em menor concentração de inóculo e temperatura (10%, 30 °C, 59% de remoção) e no ensaio 4 conduzidos em maior concentração de inóculo e temperatura (20%, 40 °C, 53% de remoção).

A biodegradação dos lipídeos é limitada principalmente por suas propriedades físico-química desfavoráveis, por exemplo, são insolúveis em água. Desta forma, temperaturas mais elevadas no tratamento de efluentes com O&G se mostra vantajoso, visto que os coeficientes de difusão e solubilização de lipídeos aumentam com a elevação da temperatura e com isso esses compostos se tornam mais acessíveis aos microrganismos e suas enzimas (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; CHIPASA e MEDRZYCKA, 2006). Quanto a concentração de inóculo, segundo Masse et al. (2001), embora uma quantidade elevada maximize a hidrólise de óleo e gordura, pode causar a diminuição da biodegradação, provavelmente devido a inibição causada pelo excesso de ácidos graxos livres. Deste modo, ao levar em conta o custo-benefício, o ideal seria a utilização de menor temperatura e concentração de inóculo em torno de 30 °C e 10%, respectivamente.

Na Tabela 18 estão apresentados resultados encontrados na literatura de remoção de O&G de diferentes efluentes industriais.

TABELA 18 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES A REMOÇÃO DE O&G COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.

Referência	Efluente	Inóculo	Condição	Tempo (h)	O&G (%)
Massé et al. (2003)	Efluente de matadouros com partículas de gordura de porco	Lipase pancreática 250 comercial (PL-250)	250 mg/L de PL-250, 25 °C	5,5 h	35%
Mendes, Pereira e Castro (2006)	Águas residuárias lácteas	Lipase de pâncreas suíno	0,5% de enzima, 37 °C, pH 8	24 h	40%
Rocha et al. (2013)	Água residuária de purificação de biodiesel	Inóculo de <i>Klebsilla oxytoca</i>	35 °C	48 h	80%
Porwal et al. (2015)	Laticínio	Cultura mista (isolado de levedura e bacteriano)	10 mL de inóculo em 1L de efluente, temperatura ambiente	48h com aeração, 1 h de repouso	59,1%
Krishnan e Valsa (2015)	Laticínio	Consórcio (isolado de <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus simplex</i> , <i>Trichococcus</i> sp.)	10% de inóculo, 30 °C, 200	216 h	88,5%
Al-Wasify, Ali e Hamed (2017)	Laticínio	Isolado bacteriano	10 mL de inóculo em 1,5L de efluente, temperatura ambiente	48 h com aeração e filtração	97,9%
Damasceno et al. (2018)	Água residual de matadouro de aves	Enzima do fungo <i>Penicillium brevicompactuum</i> (SEP) e biossurfactante de <i>P.aeruginosa</i>	0,5% de SEP e 27 mg/L de biossurfactante, 30 °C, pH 7	4h e posterior tratamento anaeróbico por 187 dias	96%
Neste estudo	Abatedouro bovino	Isolado de <i>Aeromonas hydrophila</i>	10% de inóculo, 30 °C, pH 7	72 h	58,5%

FONTE: O autor (2022).

A remoção de O&G obtida no presente estudo encontra-se dentro do intervalo apresentado na literatura para efluentes industriais (Tabela 18). Quanto as diferenças observadas neste estudo e os valores obtidos pelos autores em questão podem ser vários motivos. No estudo de Al-Wasify, Ali e Hamed (2017) o efluente foi submetido a filtração após o pré-tratamento, podendo explicar a alta eficiência de remoção. Nos trabalhos de Massé et al. (2003) e Mendes, Pereira e Castro (2006), baixos valores de remoção podem ter sido obtidos pelos menores tempos de reação utilizado.

Quanto as diferenças observadas entre o presente estudo e a pesquisa de Krishnan e Valsa (2015), podem ser explicadas pelo fato do uso de uma cultura mista de microrganismos por estes autores. Nisola et al. (2009), Loperena et

al. (2009) e Tang et al. (2012) relataram que uma combinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas poderia ser muito eficaz para a degradação de óleo e gordura e sugeriram que isso poderia ser atribuído a uma atividade cooperativa entre elas. No trabalho de Damasceno et al. (2018), a elevada remoção de O&G observada pode ser explicada pelo uso de enzima juntamente com biossurfactante como inóculo. O biossurfactante pode facilitar a biodegradação do efluente pela dissolução de O&G (NAKHLA et al., 2003).

Outro importante fator relacionado a remoção de O&G diz respeito a ativação da enzima lipase. Segundo Mendes et al. (2005), a ativação da lipase depende da formação de uma interface lipídeo/água e da adsorção da enzima nessa interface. Além disso, o excesso de O&G, em especial ácidos graxos de cadeia longa, podem gerar efeitos inibidores no crescimento dos microrganismos anaeróbios e na produção de enzima, desestabilizando o sistema de pré-tratamento (VALENTE et al., 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao observar os resultados da caracterização do efluente, como concentração de O&G de 2553,3 mg L⁻¹ e DQO de 8914,4 mg L⁻¹, pode ser concluído que a água residuária de abatedouro bovino apresenta alto potencial de impacto ambiental, necessitando de um eficiente tratamento para se adequar aos padrões de lançamentos exigidos pela legislação vigente.

Foi possível isolar seis microrganismos com atividade lipolítica do efluente, sendo que destes a bactéria que apresentou a maior atividade enzimática (2,46 U mL⁻¹), e identificada como *Aeromonas hydrophila*, mostrou potencial para utilização como inóculo no pré-tratamento da água residuária em estudo, uma vez que já se apresenta adaptada ao resíduo com características específicas.

Pelo delineamento experimental utilizado no pré-tratamento enzimático foi observado que as maiores remoções de DQO e O&G foram de 67 e 59%, respectivamente, decorridos 72 h de reação. Os ensaios realizados demonstraram que diferentes condições de temperatura, pH e concentração de inóculo possuem efeito significativo para redução de tais parâmetros.

Desta forma, a utilização de lipases produzidas por bactérias, como *A. hydrophila*, se mostra uma alternativa promissora no pré-tratamento de efluentes de abatedouro bovino, pois além de ser uma opção que proporciona redução de custos quando utilizada na sua forma bruta, apresenta significativa diminuição do potencial poluidor de tais efluentes.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir deste trabalho, ressalta-se a necessidade de mais estudos, incluindo:

- Aprofundar pesquisas que analisem o metabolismo microbiano.
- Avaliar o pré-tratamento utilizando outros valores para os níveis das variáveis independentes, visando a maximização dos parâmetros.
- Comparar o desempenho do inóculo de microrganismos isolados do efluente e um produto comercial.
- Analisar o uso de biossurfactante no sistema de pré-tratamento.
- Realizar a purificação e concentração das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. T.; JASIM, H. M.; HUSSEIN, A. A. Isolation and Identification of protease producing *Aeromonas hydrophila*. **Al-Nahrain Journal of Science**, v. 17, n. 1, p. 143-147, 2014.
- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da pecuária no Brasil – relatório anual**. Disponível em: <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>>, 2021. Acesso em 03 de março
- ADULKAR, T. V.; RATHOD, V. K. Pre-treatment of high fat content dairy wastewater using different commercial lipases. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 9, p. 2450-2455, 2013.
- AFFANDI, I. E.; SURATMAN, N. H.; ABDULLAH, S.; AHMAD, W. A.; ZAKARIA, Z. A. Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 33-40, 2014.
- AFFES, M.; ALOUI, F.; HADRICH, F.; LOUKIL, S.; SAYADI, S. Effect of bacterial lipase on anaerobic co-digestion of slaughterhouse wastewater and grease in batch condition and continuous fixed-bed reactor. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 195, 2017.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALEXANDRE, V. M. F.; VALENTE, A. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre hydrolyzed with a solid enzyme pool. **Renewable Energy**. v. 36, p. 3439-3444, 2011.
- ALHAMDANI, M.A.A.; ALKABBI, H.J.J. Isolation and identification of lipase producing bacteria from oil-contaminant soil. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v.6, n.20, p.1-7, 2016.
- ALMEIDA, A.F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. **BioMed research international**, p.1-10, 2013.
- AL-WASIFY, R.S.; ALI, M. N.; HAMED, S. R. Biodegradation of dairy wastewater using bacterial and fungal local isolates. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 11, p. 3094-3100, 2017.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- ANBU, P.; NOH, M.; KIM, D.; SEO, J.; HUR, B.; MIN, K. H. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 4147-4156, 2011.

BALDO, C.; BAGGIO, L. M.; MORENO, T. G.; MAGRI, A.; DE MELO, M. R.; GASPARIN, F. G. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo da produção de lipase por bactérias isoladas de efluente de abatedouro avícola. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 347-350, 2013.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BARROS, N. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos**. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3. ed. Editora da Unicamp, 2007.

BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A.; ZACHGO, E. A. Exercise 1 – Aseptic Technique and Establishing Pure Cultures: The Streak Plate and Culture Transfer. In: _____. **BIOTECHNOLOGY: A Laboratory Course**. 2.ed. Academic Press, 1996. p. 9-16.

BEHERA, A.R.; VELUPPAL, A.; DUTTA, K. Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 33, p. 34277-34284, 2019.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 334-339, 2001.

BOROWSKI, S.; KUBACKI, P. Co-digestion of pig slaughterhouse waste with sewage sludge. **Waste management**, v. 40, p. 119-126, 2015.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. V. 1. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BOTIŞ, M. Purification of the wastewater from meat industry. **Journal on processing and Energy in Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 21-23, 2015.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S.J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3-12, 2015.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, nº 92, 16 mai. 2011, Seção 3, p. 6.

BUENO, P.R.M.; OLIVEIRA, T.F.; CALIARI, M.; CASTIGLIONI, G.L.; SOARES JÚNIOR, M.S. Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 566-573, 2014.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; MEHRVAR, M. Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. **Journal of Environmental Management**, v. 161, p. 287-302, 2015.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; MEHRVAR, M.; QUIÑONES-BOLAÑOS, E. Combined anaerobic-aerobic and UV/H₂O₂ processes for the treatment of synthetic slaughterhouse wastewater. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, n. 9, p. 1122-1135, 2013.

BUSTILLO-LECOMPTE, C.; MEHRVAR, M. Slaughterhouse wastewater: treatment, management and resource recovery. **Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery**. InTech, 2017.

CAIXETA, C. E. T.; CAMMAROTA, M. C.; XAVIER, A. M. F. Slaughterhouse wastewater treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, n. 81, p. 61-69, 2002.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. 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, 2006.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, p. 111-123, 2001.

CARVALHO, P. D. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. D.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CAVALEIRO, A. J.; FERREIRA, T.; PEREIRA, F.; TOMMASO, G.; ALVES, M. M. Biochemical methane potential of raw and pre-treated meat-processing wastes. **Bioresource technology**, v. 129, p. 519-525, 2013.

CAVALLINI, G. S.; SILVA, W. P.; GONZAGA, M. F. Desinfecção de efluente final de abatedouro de bovinos com ácido peracético para fins de reuso. **DESAFIOS**, v. 4, n. 4, p. 41-50, 2017.

CHANDRA, P.; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-42, 2020.

CHENG, D.; LIU, Y.; NGO, H. H.; GUO, W.; CHANG, S. W.; NGUYEN, D. D.; SHICHENG, Z.; GANG, L.; LIU, Y. A review on application of enzymatic bioprocesses in animal wastewater and manure treatment. **Bioresource technology**, v. 313, p. 123683, 2020.

CHIPASA, K. B.; MĘDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 635-645, 2006.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: A review. **Biopharm Journal**, v.1, n.2, p. 41–47, 2015.

CHUANG, Y.C.; CHIOU, S.F.; SU, J.H.; WU, M.L.; CHANG, M.C. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 803-812, 1997.

CRUZ L.M.; SOUZA E.M.; WEBER O.B.; BALDANI J.I.; DÖBEREINER J.; PEDROSA F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananascomosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microb.**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

CUADROS, F.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, F.; RUIZ-CELMA, A.; RUBIALES, F.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A. Recycling, reuse and energetic valuation of meat industry wastes in Extremadura (Spain). **Resources, conservation and recycling**, v. 55, n. 4, p. 393-399, 2011.

DAMASCENO, F. R.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; KOOKOS, I. K.; KOUTINAS, A. A.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. Treatment of wastewater with high fat content employing an enzyme pool and biosurfactant: technical and economic feasibility. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 531-542, 2018.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S.C.; FREIRE. D.M. G; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.676-68, 2008.

DAOUD, L.; KAMOUN, J.; ALI, M.B.; JALLOULI, R.; BRADAI, R.; MECHICHI, T.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; ALOULOU, A. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 232-237, 2013.

DE CARVALHO, T. B.; DE ZEN, S. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista iPecege**, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

DE NARDI, I. R.; FUZI, T. P.; DEL NERY, V. Performance evaluation and operating strategies of dissolved-air flotation system treating poultry slaughterhouse wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 52, n. 3, p. 533-544, 2008.

DE SENA, R.F.; MOREIRA, R.F.P.M.; JOSÉ, H.J. Comparison of coagulants and coagulation aids for treatment of meat processing wastewater by column flotation. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8221-8225, 2008.

DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; MARTINS, R. C.; ROCHA, W. L.; DIAS, A. P. Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. **Biotechnology Applied Biochemistry**. Indianapolis, USA, v. 26, p. 111-116, 1997.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2583-2595, 2005.

DORS, G.; MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; FURIGO JR., A. Simultaneous Enzymatic Hydrolysis and Anaerobic Biodegradation of Lipid-rich Wastewater from Poultry Industry. **Applied Water Science**, v. 3, n. 1, p.343-349, 2013.

DUARTE, J. G.; SILVA, L. L. S.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; GUTARRA, M. L. E. Enzymatic hydrolysis and anaerobic biological treatment of fish industry effluent: Evaluation of the mesophilic and thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 83, p. 455-462, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry, Washington-DC**, v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

DUZA, M.B.; MASTAN, S. Optimization of lipase production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN)-isolated from soil sediments near oilseed farm. **IOSR J. Pharm. Biol. Sci**, v. 9, p. 66-76, 2014.

EKINCI, A. P.; DINÇER, B.; BALTAŞ, N.; ADIGÜZEL, A. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 2, p. 325-331, 2016.

ENZYME EXPASY. Disponível em: <https://enzyme.expasy.org/cgi-bin/enzyme/enzyme-search-cl?1>. Acesso em: 08 de maio de 2022.

FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BON, E. P. S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G. L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1997.

FURINI, G.; BERGER, J. S.; CAMPOS, J. A.; SAND, S. T.; GERMANI, J. C. Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2955-2965, 2018.

FURINI, G.; BERGER, J. S.; CAMPOS, J. A.; SAND, S. T.; GERMANI, J. C. Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2955-2965, 2018.

GHAEDI, M.; AZAD, F. N.; DASHTIAN, K.; HAJATI, S.; GOUDARZI, A.; OYLAK, M. Central composite design and genetic algorithm applied for the optimization of ultrasonic-assisted removal of malachite green by ZnO nanorod-loaded activated carbon. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 167, p. 157-164, 2016.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, v. 36, p. 139-147, 2005.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V. D.; SILVA, G. D. S.; CASTRO, H. F. D. Assessment of catalytic properties in aqueous and organic media of lipase from *Candida rugosa* immobilized on wood cellulignin activated with carbonyldiimidazole. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.

GONÇALVES, F. A. G. Produção de lipase extracelular por leveduras de cultivo submerso. 2007. 67 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; ANBU, P. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.

GOWTHAMI, P.; MUTHUKUMAR, K.; VELAN, M. Utilization of coconut oil cake for the production of lipase using *Bacillus coagulans* VKL1. **Biocontrol Science**, v. 20, n. 2, p. 125-133, 2015.

GREENWOOD, P. L. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Ocl**, v. 24, n. 4, p. D403, 2017.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 205-209, 1971.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEE, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HITCH, T. C.; CLAVEL, T. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. **PeerJ**, v. 7, p. e7249, 2019.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1, p. 155-170, 2004.

HUSAIN, I. A.; ALKHATIB, M. A. F.; JAMMI, M. S.; MIRGHANI, M. E.; ZAINUDIN, Z. B.; HODA, A. Problems, control, and treatment of fat, oil, and grease (FOG): a review. **Journal of oleo science**, v. 63, n. 8, p. 747-752, 2014.

INSTITUTO TERRA E ÁGUA. PORTARIA N° 29 DE 06/02/2018: **Estabelece critérios para o Licenciamento Ambiental de empreendimentos de bovinocultura confinada e semiconfinada de leite e de bovinocultura confinada de corte, com aproveitamento econômico, nos termos que especifica**. Paraná: IAT, 2018.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology Amsterdam**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAMIE, A.; ALSHAMI, A. S.; MALIABARI, Z. O.; ALI, A. M.; AL HAMOUZ, O. C. S. Immobilization and enhanced catalytic activity of lipase on modified MWCNT for oily wastewater treatment. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 35, n. 5, p. 1441-1449, 2016.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system, **Chemosphere**, v. 67, n. 8, p. 1492-1501, 2007.

JENSEN, P. D.; YAP, S. D.; BOYLE-GOTLA, A.; JANOSCHKA, J.; CARNEY, C.; PIDOU, M.; BATSTONE, D. J. Anaerobic membrane bioreactors enable high rate treatment of slaughterhouse wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, n. 97, p. 132-141, 2015.

JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 264-269, 2010.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7563-7577, 2013.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**. v. 24, p. 1797-1802, 2002.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International journal of environmental science and technology**, v. 12, n. 3, p. 1147-1162, 2015.

KIRANA, S.; ARSHADA, Z.; NOSHEEN, S.; KAMALA, S.; GULZARA, T.; MAJEEDA, M. S.; JANNATA, M.; RAFIQUE, M. A. Microbial Lipases: Production

and Applications: A Review. **Journal of Biochemistry Biotechnology and Biomaterials**, v. 1, n. 2, p. 7-20, 2016.

KLAUCANS, E.; SAMS, K. Problems with Fat, Oil, and Grease (FOG) in Food Industry Wastewaters and Recovered FOG Recycling Methods Using Anaerobic Co-Digestion: A Short Review. **Key Engineering Materials**, p. 61-68, 2018.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 ed. Nova York: Thieme, 2005.

KRISHNAN, N.; VALSA, A. K. Biodegradation of lipid rich dairy effluent by bacterial consortium. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 9, n. 9, p. 16-20, 2015.

KURNIAWAN, T. A.; CHAN, G. Y.; LO, W. H.; BABEL, S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. **Chemical engineering journal**, v. 118, n. 1-2, p. 83-98, 2006.

LAI, O.M.; LEE, Y.Y.; PHUAH, E.T.; AKOH, C.C. Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications. **Encyclopedia Of Food Chemistry**, v.2, p.158-167, 2019.

LEE, L. P.; KARBUL, H. M.; CITARTAN, M.; GOPINATH, S. C.; LAKSHMIPRIYA, T.; TANG, T. H. Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. **BioMed research international**, p.1-9, 2015.

LEHNINGER, A. L. **Princípios da Bioquímica**, 2. ed. São Paulo: Savier, 1986.
LI, J.; LUO, G.; HE, L.; XU, J.; LYU, J. Analytical approaches for determining chemical oxygen demand in water bodies: A review. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 48, n. 1, p. 47-65, 2018.

LI, W.; JIA, M. X.; DENG, J.; WANG, J. H.; LIN, Q. L.; LIU, C.; WANG, S.S.; TANG, J.X.; ZENG, X.X.; MA, L.; SU, W.; LIU, X.X.; CAI, F.; ZHOU, L.Y. Isolation, genetic identification and degradation characteristics of COD-degrading bacterial strain in slaughter wastewater. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 8, p. 1800-1805, 2018.

LIMA, V. O. Pré-tratamento de efluente de curtume por bactérias e enzima lipolíticas. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; UOSUKAINEN, E.; SEPPALLA, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41-50, 1998.

LIU, C. H.; CHEN, C. Y.; WANG, Y. W.; CHANG, J. S. Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. **Biochemical engineering journal**, v. 58, p. 96-102, 2011.

LOPERENA, L.; FERRARI, D.; DÍAZ, A. L.; INGOLD, G.; PÉREZ, L. V.; CARVALLO, F.; TRAVERS, D.; MENS, R. J.; LAREO, C. Isolation and selection of native

microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 100, p. 762-1766, 2009.

MABIZELA-MOKOENA, N. B.; LIMANI, S. W.; NCUBE, I.; PIATER, L. A.; LITTHAUER, D.; NTHANGENI, M. Genetic determinant of *Bacillus pumilus* lipase lethality and its application as positive selection cloning vector in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 137, p. 43-51, 2017.

MAMHOBU-AMADI, W. C.; KINIGOMA, B. S.; MOMOH, Y. L.; OJI, A. A. Abattoir operations and waste Management Options: A review. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)**, v. 6, n. 12, p. 226-231, 2019.

MANIOS, T.; GAKI, E.; BANOU, S.; KLIMATHIANOU, A.; ABRAMAKIS, N.; SAKKAS, N. Closed wastewater cycle in a meat producing and processing industry. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 38, n. 4, p. 335-345, 2003.

MARTINELLI, T. M.; JUNIOR, O. R.; CERESER, N. D.; CARDOZO, M. V.; KAMIMURA, B. A.; NESPOLO, N. M.; PINTO, F. R. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em abatedouro bovino e sensibilidade a antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 77, n. 2, p. 195-202, 2010.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 76, n. 6, p. 629-635, 2001.

MASSE, L.; MASSÉ, D. I.; KENNEDY, K. J. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Process biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1365 -1372, 2003.

MAZZUCOTELLI, C. A.; DURRUTY, I.; KOTLAR, C. E.; MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; ROURA, S. I. Development of a microbial consortium for dairy wastewater treatment. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 19, n. 2, p. 221-230, 2014.

MCCABE, B. K.; HARRIS, P.; BAILLIE, C.; PITTAWAY, P.; YUSAF, T. Assessing a new approach to covered anaerobic pond design in the treatment of abattoir wastewater. **Australian Journal of Multi-Disciplinary Engineering**, v. 10, n. 1, p. 81-93, 2013.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. **Concise Reviews in Food Science**. v.65, n.8, 2000.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 135-142, 2005.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**, n. 32, p. 185-190, 2006.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; FURIGO Jr., A.; CASTRO, H. F. Anaerobic Biodegradability of Dairy Wastewater Pretreated with Porcine Pancreas Lipase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.6, 1279-1284, 2010.

MENG, Y.; LUAN, F.; YUAN, H.; CHEN, X.; LI, X. Enhancing anaerobic digestion performance of crude lipid in food waste by enzymatic pretreatment. **Bioresource technology**, v. 224, p. 48-55, 2017.

METCALF, L.; EDDY, H. P. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. 5. ed. **McGraw-Hill Brasil**, 2015.

METCALF, L.; EDDY, H. Wastewater engineering: treatment and reuse. 4. ed. **McGraw-Hill Brasil**, New York, 1819p, 2003.

MIGNARD, S.; FLANDROIS J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**. v. 67, p. 574–581, 2006.

MITTAL, G. S. Treatment of wastewater from abattoirs before land application—a review. **Bioresource technology**, v. 97, n. 9, p. 1119-1135, 2006.

MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; NOSRATI, M.; AMANI, T. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 475-480, 2012.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 101–105, 2002.

NAKHLA, G.; AL-SABAWI, M.; BASSI, A.; LIU, V. Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 102, n. 2-3, p. 243-255, 2003.

NEELAMBARI, V.; VASANTHABHARATHI, V.; BALASUBRAMANIAN, R.; JAYALAKSHMI, S. Lipase from marine *Aeromonas hydrophila*. **Res J Microbiol**, v. 6, p. 658-668, 2011.

NEILSON, A. H. The occurrence of aeromonads in activated sludge: isolation of *Aeromonas sobria* and its possible confusion with *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 44, n. 2, p. 259-264, 1978.

NELSON, D.L.; COX, M. **Lehninger- Principios de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed. 5ª edição, 1273 p.2011.

NIMKANDE, V. D.; BAFANA, A. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 46, p. 102591, 2022.

NISOLA, G. M.; CHO, E. S.; SHON, H. K.; TIAN, D.; CHUN, D. J.; GWON, E. M.; CHUNG, W. J. Cell immobilized FOG-trap system for fat, oil, and grease removal from restaurant wastewater. **Journal of environmental engineering**, v. 135, n. 9, p. 876-884, 2009.

OLIVEIRA, C.D.S.; COELHO, P.N.; DE SÁ, O.R. Avaliação da eficiência do tratamento de efluentes em um abatedouro do município de Passos, MG, Brasil. **Ciência ET Praxis**, v. 8, n. 16, p. 13-20, 2017.

OLIVEIRA, T. F. D.; HIDÁLGO, M. R.; SOARES JÚNIOR, M. S. Production of lipase extrated from aqueous waste: enzymatic activity kinetics. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 6, p. 562-572, 2014.

PACHECO, J. W. F; YAMANAKA, H. T. **Guia técnico ambiental de abates (bovino e suíno): Série P+L**. São Paulo: CETESB, 2008.

PADILHA, G. D. S.; SANTANA, J. C. C.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, n.1, p. 7-19, 2012.

PADMAPRIYA, B.; RAJESWARI, T.; NOUSHIDA, E.; SETHUPALAN, D. G.; VENIL, C. K. Production of lipase enzyme from *Lactobacillus* spp. and its application in the degradation of meat. **World Applied Sciences Journal**, v. 12, n. 10, p. 1798-1802, 2011.

PANDEY, K.; SINGH, B.; PANDEY, A. K.; BADRUDDIN, I. J.; PANDEY, S.; MISHRA, V. K.; JAIN, P. A. Application of microbial enzymes in industrial waste water treatment. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, n. 8, p. 1243-1254, 2017.

PATEL, P.; DESAI, B. Isolation, identification and production of lipase producing bacteria from oil contaminated soil. **BMR Microbiology**, v.4, n.1, p.1-7, 2018.

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

PEIL, G. H.; KUSS, A. V.; RAVE, A. F.; VILLARREAL, J. P.; HERNANDES, Y. M.; NASCENTE, P. S. Bioprospecting of lipolytic microorganisms obtained from industrial effluents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1769-1779, 2016.

PEREIRA, E. B.; FURIGO Jr. A.; CASTRO, H. F.; REGINATTO, V. S. Degradation of fat and grease in slaughterhouse wastewater by a commercial microbial lipase. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.49, p.21-28, 2006.

PEREIRA, M.A.; PIRES, O.C.; MOTA, M.; ALVES, M.M. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. **Biotechnology and bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 15-23, 2005.

PORWAL, H. J.; MANE, A. V.; VELHAL, S. G. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. **Water Resources and Industry**, v. 9, p. 1-15, 2015.

PRASAD, M. P.; MANJUNATH, K. Effect of media and process parameters in the enhancement of extracellular lipase production by bacterial isolates from industrial effluents. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 8, p. 308, 2012.

PRIMASARI, B.; IBRAHIM, S.; ANNUAR, M. S. M.; REMMIE, L. X. I. Aerobic treatment of oily wastewater: effect of aeration and sludge concentration to pollutant reduction and PHB accumulation. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 78, p. 172-176, 2011.

PRIYADHARSHINI, M.; KUMAR, R. S. Biodegradation of dairy wastewater using bacterial isolates. **International Journal of Modern Trends In Engineering And Science**, v. 3, n. 7, p.133-138, 2016.

RAMANI, K.; KENNEDY, L. J.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 1683-1691, 2010.

RAMNATH, L.; SITHOLE. B.; GOVINDEN, R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. **Canadian journal of microbiology**, v. 63, n. 3, p. 179-192, 2016.

RANI, R. U.; KUMAR, S. A.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I. T.; BANU, J. R. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 415-424, 2012.

RAY, R. C.; ROSELL, C. M. Lipase: Properties, Functions and Food Applications. **Microbial Enzyme Technology in Food Application**, p. 228-254, 2017.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D. D.; FREIRE, D. M.; LUCCIO, M. D. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 9, p. 1243-1248, 2008.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

- ROCHA, D.; GOMES, B. M.; GOMES, S. D.; SENE, L.; ZENATTI, D. C. Selection of microorganisms' producer of lipase for fat removal from biodiesel purification water. **Eng. Agrí. Jaboticabal**, v. 33, n.2, p. 332-340, 2013.
- ROSA, D. R. **Tratamento enzimático/biológico de efluentes com alto teor de gordura**. 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- ROSA, D. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.
- ROSA, D. R.; DUARTE, I. C.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6170-6176, 2009.
- ROUSENAU, F.; JAEGER, K. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1023-1032, 2000.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.
- SAADATULLAH, I. M.; JAN, M.; WAHEEDULLAH, N. M.; UR REHMAN, Z. Isolation, Identification and Characterization of a Lipase Producing *Pseudomonas*. **Journal of Biomaterials**, v. 2, n. 2, p. 51-57, 2018.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Production and applications of microbial lipases: a review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 30, p. 2667-2677, 2012.
- SAMARASIRI, B.K.T.; RATHNASIRI, P.G.; DAVE, F. . Development of an enzymatic hydrolysis pretreatment strategy to improve batch anaerobic digestion of wastewater generated in desiccated coconut processing plants. In: **2019 Moratuwa Engineering Research Conference (MERCOn)**. IEEE, 2019. p. 314-319.
- SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 1, p. 179-185, 2010.
- SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 1, p. 5-28, 2018.
- SCOARIS, D. D. O.; BIZERRA, F. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ABREU FILHO, B. A. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. The

occurrence of *Aeromonas* spp. in the bottled mineral water, well water and tap water from the municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1049-1055, 2008.

SERIKOVNA, S. Z.; SERIKOVICH, K. S.; SAKENOVNA, A. S.; MURZAKHMETOVICH, S. S.; KHAMITOVICH, A. K. Screening of lipid degrading microorganisms for wastewater treatment. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 219-226, 2013.

SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. **Journal of environmental management**, v. 210, p. 10-22, 2018.

SHARMA, P.; SHARMA, N.; PATHANIA, S.; HANDA, S. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369-377, 2017.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonine van Leeuwenhoek**, v.28, n.1, p. 15-22, 1957.

SILVA, M. O. M. B.; BISPO, D. F.; PAGANO, R. L.; SILVA, A. S.; SANTOS, E. J.; SILVA, C. F. Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 12, n. 05, p. 1-9. mai. 2016.

SILVA-BEDOYA, L. M.; SÁNCHEZ-PINZÓN, M. S.; CADAVID-RESTREPO, G. E.; MORENO-HERRERA, C. X. Bacterial community analysis of an industrial wastewater treatment plant in Colombia with screening for lipid-degrading microorganisms. **Microbiological research**, v. 192, p. 313-325, 2016.

SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of Palm Oil Industrial Waste as Feedstock for Lipase Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 558–571, 2016.

SOLEYMANI, S.; ALIZADEH, H.; MOHAMMADIAN, H.; RABBANI, E.; MOAZEN, F.; SADEGUI, H. M.; SHARIAT, S.Z.; ETEMADIFAR, Z.; RABBANI, M. Efficient Media for High Lipase Production: One Variable at a Time Approach. **Avicenna Journal Of Medical Biotechnology**, Iran, v. 9, n. 2, p.82-86, 2017.

SONUNE, N.; GARODE, A. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 37-44, 2018.

SREEMOYEE, C.; PRITI, P. Assessment of physico-chemical parameters of dairy wastewater and isolation and characterization of bacterial strains in terms of cod reduction. **Int J Sci**, v. 2, n. 3, p. 395-400, 2013.

- SUCI, M.; ARBIANTI, R.; HERMANSYAH, H. Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.105, n.1, p.1-6, 2018.
- SUEHARA, K.; KAWKMOTO, Y.; FUJII, E. KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, EUA, v. 100, n. 4, p. 437-442, 2005.
- TACIN, M. V.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P.; TEIXEIRA, M. F. S.; DE PAULA, A. V.; DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 369-378, 2019.
- TAHREEN, A.; JAMI, M. S.; ALI, F. Role of electrocoagulation in wastewater treatment: A developmental review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 37, p. 101440, 2020.
- TANG, H. L.; XIE, Y. F.; CHEN, Y. C. Use of Bio-Amp, a commercial bio-additive for the treatment of grease trap wastewater containing fat, oil, and grease. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 52-58, 2012.
- TEIXEIRA, J. C.; HESPANHOL, A. N. A trajetória da pecuária bovina brasileira. **Caderno Prudentino de Geografia**, v. 1, n. 36, p. 26-38, 2014.
- TIGERSTROM, R.G. V.; STELMASCHUK, S. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. **Canadian journal of microbiology**, v. 35, n. 4, p. 511-514, 1989.
- TRIPATHI, N.; CHOUDHARY, A.; RAWAT, R. Optimization and purification of lipase production by *aeromonas hydrophila*. **International Journal of Recent Trends In Science And Technology**, p.304-306, 2018.
- TZIRITA, M.; PAPANIKOLAOU, S.; QUILTY, B. Enhanced fat degradation following the addition of a *Pseudomonas* species to a bioaugmentation product used in grease traps. **Journal of Environmental Sciences**, v. 77, p. 174-188, 2019.
- VALENTE, A. M.; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 483-488, 2010.
- VALLADÃO A. B. G.; FREIRE D. M. G.; CAMMAROTA M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 4, p. 219-225, 2007.
- VALLADÃO, A. B. G.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Performance of an Anaerobic Reactor Treating Poultry Abattoir Wastewater with High Fat Content After Enzymatic Hydrolysis. **Environmental Engineering Science**. v. 28, n. 4, 2011.

VEERAPAGU, M.; NARAYANAN, A. S.; PONMURUGAN, K.; JEYA, K. R. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. **Asian J. Pharm. Clin. Res**, v. 6, n. 3, p. 62-67, 2013.

VERMA, S.; SAXENA, J.; PRASANNA, R.; SHARMA, V.; NAIN, L. Medium optimization for a novel crude-oil degrading lipase from *Pseudomonas aeruginosa* SL-72 using statistical approaches for bioremediation of crude-oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 321-329, 2012.

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; FILHO, N. R. A.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BODIESEL, Brasília, DF, 2006. **Anais...** Brasília, DF: Prossiga/IBICT, 2006. p. 218-223.

VISHNUPRIYA, B.; SUNDARAMOORTHY, C.; KALAIVANI, M.; SELVAM, K. PRODUCTION of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of Bioparameters. **International journal of chemtech research**, v. 2, n. 3, p. 1380-1383, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
YADAV, S.; VERMA, D. K.; PRADHAN, P. K.; DOBRIYAL, A. K.; SOOD, N. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* species from aquatic environment. **International Journal of Aquatic Science**, v. 5, n. 1, p. 13-20, 2014.

YAO, Y.; WANG, M.; LIU, Y.; HAN, L.; LIU, X. Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment. **Food chemistry**, v. 302, p. 125199, 2020.

YASIN, N. H. M.; SANCHEZ-TORRES, V.; MAEDA, T. Enhanced reduction of waste activated sludge at a low temperature by locally isolated strains *Pseudomonas* sp. VNT and *Aeromonas* sp. VNT. **Bioresource technology**, v. 174, p. 134-141, 2014.

YOUNG J.P.; DOWNER H.L.; EARDLY B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J Appl Bacteriol**, v. 173, p. 2271-2277, 1991.

APÊNDICE

TABELA 1 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			Atividade lipolítica (U mL ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,25±0,00	0,37±0,04	0,77±0,05	0,97±0,00
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,33±0,00	0,16±0,00	0,77±0,05	1,11±0,05
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,05±0,00	0,00±0,05	0,53±0,05	0,77±0,10
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,02±0,02	0,00±0,00	0,53±0,05	0,73±0,00
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,25±0,00	0,25±0,00	0,68±0,05	0,87±0,10
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,22±0,02	0,29±0,04	0,51±0,02	1,11±0,05
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,00±0,02	0,07±0,00	0,48±0,00	0,82±0,05
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,05±0,05	0,00±0,05	0,48±0,10	0,68±0,00
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,30±0,00	0,30±0,05	0,15±0,00	0,35±0,00
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,15±0,05	0,10±0,05	0,40±0,00	0,40±0,05
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	0,10±0,00	0,05±0,05	0,73±0,00	0,65±0,02
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	0,10±0,00	0,48±0,05	0,63±0,05	0,53±0,05
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	0,10±0,00	0,15±0,00	0,20±0,00	0,35±0,00
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	0,15±0,05	0,00±0,00	0,15±0,05	0,30±0,05
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,39±0,05	0,70±0,00	0,63±0,00	1,00±0,00
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,39±0,05	0,22±0,00	0,82±0,00	1,10±0,10
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,24±0,00	0,31±0,10	0,87±0,05	0,95±0,05

TABELA 2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE DQO PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			DQO (mg L ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0	30,0	10,0	8920,0±50,0	8436,7±0,0	9086,7±483,3	7153,3±316,7
2	7,0	30,0	20,0	8686,7±50,0	8970,0±66,7	9453,3±50,0	5793,3±66,7
3	7,0	40,0	10,0	5686,7±300,0	5726,7±266,7	4626,7±33,3	3626,7±0,0
4	7,0	40,0	20,0	6586,7±733,3	5426,7±33,3	5160,0±0,0	4510,0±183,3
5	8,0	30,0	10,0	8903,3±33,3	9103,3±100,0	10103,3±33,3	6376,7±16,7
6	8,0	30,0	20,0	9020,0±16,7	9036,7±33,3	9336,7±0,0	6610,0±16,7
7	8,0	40,0	10,0	6553,3±166,7	5276,7±183,3	4143,3±183,3	3260,0±66,7
8	8,0	40,0	20,0	6020,0±33,3	5576,7±16,7	3826,7±33,3	2860,0±200,0
9	6,7	35,0	15,0	8793,3±66,7	8450,0±50,0	8666,7±33,3	8533,3±66,7
10	8,3	35,0	15,0	8776,7±50,0	7666,7±0,0	7955,6±88,9	8716,7±16,7
11	7,5	26,6	15,0	8176,7±50,0	7826,7±100,0	7476,7±16,7	5993,3±200,0
12	7,5	43,4	15,0	8393,3±0,0	8893,3±133,3	8493,3±300,0	8043,3±116,7
13	7,5	35,0	6,60	8643,3±16,7	8733,3±33,3	8866,7±33,3	8733,3±0,0
14	7,5	35,0	23,4	9076,7±16,7	8100,0±66,7	9016,7±83,3	7966,7±100,0
15	7,5	35,0	15,0	8743,3±16,7	8743,3±16,7	8410,0±50,0	8350,0±383,3
16	7,5	35,0	15,0	8793,3±0,0	8810,0±50,0	8343,3±16,7	8144,4±311,1
17	7,5	35,0	15,0	8926,7±33,3	8793,3±0,0	8360,0±33,3	8811,1±22,2

TABELA 3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE O&G PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			Óleos e Graxas (mg L ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0	30,0	10,0	3360,0±40,0	1120,0±13,3	1913,3±113,3	713,3±6,7
2	7,0	30,0	20,0	3213,3±226,7	1740,0±86,7	1386,7±80,0	1540,0±6,7
3	7,0	40,0	10,0	2213,3±40,0	1453,3±0,0	1993,3±140,0	1046,7±73,3
4	7,0	40,0	20,0	2113,3±73,3	1846,7±20,0	2046,7±33,3	1580,0±60,0
5	8,0	30,0	10,0	2860,0±33,3	1713,3±33,3	2300,0±86,7	2193,3±6,7
6	8,0	30,0	20,0	2533,3±13,3	2680,0±106,7	1766,7±33,3	1920,0±66,7
7	8,0	40,0	10,0	1740,0±273,3	1513,3±6,7	1686,7±60,0	1453,3±120,0
8	8,0	40,0	20,0	1373,3±26,7	1280,0±80,0	1293,3±213,3	1073,3±6,7
9	6,7	35,0	15,0	2193,3±73,3	1800,0±40,0	1313,3±13,3	1140,0±20,0
10	8,3	35,0	15,0	2093,3±173,3	2066,7±106,7	1566,7±60,0	1120,0±106,7
11	7,5	26,6	15,0	2440,0±66,7	2246,7±20,0	2486,7±46,7	1873,3±126,7
12	7,5	43,4	15,0	2866,7±40,0	2153,3±6,7	1713,3±20,0	1733,3±200,0
13	7,5	35,0	6,60	2560,0±186,7	2313,3±6,7	1426,7±13,3	1260,0±60,0
14	7,5	35,0	23,4	2806,7±46,7	2506,7±106,7	1606,7±60,0	1273,3±33,3
15	7,5	35,0	15,0	2926,7±20,0	2106,7±93,3	1633,3±46,7	1226,7±0,0
16	7,5	35,0	15,0	3273,3±26,7	2486,7±46,7	1666,7±26,7	1366,7±46,7
17	7,5	35,0	15,0	2600,0±66,7	2153,3±20,0	2273,3±46,7	693,3±40,0