



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS SOCIAIS – DTCS -
CAMPUS III - JUAZEIRO
COLEGIADO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E
BIOTECNOLOGIA

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
LIPASE PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO
TEOR DE LIPÍDIOS

Discente: CAROLLINY SANDY MARIANO LIMA
Orientadora: GABRIELA MACÊDO ARETAKIS DE ALMEIDA

JUAZEIRO-BA
JULHO, 2024

CAROLLINY SANDY MARIANO LIMA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
LIPASE PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES COM
ALTO TEOR DE LIPÍDIOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia – UNEB Campus III, como requisito parcial para avaliação da disciplina de Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Macêdo Aretakis de Almeida.

JUAZEIRO-BA

JULHO, 2024

CAROLLINY SANDY MARIANO LIMA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE PARA
TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE LIPÍDIOS**

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelo Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Campus III, da Universidade do Estado da Bahia.

Aprovado em 04/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gabriela Macêdo Aretakis de Almeida (Presidente/Orientadora)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Profa. Dra. Lindete Míria Vieira Martins (Primeira examinadora)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Profa. Dra. Luana Pereira Gonçalves (Segunda examinadora)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

JUAZEIRO-BA

JULHO, 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Edileusa Teixeira, pelo apoio durante todos esses anos de faculdade e por compartilhar esse sonho comigo, mesmo apesar da distância e saudade. Agradeço também ao restante da minha família, meus irmãos e sobrinhos, por acreditarem e confiarem no meu potencial para a conclusão da minha graduação.

Ao meu amor, Rafaela Lima, por estar comigo nos piores e melhores momentos possíveis, sempre me ajudando e me dando forças para continuar meus sonhos. Além de virar noites em claro junto a mim, auxiliando como podia durante as execuções dos meus projetos, seja no laboratório ou em casa.

À minha orientadora, Gabriela Aretakis, por sempre me incentivar a ser uma boa profissional, mas além de tudo uma boa pessoa.

Por fim, agradeço a todos os meus colegas que contribuíram para meu crescimento e desenvolvimento durante essa etapa da minha vida.

RESUMO

Os lipídios resultantes dos processos industriais, além de interferirem no meio ambiente quando descartados incorretamente, podem ocasionar problemas e alto custo nos processos produtivos. Para alcançar os parâmetros legais adequados em relação a carga poluidora do efluente, se faz necessário a utilização de métodos de tratamentos, que são empregados na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE). Tendo em vista todos os fatores que influenciam na gestão de resíduos, na conservação ambiental e na eficiência da ETE, este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar bactérias produtoras de lipase a partir de efluentes provenientes da produção industrial de sorvetes para potencial uso no tratamento de efluentes com alto teor de lipídios. O experimento foi conduzido com amostras coletadas na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de uma indústria de produção de sorvetes. As características biológicas e físico-químicas do efluente foram fornecidas pela empresa parceira, sendo amostras da Entrada, Adensamento do lodo e Saída da ETE. A bioprospecção bacteriana foi realizada utilizando o método de diluição seriada com água salina e placas de Petri contendo meio TSA com Nistatina a 1%. O isolamento ocorreu em meio TSA e as cepas foram mantidas em estufa bacteriológica por 28 °C. Posteriormente, as bactérias foram reativadas e incubadas em meio de cultura On Bac em agitador shaker a 120 rpm. A atividade lipolítica foi testada utilizando um método baseado na formação de halos de atividade lipolítica em placas de Petri com meio específico contendo 2% de azeite (T1) ou gordura de palma (T2). Para análise, foram considerados o diâmetro médio do halo de degradação e de crescimento microbiano, calculando o Índice Enzimático (IE). Foram isoladas 14 cepas. Destas, apenas 5 seguiram para o teste enzimático e apresentaram o halo de degradação lipolítico. A cepa 2, se destacou por apresentar os maiores índices enzimáticos (IE) entre todas as cepas. Entretanto, todas as cepas isoladas apresentaram bons índices enzimáticos, até mesmo aquela com menor IE, demonstrando potencial para produção de lipases e utilização no tratamento de efluentes industriais gordurosos. Esses bons índices, também evidenciam que a natureza do resíduo e da gordura influencia diretamente no metabolismo para a produção de lipase. Assim, é interessante que posteriormente, seja feita a identificação das bactérias, quantificação da lipase e testagem das cepas no efluente com alto teor de lipídeos, para evidenciar o alto potencial industrial dos isolados que pode se estender para além do tratamento de efluentes gordurosos.

Palavras chaves: Legislação; Biodegradação; Hidrolíticas.

ABSTRACT

Lipids resulting from industrial processes, in addition to interfering with the environment when disposed of incorrectly, can cause problems and high costs in production processes. In order to achieve the appropriate legal parameters regarding the pollutant load of the effluent, it is necessary to use treatment methods, which are employed in the Effluent Treatment Plant (ETE). Considering all the factors that influence waste management, environmental conservation and the efficiency of the ETE, this study aimed to isolate and select lipase-producing bacteria from effluents from the industrial production of ice cream for potential use in the treatment of effluents with high lipid content. The experiment was conducted with samples collected at the Effluent Treatment Plant (ETE) of an ice cream production industry. The biological and physicochemical characteristics of the effluent were provided by the partner company, being samples from the ETE Inlet, Sludge Thickening and Outlet. Bacterial bioprospecting was performed using the serial dilution method with saline water and Petri dishes containing TSA medium with 1% Nystatin. Isolation occurred in TSA medium and the strains were kept in a bacteriological incubator at 28 °C. Subsequently, the bacteria were reactivated and incubated in On Bac culture medium in a shaker at 120 rpm. Lipolytic activity was tested using a method based on the formation of lipolytic activity halos in Petri dishes with specific medium containing 2% olive oil (T1) or palm fat (T2). For analysis, the average diameter of the degradation halo and microbial growth were considered, calculating the Enzymatic Index (IE). Fourteen strains were isolated. Of these, only 5 continued to the enzymatic test and presented the lipolytic degradation halo. Strain 2 stood out for presenting the highest enzymatic indices (IE) among all strains. However, all isolated strains presented good enzymatic indices, even the one with the lowest EI, demonstrating potential for lipase production and use in the treatment of fatty industrial effluents. These good indices also show that the nature of the residue and fat directly influence the metabolism for lipase production. Therefore, it is interesting that the bacteria be identified, lipase quantified and the strains tested in effluent with high lipid content later, to demonstrate the high industrial potential of the isolates that may extend beyond the treatment of fatty effluents.

Keywords: Legislation; Biodegradation; Hydrolytic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Produção de sorvete.....	9
2.2 Lípidios.....	10
2.3 Tratamento de resíduos industriais.....	11
2.3.1 Tratamento de efluentes industriais gordurosos.....	12
2.4 Microrganismos no tratamento de efluentes.....	15
2.4.1 Bactérias.....	16
2.5 Lipase.....	17
3 METODOLOGIA.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5 CONCLUSÃO.....	27
6 REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A Política Nacional de Recursos Hídricos, instituída pela Lei Federal nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997, informa deveres com relação ao despejo de efluentes provenientes das atividades antrópicas nos corpos hídricos (BRASIL, 1997). Com o aumento do número de leis e normas com critérios para o lançamento de efluentes, que visam minimizar danos ambientais, há crescente interesse de pesquisas direcionadas para o tratamento desses possíveis poluentes ambientais (Aguiar et al., 2005). Atualmente, os efluentes gerados pelas indústrias, precisam seguir parâmetros estabelecidos na Resolução 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe as diretrizes para seu lançamento em corpos de água, estabelecendo condições e padrões, sendo complementada pela Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.

Essas normas se fizeram necessárias, pois, com o avanço tecnológico e crescimento industrial, principalmente a partir das revoluções industriais, houve o aumento considerável de indústrias liberando os mais diversificados tipos de efluentes no ambiente (Jahan & Singh, 2023). As indústrias de sorvetes, por exemplo, desenvolvem produtos com composição variada, que geralmente possuem de 8 a 20% de gordura, de 8 a 15% de sólidos não gordurosos do leite, de 13 a 20% de açúcar e até 0,7% de emulsificante-estabilizante (Souza, 2010). Em decorrência dessa composição, com alto teor de lipídios, o efluente proveniente do processo produtivo do sorvete, se torna um fator preocupante quanto ao seu tratamento e formas de manejo (Naime & Garcia, 2005). Isso porque os lipídios são moléculas orgânicas de ácidos graxos e álcool, de cadeia longa, insolúveis em água (Lehninger & Nelson; Cox, 2002).

Os lipídios resultantes dos processos industriais, além de interferirem no meio ambiente quando descartados incorretamente, também podem ocasionar problemas e alto custo nos processos produtivos, pois, a lavagem dos equipamentos ao fim do trabalho requer grande volume de água e produtos para limpeza adequada (Adetunji et al., 2021). Quando efluentes como esses entram em contato com o meio ambiente, sem tratamento adequado, são responsáveis pela poluição e contaminação de áreas, gerando problemas como o aumento dos níveis de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio), fosfatos, gorduras, PH entre outros, estimulando a eutrofização dos corpos hídricos, que acarreta problemas graves à flora e fauna (Ilyas et al., 2018). Além disso, uma vez em contato com a natureza, a remediação se torna muito mais difícil pelas condições e interações ambientais, havendo até mesmo dispersão do agente poluidor (Azevedo, 2020).

Para alcançar os parâmetros adequados em relação a carga poluidora do efluente, se faz necessário a utilização de métodos de tratamentos, que são empregados na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) (Ma et al., 2019). Os efluentes gerados nos processos produtivos devem ser tratados por meio de processos físicos, químicos e/ou biológicos, tendo em vista que o funcionamento de uma ETE, além de não trazer incômodos relacionados a ruídos, odores ou impactos visuais (Crini & Lichtfouse, 2018). Com isso, é possível alcançar a eficiência na produção industrial e ao mesmo tempo, a conservação ambiental dos corpos receptores (Azevedo, 2020). Entretanto, sempre há a necessidade do melhoramento ou da criação de técnicas para facilitar a gestão de efluentes, pois a eficiência na ETE pode ser afetada pela dificuldade de tratar grandes quantidades de gordura (Crini & Lichtfouse, 2018).

Nesse sentido, técnicas biotecnológicas estão sendo desenvolvidas, principalmente para o isolamento, identificação e utilização de microrganismos que podem trazer benefícios como eficiência e baixo custo para estes processos de tratamento (Torquato, 2016). A diversidade de microrganismos existentes nas ETE's é um fator interessante, pois, dá a oportunidade de identificação de novas populações microbianas, com alto potencial de produção de enzimas lipolíticas para degradação ou redução das moléculas de gordura (Silva et al., 2016). Bactérias produtoras de lipases, enzimas responsáveis pela hidrólise de moléculas de triglicerídeos, podem ser utilizadas para reduzir o volume final do efluente tratado (Torquato, 2016). Essas enzimas possuem características importantes que auxiliam na quebra das moléculas de gordura, como sua alta especificidade, estabilidade em solventes orgânicos, suas condições ótimas estão entre 30 e 40 °C e não há a necessidade de cofatores para atividade enzimática (Javed et al., 2017). Tendo em vista todos os fatores que influenciam na gestão de resíduos, na conservação ambiental e na eficiência da ETE, este trabalho tem como objetivo isolar e selecionar bactérias produtoras de lipase a partir de efluentes provenientes da produção industrial de sorvetes para potencial uso no tratamento de efluentes com alto teor de lipídios.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de Sorvete

Atualmente, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) dispõe na portaria nº 379, de 26 de abril de 1999, a classificação dos gelados comestíveis, sendo eles os:

“(a) Sorvetes de massa ou cremosos - compostos basicamente de leite e derivados lácteos e/ou outras matérias primas alimentares, nos quais os teores

de gordura e/ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, contendo no mínimo 3% de gordura e 2,5% de proteínas, podendo ser adicionados outros ingredientes alimentares; b) Sorbets - são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares e que contêm uma pequena porção de proteína e gordura, as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, contendo no mínimo 1% de gordura e 1% de proteína; c) Sorbets - produto elaborado basicamente com polpa de fruta, sucos ou pedaços de frutas e açúcares; d) Picolés - são porções individuais de gelados comestíveis de várias composições, geralmente suportadas por uma haste, obtida por resfriamento até o congelamento da mistura homogênea ou não, de ingredientes alimentares, com ou sem batimento.”

No âmbito industrial, os sorvetes mais frequentemente comercializados, que geralmente são os de massa, cremosos e picolés, são produzidos a partir de uma calda que é uma emulsão estabilizada e pasteurizada, incorporada por meio do processo contínuo de congelamento, agitação e introdução de ar (Goff et al., 2013). Assim, nas condições de armazenamento durante a produção e comercialização do produto, a temperatura ideal para o condicionamento deve ser entre -18 °C e -12 °C (ANVISA, 2004).

Um dos principais ingredientes, utilizado nessa composição e importante para sua estrutura, além do leite e derivados lácteos, no qual estão presentes a maior parte das proteínas, é a gordura, que geralmente é de origem vegetal (Goff et al., 2013). O tipo, composição e ponto de fusão da gordura utilizada são muito importantes para as características organolépticas e estabilidade do sorvete (Hatipoglu & turkoglu, 2020). Entre as gorduras que podem ser utilizadas, além das gorduras presentes nos componentes lácteos, estão as gorduras hidrogenada, de palma, de coco, de cacau, algodão e colza (Marshall et al., 2003).

Durante a produção do sorvete, nota-se a necessidade de utilização de grandes quantidades de gordura, uma vez que irão influenciar em diversas características necessárias à melhoria de sua qualidade (Santos, 2020). No entanto, esse elevado teor de gordura utilizado em seu processo produtivo, geralmente resulta na necessidade de tratamentos eficientes para os efluentes gerados (Zubareva, 2019). Sendo assim, merecida atenção deve ser dada ao tratamento de efluentes provenientes de indústrias de sorvetes, para que haja enquadramento nos parâmetros legais e, não resultem em prejuízos ambientais (Zubareva, 2019).

2.2 Lipídios

Os lipídios são moléculas orgânicas, com uma ampla gama de estruturas químicas que apresentam algumas propriedades físico-químicas, que os fazem ser bastante característicos, como ser insolúvel em água e solúvel em solventes não polares, podendo ser ésteres, óleos, esteroides, clorofórmio e ceras (Lehninger, 2014; Botham & Mayes, 2012). Em suas funções biológicas, estão presentes em membranas biológicas, sendo cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas de proteínas entre diversas outras atribuições. (Lehninger, 2014).

Os lipídios podem ser encontrados em fontes animais e vegetais e, podem ser classificados de acordo com suas estruturas físicas, químicas e biológicas em: 1 - Lipídios simples (ésteres de ácidos graxos com vários álcoois), sendo subdividido ainda em a) Gorduras (ésteres de ácidos graxos com glicerol) e b) Ceras (ésteres de ácidos graxos com álcoois monohidroxilicos); 2 - Lipídios complexos (ésteres de ácidos, contendo outros grupos além do álcool e dos ácidos graxos), a) fosfolipídeos (contem ácidos graxos, um álcool e resíduo de ácido fosfórico, também pode possuir bases nitrogenadas e outros substitutos), b) Glicolipídios (possui um ácido graxo, esfingosina e carboidrato) e c) lipídios complexos (são lipídios como esfingolipídeos, e aminolipídeos, assim como as lipoproteínas); 3 - Precursores e derivados lipídios (ácidos graxos, glicerol e esteróis, aldeídos graxos e grupos cetônicos, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e hormônios) (Botham & Mayes, 2012).

Os ácidos graxos e seus derivados, possuem uma ampla gama contendo mais de 100 tipos de moléculas já registradas e identificadas (N. Gershfeld, 2020). Dentro das classificações, as gorduras e óleos vegetais e animais, são ácidos graxos que apresentam ésteres que podem se apresentar na forma esterificada, sendo eles os ácidos graxos livres, com cadeias longas de carbono e apolares (N. Gershfeld, 2020).

Por conta dessas características e propriedades, os lipídios podem ser utilizados em diversos segmentos industriais, como sendo o produto, parte da matéria prima ou um subproduto (Ferreira et al., 2019). Por consequência, como em todo processo produtivo, são gerados resíduos provenientes da produção e da limpeza de equipamentos, tendo em vista suas propriedades, o tratamento desses efluentes precisam ser eficientes na quebra das moléculas dos ácidos graxos (Liew et al., 2015).

2.3 Tratamento de resíduos industriais

O tratamento de resíduos industriais é um fator importante para a gestão ambiental, que visa minimizar os impactos negativos relacionados aos resíduos gerados durante o processo

industrial, que podem causar danos ambientais e a saúde humana (Cornelli, 2014). Para que esse tratamento seja adequado, são necessárias várias etapas que envolvem desde a geração, até a sua disposição final (Adetunji et al., 2021).

Dentre os diversos tipos de resíduos, como os sólidos, gasosos e líquidos, se demanda as mais variadas técnicas para gestão, que vão desde o despejo em aterros sanitários controlados, até a incineração, reciclagem, compostagem, filtros para captação de gases, manejo na estação de tratamento de efluentes etc. (CONAMA, 2011). E assim, para além da preocupação com a gestão ambiental, o tratamento adequado desses efluentes, também é necessário quando relacionado a eficiência da indústria e no enquadramento nas leis e normas que determinam padrões físicos, químicos e biológicos, visando o despejo de efluentes em corpos hídricos (Azevedo, 2020).

Grande parte dos efluentes gerados pelas indústrias carecem do tratamento para diminuição da carga poluidora e do seu volume (Kamali et al., 2019). Em fábricas de laticínios, sorvetes, abatedouros, entre outros, um dos grandes problemas é o elevado teor de ácidos graxos na composição dos efluentes, no qual carregam alto potencial destrutivo quando em contato com o meio ambiente (Feil et al., 2020). Para a hidrólise desse material, é vital o domínio de metodologias que podem ser por meio físico, químico e biológico (Ma et al., 2019).

2.3.1 Tratamento de efluentes industriais gordurosos

A crescente preocupação com a poluição ambiental, especialmente relacionada aos efluentes gordurosos e industriais, tem motivado a busca por métodos eficazes de tratamento (Adetunji et al., 2021).

A compreensão das características específicas dos efluentes gordurosos e industriais é essencial para a escolha adequada de métodos de tratamento. Aspectos como a presença de compostos orgânicos e a carga lipídica, são parâmetros importantes a serem acompanhados, tendo em vista que o tratamento deve ser eficaz o suficiente para sanar os parâmetros dispostos nas regulamentações (Cornelli, 2014). No Brasil, a Resolução CONAMA 430/2011, dispõe sobre os limites das propriedades do efluente que devem ser levadas em consideração, sendo elas características físicas e químicas, como do pH (Potencial hidrogeniônico), DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de oxigênio), quantidade de O&G (Óleos e Graxas).

Para se adequar às condicionantes legais, métodos convencionais, como aeração, sedimentação e filtração, têm sido amplamente utilizados no tratamento de efluentes industriais (Ghumra et al., 2021). Ao longo dos anos, houve também o aumento da utilização de agentes biológicos, de forma aeróbia e anaeróbia, auxiliando na degradação de compostos presentes no resíduo (Von Sperling, 1996). Cada um destes métodos pode ser utilizado nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) de cada indústria (Ma et al., 2019).

Nas ETE's das indústrias que produzem efluentes com elevados teores de gorduras, como as indústrias de fabricação de sorvetes, geralmente há um efluente de qualidade muito inferior aos padrões estabelecidos (Santos et al., 2022). Em alguns casos, como na presença de sólidos não dissolvidos, como dos sólidos pesados, gordura de origem animal etc., se faz necessário o uso do tratamento preliminar do efluente (Santos et al., 2022). Tendo em vista que, a remoção dos sólidos grosseiros é importante para que não haja danos aos equipamentos na ETE, tais como entupimento, em que geralmente são utilizados métodos de gradeamento e desarenador (caixa de areia e gordura) (Saraiva, 2009). Especificamente no contexto das indústrias de laticínios e sorvetes, onde há um alto teor de óleos e graxas devido aos compostos adicionados durante o processo produtivo, o tratamento preliminar é realizado por meio de peneiramento e sedimentação, constituindo um processo físico (Schmitt, 2011). Essas etapas são essenciais para garantir a eficácia do tratamento subsequente e para atender aos requisitos regulatórios de descarte de efluentes industriais (Schmitt, 2011).

Após a remoção desses sólidos grosseiros, a próxima etapa é do tratamento primário, no qual utiliza a junção dos tratamentos físico-químicos, para que haja a remoção dos sólidos em suspensão sedimentáveis e sólidos flutuantes, esses compostos fazem parte do lodo ativado ao final do processo (Silva, 2019). Assim, para evitar a má eficiência da próxima fase, o tratamento primário se faz obrigatório, sendo responsável pela retirada de partículas sólidas, coloides ou dispersões, também como líquidos imiscíveis (Renault, 2009). Ainda no tratamento primário, são empregados alguns produtos químicos que visam auxiliar na floculação e na flotação (Locks, 2018). Esses dois processos são essenciais, já que na floculação, existe a adição de coagulantes que buscam transformar as características químicas, atraindo partículas dispersas superficialmente negativas, já na flotação, há a formação de flocos por meio da agitação da água, em que pela existência das cargas elétricas positivas, acabam atraindo microrganismos, coloides negativos e impurezas, em que posteriormente, passam por um sistema de filtração (Nagano & Deon, 2014).

Ademais, são adicionados ácidos ou bases, com o intuito de ajustar o pH), além da cloração ou tratamento térmico para eliminação de microrganismos contaminantes, pois é um fator importante para caso haja interesse no reúso do efluente tratado ou da dispersão em corpos hídricos, evitando assim, contaminações ambientais (Almeida & Grossi, 2014).

Para a fase do tratamento secundário, serão utilizadas técnicas bioquímicas, fazendo uso de lagoas de estabilização, biodigestores, filtros biológicos e biorreatores, tudo isso com o intuito de diminuir cargas orgânicas que estão dissolvidas no efluente (Mendonça, 2017). O processamento desses efluentes nessa etapa é denominado de recirculação do lodo, que prevê a estimulação de microrganismos capazes de hidrolisar esses compostos orgânicos, que no caso das indústrias de laticínios e sorvetes, a maior parte é proveniente das moléculas de gordura (Bandeira, 2018; Silva, 2018;).

Os procedimentos de caráter biológico, podem ser tanto de origem aeróbia, quanto anaeróbia (com a presença ou não de oxigênio), em que no sistema aeróbio, é utilizado uma capacidade volumétrica baixa, em comparação com o sistema anaeróbio, isso porque há dificuldade na transferência do oxigênio no efluente (Von Sperling, 2015). O tratamento biológico, é realizado através de microrganismos que realizam processos bioquímicos com o intuito de remover ou reduzir a matéria orgânica do efluente (Von Sperling, 2015). O lodo acumulado em todas as etapas anteriores, é desidratado e disposto corretamente conforme as leis vigentes (Bandeira, 2018).

Por último, ainda há o tratamento terciário, em que na maioria das vezes não é utilizado nas indústrias de sorvetes, a não ser que haja precisão de um efluente de alta qualidade, pois esta é uma etapa que demanda técnicas complexas com o intuito de remover contaminantes específicos, que não puderam ser removidos nos tratamentos antecedentes, gerando um alto custo final (Locks, 2018). Para esta fase, é imprescindível ter conhecimento do grau de depuração do efluente, porque só assim poderão ser aplicados processos como adsorção por carvão ativado, osmose e eletrodialise (uso pressão e eletricidade), microfiltração por membranas e manipulação de polímeros para troca iônica (Almeida & Grossi, 2014).

O tratamento de efluentes é um processo essencial para minimizar os impactos ambientais decorrentes das atividades humanas, especialmente as industriais. Dentre as diversas abordagens utilizadas, destaca-se a relevância fundamental dos microrganismos no tratamento eficiente desses efluentes (Metcalf & Eddy, 2015). Microrganismos, incluindo bactérias, fungos

e protozoários, desempenham papéis cruciais em diferentes etapas dos sistemas de tratamento, contribuindo para a remoção de contaminantes e a depuração dos efluentes (Sant'anna, 2013).

2.4 Microrganismos no tratamento de efluentes

Os microrganismos são notáveis pela capacidade de degradar compostos orgânicos presentes nos efluentes industriais (Miguel et al., 2020). Bactérias aeróbias e anaeróbias são capazes de metabolizar uma ampla gama de substâncias, transformando-as em produtos mais simples e menos prejudiciais ao meio ambiente (Metcalf & Eddy, 2015). Esse processo biológico desempenha um papel vital na redução da carga orgânica nos efluentes (Miguel et al., 2020).

Microrganismos anaeróbios participam ativamente de processos de oxidação-redução, influenciando diretamente a remoção de contaminantes, como nitrogênio e compostos sulfurados (Ghattas et al., 2017). Essas reações bioquímicas são essenciais para a conversão de substâncias indesejadas em formas menos tóxicas ou para a completa mineralização (Ghattas et al., 2017).

O tratamento biológico, que inclui sistemas como lagoas de estabilização, reatores biológicos aeróbios e anaeróbios, direciona a atividade metabólica dos microrganismos para a remoção de poluentes (Li et al., 2020). A biota microbiana existente nesses ambientes proporciona um ambiente propício para a transformação eficiente de substâncias indesejadas. (Li et al., 2020).

Durante o processo de tratamento, os microrganismos sintetizam biomassa como parte de suas atividades metabólicas (Couto et al., 2020). Essa síntese não apenas contribui para a remoção de nutrientes dos efluentes, mas também pode ser explorada como uma fonte adicional de biomassa útil, como no caso da produção de biogás em sistemas anaeróbios (Li et al., 2020)

A diversidade e resiliência dos microrganismos permitem que os sistemas biológicos de tratamento se adaptem a variações nas características dos efluentes (Wackett, 2013). Essa capacidade de resistência a choques e flutuações ambientais contribui para a estabilidade operacional e eficácia a longo prazo dos processos biológicos (Braz et al., 2018).

Ao empregar microrganismos nos processos de tratamento, a abordagem biológica geralmente é mais sustentável e ecoeficiente em comparação com métodos puramente químicos (Torquato, 2016). A natureza autossustentável dos sistemas biológicos, alimentados pela

atividade microbiana, destaca a importância dos microrganismos na busca por práticas ambientalmente responsáveis (Kour et al., 2021).

2.4.1 Bactérias

As bactérias são seres procariontes, que podem possuir alta resistência quando presentes em ambientes e condições adversas, tendo em vista sua capacidade adaptativa e grande diversidade, no qual são capazes de viver de forma isolada ou agrupadas em colônias (Lv et al., 2019). Ao longo dos anos, com o avanço da biotecnologia e da manipulação do genoma, as bactérias se tornaram um objeto de estudo, além do uso para extração de enzimas hidrolíticas aplicadas na indústria, isso porque é um microrganismo de rápido crescimento e fácil adequação em diferentes meios nutritivos, além de amplas faixas de temperatura e pH (Sharma & Satyanarayana, 2015).

Geralmente, o pH ótimo para esses microrganismos se aproxima da neutralidade (pH 7), tendo em vista que o crescimento celular e a produção de enzimas ocorrem ao mesmo tempo e que, além disso, compartilham as mesmas temperaturas ideais, que são geralmente de 20-45 °C (Pham et al., 2021). Para atingir o pico máximo (geralmente na fase log tardia) de produção enzimática, pode levar um tempo de 12-96 horas, que irá depender das espécies e do meio de nutrição (Pham et al., 2021).

Desse modo, para além do pH e temperatura, outros fatores ambientais são importantes para o desenvolvimento bacteriano e desenvolvimento da atividade lipolítica, tais como a fonte de carbono contidas no substrato, sendo necessário a presença de ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerol, sais biliares, ésteres hidrolisáveis ou tweens para ativação da lipase (Pham et al., 2021).

De maneira geral, esses microrganismos são ferramentas fundamentais para a indústria, viabilizando o melhoramento e a criação de novos produtos e processos (Meena, Tiwari & Sharma, 2020). No qual, as bactérias são organismos importantes para o tratamento de efluentes oleosos, por sua expressiva produção de lipase, sendo que, dentre as fontes bacterianas conhecidas, as do gênero *Bacillus* apresentam grande potencial (Kiran et al., 2016; Shelatkar, 2016). Assim, algumas destas bactérias podem ser citadas, como a *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulant*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus*, (Kiran, 2016; Shelatkar, 2016). Outros gêneros e espécies também podem ser apontados como grandes produtores de lipase, sendo eles *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia multivorans*, *B. cepacia* e *Staphylococcus caseolyticus*, levando em conta que gêneros como *Pseudomonas*,

Burkholderia e Streptomyces, os quais foram os primeiros a serem estudados com essa finalidade (Thakur, 2012).

Frequentemente, as lipases bacterianas exibem um peso molecular que varia entre 11 e 176 kDa, e apresentam um pH ótimo neutro ou alcalino (Carvalho et al., 2003; Sharma, 2020). Apesar disso, elas demonstram estabilidade em uma ampla faixa de pH, que vai de 4 a 11. Geralmente, as lipases bacterianas têm uma temperatura ótima situada entre 30-60 °C (Sharma, 2020). Entretanto, existem lipases bacterianas com estabilidade em pontos extremos, seja em temperaturas muito abaixo de 30°C ou muito acima de 60°C (Sharma, 2020).

Dessa forma, essas propriedades advindas das bactérias, são facilmente relacionadas com o tratamento de efluentes gordurosos nas ETE's, pois, podem ser utilizadas na etapa do tratamento secundário, seja por meio da aplicação direta do microrganismo no meio ou a estimulação das condições ambientais no local, que irá auxiliar a população microbiana no desenvolvimento das atividades lipolíticas (Mendonça, 2017).

2.5 Lipase

Naturalmente, as enzimas lipolíticas podem ser produzidas por vegetais, animais e por populações microbianas (Javed et al., 2017). Grande parte desses microrganismos, são bactérias com ampla biodiversidade capazes de produzir essas enzimas (Javed et al., 2017).

Assim, as lipases fazem parte da classe de hidrolases (E.C. 3.1) e agem na interface água-óleo (E.C. 3.1.1), formando assim sua classificação (Liang et al., 2023). As enzimas recebem uma nomenclatura de acordo com sua classificação dada pelo NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), no qual se utiliza as iniciais E.C. (Enzyme commission), acompanhadas de até 4 números, que se referem a classe e subclasse da enzima (Martinelle et al., 1995).

Dentro dessas classificações, existe o fato de que para uma enzima lipase ser tida como verdadeira, ela precisa manifestar a proteína encarregada de cobrir o sítio ativo, denominada como “lid”, estando atrelada a atividade enzimática (Liang et al., 2023). O sítio ativo possui uma cadeia peptídica de natureza hidrofóbica, denominada de tampa, que atua na ativação interfacial, ou seja, veda o sítio ativo na ausência de substrato, mas quando há presença, se retira permitindo a catálise (Mendes et al., 2006; Sirisha et al., 2010).

As lipases (Triacilglicerol acil-hidrolase EC 3.1.1.3), realizam uma transformação bioquímica, catalisando a hidrólise total ou parcial dos triacilgliceróis (TAG), transformando-o

em diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (Melani et al., 2020). Isso está relacionado com a especificidade da atividade enzimática, que ocorre unicamente na interface óleo-água, atuando em cadeias com mais de 10 carbonos, além de não precisarem de cofatores (Carvalho, 2005).

Para além da hidrólise de triacilgliceróis, as lipases também são responsáveis por outras reações, sendo elas de esterificação, interesterificação, acidólise, alcóolise, aminólise e lactonização, essas reações se dão a partir de pequenas quantidades de água, suficientes para deslocar o equilíbrio termodinâmico, para a síntese (Melani et al., 2020).

Essas características, contribuem para que as enzimas sejam grandes ferramentas para o uso industrial, movimentando um mercado de milhões de dólares todos os anos, pois podem ser encontradas em indústrias alimentícias, tratamento de efluentes, farmacêuticas, oleoquímica, de celulose, polímeros sintéticos e detergentes (Sharma, 2011).

Na maioria das vezes, o tratamento de efluentes comuns com alta carga de óleos e graxas, é dificultado pela natureza dos compostos e, alguns estudos apontam que é necessário um pré-tratamento para degradar os lipídios, posteriormente sendo encaminhado para o tratamento convencional (Pintor et al., 2016).

As enzimas apresentam especificidade ao seu substrato, por isso, o seu uso na indústria vem aumentando a eficiência de diversos setores, diminuindo os problemas relacionados a danos ambientais, ao contrário do uso de produtos químicos nos tratamentos convencionais (Jegannathan et al., 2013; Zhang & Zheng, 2022). Do ponto de vista comercial, as bactérias fornecem grande parte da produção de lipase, tendo alguns gêneros como sendo os principais utilizados, sendo eles *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* (Chandra et al., 2020).

3. METODOLOGIA

COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras do resíduo foram coletadas em dois momentos distintos na Estação de Tratamento de Efluentes de uma indústria de sorvetes, localizada na cidade de Petrolina – PE, no Nordeste Brasileiro. As amostras foram mantidas a 4 °C para preservação. As caracterizações biológicas e físico-químicas do resíduo foram fornecidas pela empresa selecionada para esta pesquisa. O efluente foi coletado em 3 diferentes locais da Estação de Tratamento de Efluentes,

sendo estes a Entrada (Refere-se ao ponto de entrada onde os efluentes (águas residuais e gorduras) chegam à Estação de Tratamento de Efluentes.), Local de Adensamento do lodo (é uma etapa do tratamento onde o lodo (material sólido resultante do processo de tratamento) é decantado e espessado.) e Saída (refere-se ao ponto onde o efluente tratado deixa a Estação de Tratamento de Efluentes, geralmente após passar por várias etapas de tratamento para remover contaminantes e poluentes.), totalizando 6 amostras.

BIOPROSPECÇÃO DAS BACTÉRIAS

A bioprospecção e demais etapas laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana – LBM, localizado no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS - Campus III) da Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Juazeiro-BA.

Para a bioprospecção das bactérias a partir das amostras coletadas, primeiramente foi utilizado o método de diluição seriada com água salina 0,85%, no qual foi disposto 100ul de solução nas diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} em placas de petri contendo meio TSA (Tryptic Soy Agar) complementado de fungicida Nistatina a 1ml/L, para inibir o crescimento de fungos presentes no efluente. As placas foram incubadas por 48 horas em 28°C em estufa microbiológica. A diluição seriada foi realizada em triplicata. A diluição escolhida para isolamento foi 10^{-3} , levando em consideração a maior quantidade de cepas e melhor disposição das colônias na placa de petri.

O isolamento foi feito em meio TSA e em triplicata, pela técnica de esgotamento por estrias, para obtenção de colônias mais puras. As cepas foram mantidas a 28-30 °C em estufa bacteriológica por 48 horas. Após o crescimento, foram conservadas em glicerina a 50% em temperaturas abaixo de 0 °C.

ISOLADOS BACTERIANOS COM CAPACIDADE LIPOLÍTICA

As bactérias isoladas foram reativadas em meio TSA acrescido de Nistatina a 1%, pela técnica de estriamento. Todas as bactérias que permaneceram viáveis após o processo de reativação, foram incubadas em 100 ml de meio de cultura comercial On Bac, fornecido pela empresa BioGrowth, em Erlenmeyer e colocados em Shaker a 120 rpm de agitação, em 28 °C durante 48 horas, de acordo com a metodologia de Haba et al. (2000) e Mongogkolthanarukw e Dharmstithi (2002), com adaptações. A concentração foi ajustada para 10^{-7} , contabilizando a formação das colônias em 24 e 48 horas de incubação, para determinação das Unidades Formadoras de Colonias (UFC). A determinação de UFC foi realizada em triplicata para

verificar a viabilidade das cepas, sendo consideradas viáveis as que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

O UFC foi feito a partir do cálculo:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de colônias contadas}}{\text{Volume inoculado (ml)} \times \text{Fator de diluição}}$$

Após a contagem das colônias, foi feito a incubação de 100 ml em meio On Bac no shaker em 120 rpm por 48 horas, para que o crescimento fosse observado por meio de espectrofotômetro OD600, a partir da densidade das células no meio.

As cepas bacterianas isoladas viáveis, foram submetidas a tratamentos contendo meios de cultura acrescidos de Azeite de oliva (T1) ou Gordura de palma (T2) a 2%/1L. A escolha desses tratamentos, se baseou na indução e comparação dos halos de degradação pelas cepas isoladas diante de duas fontes de lipídios distintas, uma utilizada como padrão na literatura (Azeite de oliva) e a outra, na produção de sorvete da indústria onde foram coletadas as amostras.

As cepas isoladas viáveis seguiram para o teste enzimático de atividade lipolítica, de acordo com a metodologia de proposta por Sierra (1956) com modificações. No qual, foram feitas soluções em meio comercial On Bac, contendo as cepas isoladas, inoculadas por 48h em shaker a 120 rpm. Em seguida, foram pipetados 10ul em *spots* em cada um dos 3 discos de papel estéreis de mesmo diâmetro, dispostos nas placas de petri contendo meio específico composto de 2% de gordura (Azeite de oliva ou a Gordura de Palma) utilizada para estimular a produção de lipase, peptona 10.0 g, NaCl 5.0 g, CaCl.H₂O 0.1 g e 2% de TWEEN 80, para a proporção de 1L água destilada. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 48h e analisadas a cada 12 horas, as placas positivas para produção de lipase formaram um halo de precipitação da reação entre a atividade lipolítica com o cloreto de potássio, indicando o halo de degradação. Para análise, foi utilizado um transluminador UV, para auxiliar na visualização do halo e um paquímetro para medição do diâmetro do halo de degradação precipitado. Para seleção das cepas com potencial de produção de lipase, foram avaliadas a presença e diâmetro do halo. O experimento foi realizado em triplicata.

Para determinação da atividade enzimática, foi realizado o método proposto por Hankin e Anagnostakis, (1975) que relaciona o diâmetro médio do halo de degradação e diâmetro médio da colônia, que resultará na expressão do Índice Enzimático (IE), seguindo a equação:

$$IE = DH / DCM$$

Onde:

DH= Diâmetro Médio do Halo de Degradação

DCM= Diâmetro Médio de Crescimento Microbiano

A análise dos dados foi feita utilizando o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com o teste ANOVA e teste tukey 5% de significância, no software AgroEstat. A análise estatística teve como objetivo a verificação da significância e a comparação das médias de ambos os tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

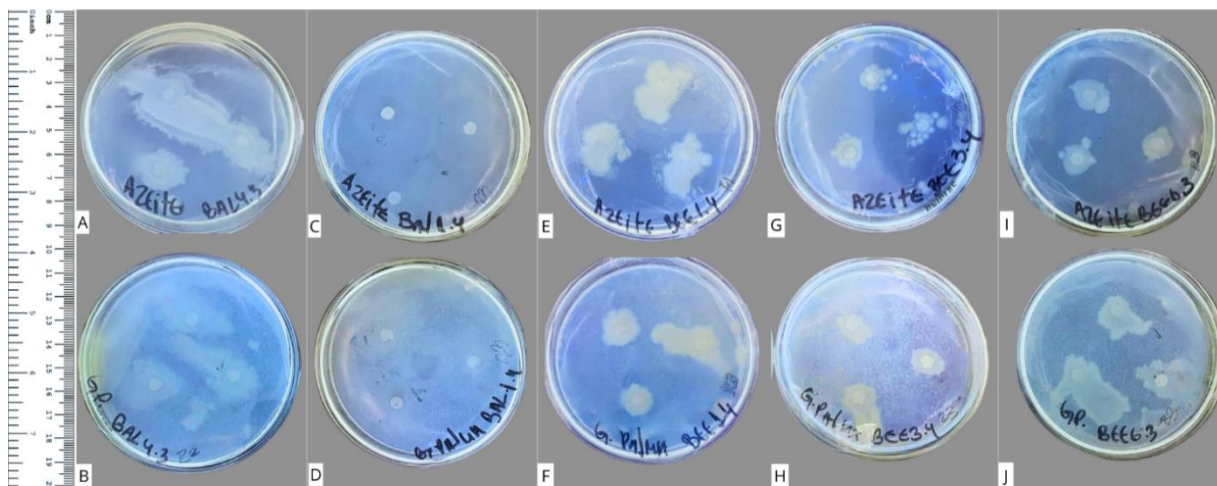
Foram testadas três diluições (10^{-3} ; 10^{-5} e 10^{-7}) para a bioprospecção das bactérias, a melhor diluição foi a que correspondeu a 10^{-3} , na qual foi possível obter a maior e melhor dispersão das bactérias no meio.

Na primeira coleta do efluente na ETE, foram isoladas 8 bactérias no total, sendo 4 cepas da entrada do efluente, 2 cepas do adensamento do lodo e outras 2 cepas da saída do efluente. Já na segunda coleta, foram isoladas 7 bactérias, sendo 3 cepas da entrada do efluente, 1 no adensamento do lodo e 3 na saída do efluente. Totalizando 14 cepas isoladas, as quais após etapas de conservação, armazenamento, reativação e contagem de UFC, apenas 5 bactérias permaneceram viáveis para prosseguir com o experimento. Destas bactérias viáveis, 3 cepas isoladas foram da entrada do efluente, e 2 cepas do adensamento do lodo.

ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LIPASE

As 5 cepas apresentaram halo de degradação lipolítico precipitado pelo cloreto de potássio para os dois tratamentos utilizados (Figura 1).

Figura 1: Teste lipolítico com bactérias isoladas de efluentes da indústria de sorvetes utilizando diferentes fontes lipídicas. Tratamentos com adição de azeite: A, Cepa 1; C, Cepa 2; E, Cepa 3; G, Cepa 4; I, Cepa 5; Tratamentos com adição de gordura de palma: B, Cepa 1; D, Cepa 2; F, Cepa 3; H, Cepa 4; J, Cepa 5. Símbolo: traço localizado na margem esquerda da figura representando escala de 20 centímetros.



Fonte: Autora, 2024.

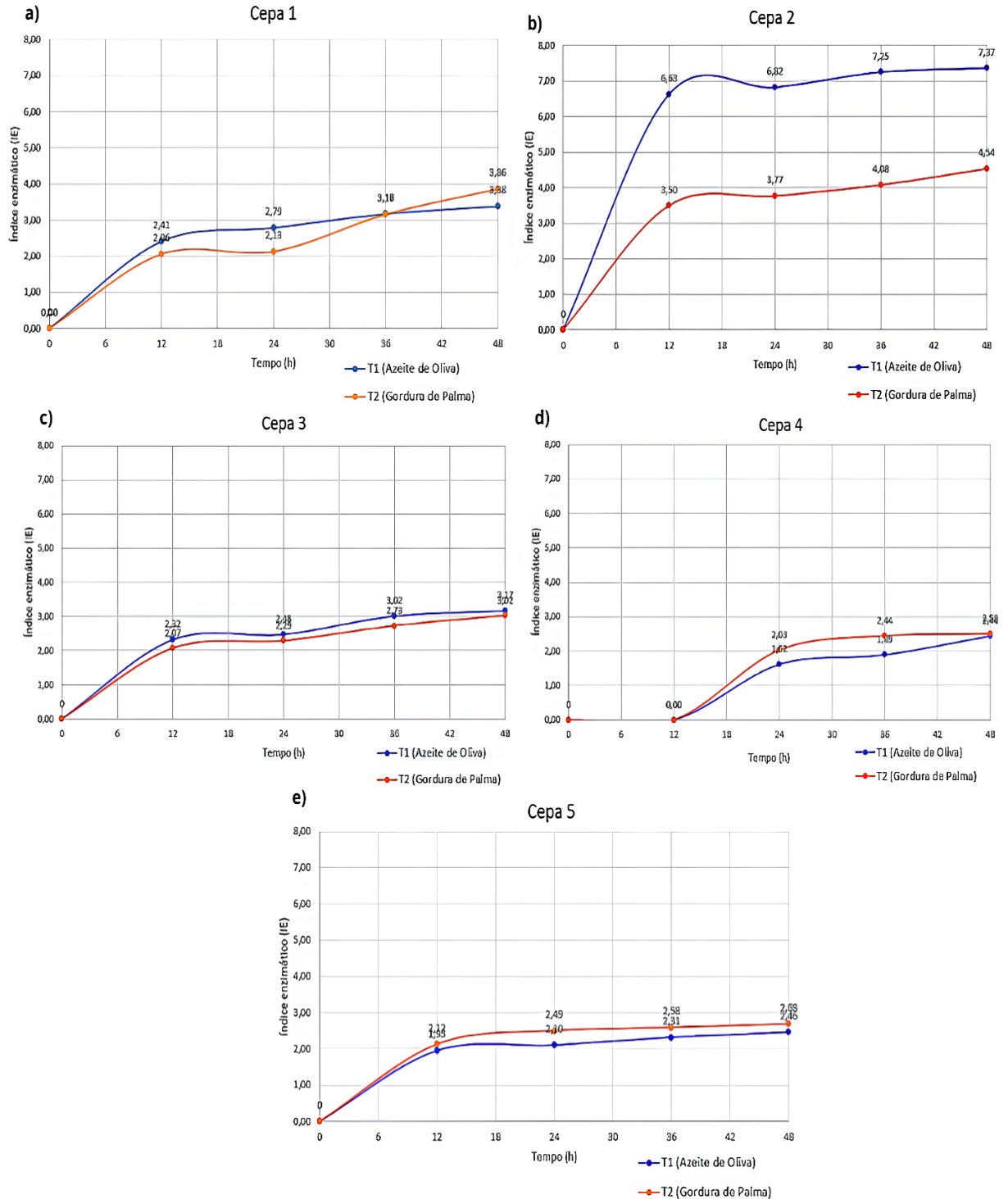
Nas Figuras 1A e 1B, que correspondem a Cepa 1, ficou evidente a formação dos halos em ambos os tratamentos, havendo poucas diferenças visuais. Já para as Figuras 1C e 1D, da Cepa 2 evidenciam aspectos de comportamento em ambos tratamentos bem diferentes dos outros isolados, em que é possível visualizar halos translúcidos e consideravelmente maiores que os demais. Nas Figuras 1E e 1F da Cepa 3, os halos formados apresentaram características de coloração mais esbranquiçadas. A Cepa 4 obteve o menor crescimento do halo de degradação entre todos os isolados nos dois tratamentos (Figura 1G e 1H). Por fim, as Figuras 1I e 1J da Cepa 5, demonstram um maior crescimento no tratamento da gordura de palma, em comparação ao tratamento com o meio composto com azeite, evidenciado na Tabela 1, Figura 2 e Figura 3.

Tabela 1: Médias estatísticas das cepas isoladas de amostras coletadas na Estação de Tratamento de Efluentes, as quais foram comparadas se houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo o Tratamento 1 (T1) Azeite de Oliva e o Tratamento 2 (T2) Gordura de Palma.

CEPAS ISOLADAS	AMOSTRA DO ISOLAMENTO	MÉDIAS ESTATÍSTICAS	
		T1 – AZEITE DE OLIVA	T2 – GORDURA DE PALMA
CEPA 1	Adensamento do lodo	3,3833333 b	3,8633333 a
CEPA 2	Adensamento do lodo	7,3666667 a	4,5400000 b
CEPA 3	Entrada	3,1733333 a	3,0233333 a
CEPA 4	Entrada	2,0833333 a	2,5033333 a
CEPA 5	Entrada	2,4566667 a	2,6766667 a

Fonte: Autora, 2024.

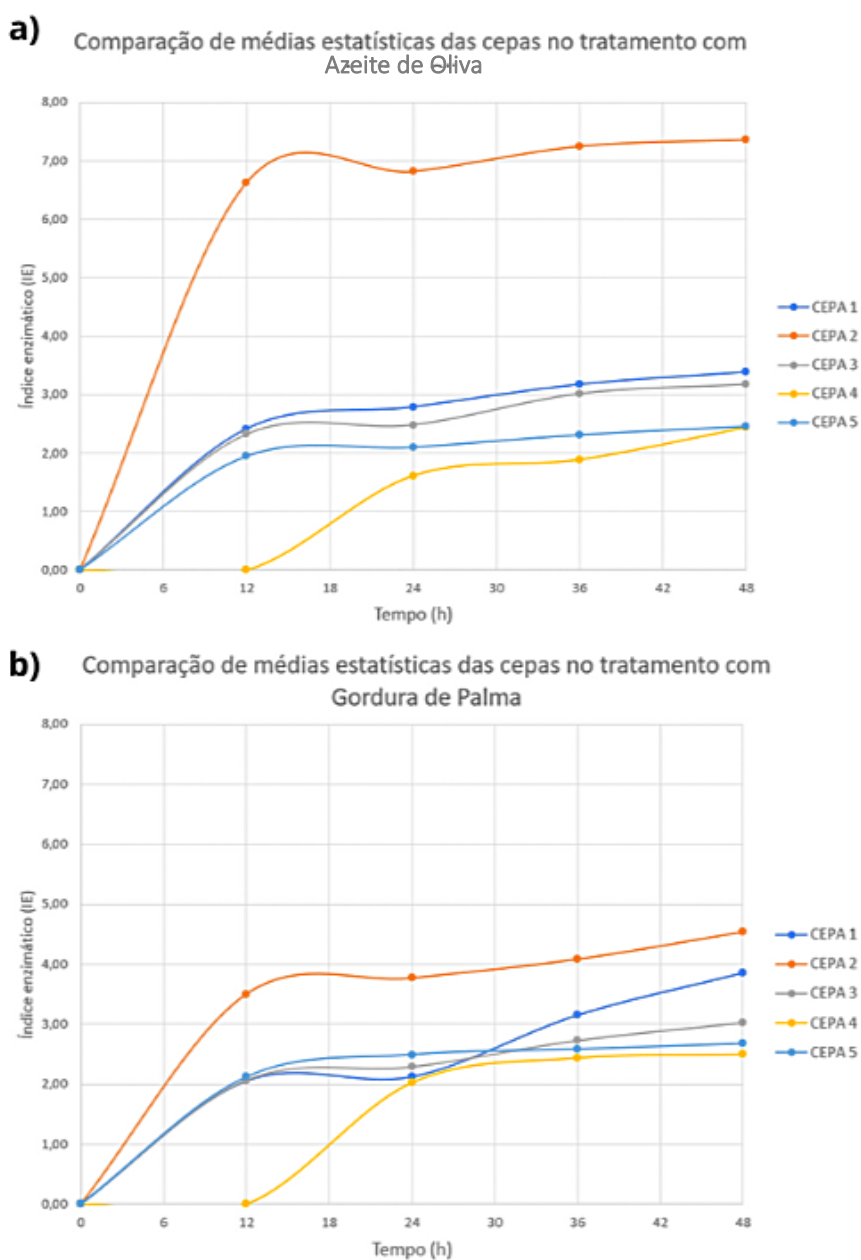
Figura 2: Gráficos correspondentes aos isolados bacterianos obtidos do efluente da indústria de sorvetes, mostrando as linhas de crescimento do índice enzimático da atividade lipolítica em 12, 24, 36 e 48 horas. Legenda: (a) Gráfico de índice enzimático da Cepa 1; (b) Gráfico de índice enzimático da Cepa 2; (c) Gráfico de índice enzimático da Cepa 3; (d) Gráfico de índice enzimático da Cepa 4; (e) Gráfico de índice enzimático da Cepa 5. Símbolo: h entre parênteses representando as horas.



Fonte: Autora, 2024.

No estudo das diferentes cepas, observamos variações específicas nos índices enzimáticos ao longo do tempo e em resposta aos diferentes tratamentos com gorduras (Tabela 1; Figura 2; Figura 3).

Figura 3: Gráficos de comparação de médias do índice enzimático entre cada cepa, dentro do mesmo tratamento (Azeite de oliva ou Gordura de palma). a), Gráfico com a comparação de médias de cada cepa no azeite de oliva; b), Gráfico de comparação de médias de cada cepa na Gordura de palma. Símbolo: h entre parênteses representando as horas.



Fonte: Autora, 2024.

Inicialmente, a Cepa 1 (Figura 2a; Figura 3a), no T1, registrou índices de 2,41, 2,79, 3,18 e 3,38 nas primeiras 12, 24, 36 e 48 horas, respectivamente. No entanto, no T2, os valores foram 2,05, 2,13, 3,18 e 3,86 nas mesmas horas, com destaque após as 24 horas, podendo indicar a necessidade de um possível tempo de adaptação da bactéria ao meio de cultura (Tabela 1; Figura 2; Figura 3).

Os gráficos das Figuras 2b e Figura 3, podemos observar a Cepa 2, que se destaca por apresentar os maiores índices enzimáticos (IE) entre as cepas. No tratamento T1, foram registrados valores de 6,63, 6,82, 7,25 e 7,37 para as horas de 12, 24, 36 e 48, respectivamente. Esses números indicam uma atividade enzimática significativa. No entanto, no tratamento T2, embora os valores iniciais sejam menores em comparação com o T1, ainda assim observa-se uma progressão notável. Inicialmente, o IE foi de 3,50 nas primeiras 12 horas, subindo para 3,77 em 24 horas e para 4,08 em 36 horas. Ao final das 48 horas, o IE atingiu 4,54, mostrando um aumento gradual ao longo do período.

No gráfico das Figura 2c e Figura 3, referente à Cepa 3, é notável que o tratamento com azeite resultou em maior índice enzimático ao longo de todo o período de observação. Inicialmente, às 12 horas, o IE foi registrado em 2,32, aumentando para 2,48 às 24 horas e para 3,02 às 36 horas. Ao final do experimento, nas 48 horas, o índice enzimático atingiu o valor de 3,17, demonstrando uma tendência crescente.

Já no gráfico da Figura 2d e Figura 3, que representa a Cepa 4, observa-se que não existe índice enzimático registrado em ambos os tratamentos durante as primeiras 12 horas. Após esse período, às 24 horas, no tratamento T1, foi calculado o menor índice entre as cepas, com o valor de 1,62. Às 36 horas, o índice aumentou para 1,89 e, ao final das 48 horas, alcançou o valor de 2,44. No tratamento T2, o índice enzimático foi de 2,03 às 24 horas, aumentando para 2,44 às 36 horas e para 2,50 às 48 horas. Esses resultados sugerem uma variação na atividade enzimática diferente de todos os outros cepas.

A Cepa 5 (Figura 2e; Figura 3) destacou-se pelos melhores índices enzimáticos no tratamento com gordura de palma. No tratamento T1, o índice enzimático foi de 1,95 às 12 horas, aumentando para 2,10 às 24 horas e para 2,31 às 36 horas. Ao final das 48 horas, o índice atingiu 2,46. Por outro lado, no tratamento T2, os valores iniciais já foram superiores, registrando 2,12 às 12 horas. Em seguida, o índice aumentou para 2,49 às 24 horas, para 2,58 às 36 horas e para 2,68 às 48 horas. Esses resultados sugerem uma resposta ainda mais favorável

ao tratamento com gordura de palma, com uma tendência de aumento contínuo na atividade enzimática ao longo do tempo.

A Cepa 2 (Figura 2f; Figura 3) apresentou os maiores valores para o índice enzimático em relação aos outros isolados, principalmente no tratamento do azeite, que indicou um halo de degradação enzimático com características morfológicas bem diferentes dos outros e, o qual a precipitação do cloreto de potássio ocorreu quase que de forma translúcida em todas as repetições e tratamentos. Assim como os demais valores, os resultados demonstraram crescimento significativo dos índices enzimáticos, quando comparado a outros trabalhos na literatura de isolamento de bactérias em meios gordurosos. No trabalho descrito por Silva et al., (2016), seu maior IE foi 2,37, assim como na pesquisa de Lima et al., (2019), que foi obtido o valor de 2,21, ambas pesquisas se tratavam de testes lipolíticos semelhantes ao deste trabalho. Porém, ainda seria necessário a quantificação da lipase para confirmação dessa alta taxa de produção.

Assim, de acordo com Mendes, Pereira e Castro et al., (2006), a concentração de lipídeos no efluente da indústria de laticínios, que inclui a produção de sorvete, é em média 4.680 mg/L, muito superior, à por exemplo, o processamento do coco 179 mg/L visando a obtenção de produtos (óleos). Fatores como esse, de alta concentração de ácidos graxos, também pode influenciar na forma que esses microrganismos irão desenvolver o seu metabolismo, já que se torna um meio mais seletivo a determinados tipos de bactérias, além disso, é possível existir diferentes enzimas lipases verdadeiras, que podem ser mais ou menos eficientes a depender do meio (Verma & Kanwar, 2008).

Com a utilização das duas gorduras distintas para esse teste lipolítico, foi demonstrado que as cepas nos dois tratamentos, atuaram na produção de lipase, entretanto, houve diferença quanto ao IE e tempo para produção, indicando a necessidade de adaptação de algumas bactérias ao meio (Lv et al., 2019). Ter conhecimento disso, pode auxiliar até mesmo na escolha do indutor lipolítico para extração enzimática, visando a obtenção de um maior rendimento em menos tempo (Hadeboll, 1991; Obradors et al., 1993; Montesino et al., 1996; Dominguez et al., 2003). Isso porque, esses são fatores importantes para as indústrias, pois irá impactar diretamente na eficiência dos processos produtivos e no tratamento de efluente (Furini et al., 2018). Assim, tendo em vista os resultados otimistas em relação aos Índices Enzimáticos, é possível considerar tanto a aplicação dessas bactérias, quanto a extração da lipase para aplicação nos processos hidrolíticos, pois com a formação do halo evidenciou não só a alta produção,

como a capacidade das bactérias de produzirem enzimas lipolíticas extracelulares (Bharathi & Rajalakshmi, 2019).

Outro ponto importante é que o efluente bioprospectado contém também resíduos das lavagens e limpeza dos equipamentos e dependências da empresa, contendo produtos químicos, responsáveis por transformar o meio em um ambiente mais hostil para diferentes microrganismos (Lv et al., 2019). Porém, as lipases possuem uma ampla faixa de temperatura e pH, que irá depender do microrganismo responsável por produzi-las (Ferreira, 2015). Quando uma bactéria consegue desenvolver atividades metabólicas, mesmo em condições desfavoráveis e hostis, é possível identificar certa resistência e adaptação desse microrganismo ao meio, sendo ele estimulado ou adicionado ao tratamento, na Estação de Tratamento de Efluentes (Carvalho, 2005). Melhorar essas condições do local, pode fazer com que o halo de degradação da atividade lipolítica seja ainda mais eficiente, como foi descrito por Mendes e colaboradores, (2005) que a disponibilidade de nutrientes e a conversão de produtos intermediários, podem influenciar diretamente no metabolismo da bactéria no tratamento de um efluente.

Além disso, a diversidade de bactérias geralmente encontradas nesses locais e com grande capacidade hidrolíticas, é ampla e com muitos gêneros frequentemente estudados, o qual podemos citar do gênero *Bacillus* as espécies *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulant*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus*, além de outros que podem ser mencionados como *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia multivorans*, *B. cepacia* e *Staphylococcus caseolyticus* (Kiran, 2016; Shelatkar, 2016; Thakur, 2012). Isso possibilita uma maior variabilidade de bactérias produtoras de lipase, com diferentes metabolismos e adaptações, o que justifica os diferentes comportamentos das cepas isoladas quanto ao IE e tempo para início da hidrólise, o que nos dá indícios de diferentes espécies isoladas, também levando em consideração aspectos morfológicos de coloração, formato e textura (Wackett, 2013).

5. CONCLUSÃO

Discussões e pesquisas na área de tratamento de efluentes, são de grande relevância para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a diminuição da carga poluidora, objetivando a diminuição dos impactos ambientais, além de mais fluidez nas atividades produtivas da

indústria. Principalmente com a utilização de microrganismos capazes de metabolizar substancias tóxicas que podem causar danos severos a cadeia trófica.

Todas as cepas isoladas apresentaram bons índices enzimáticos, até mesmo aquela com menor IE, demonstrando potencial para produção de lipases e utilização no tratamento de efluentes industriais gordurosos. Esses bons índices, também evidenciam que a natureza do resíduo e da gordura influencia diretamente no metabolismo para a produção de lipase.

Dessa forma, é interessante que, posteriormente, seja feita a identificação das bactérias, quantificação da lipase e testagem das cepas no efluente com alto teor de lipídeos, para evidenciar o alto potencial industrial desses dos isolados, que pode se estender para além do tratamento de efluentes gordurosos.

6. REFERÊNCIAS

Ácidos, F. ácidos graxos. *Catálise de A a Z*. 2020.

<https://doi.org/10.1002/047120918x.emb0524>.

ADETUNJI, A., & OLANIRAN, A. Tratamento de águas residuais oleosas industriais por tecnologias avançadas: uma revisão. *Applied Water Science*, 11, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s13201-021-01430-4>.

ALMEIDA, E. J. M.; GROSSI, L. J.; Estudo do processo de tratamento de água da indústria de laticínio. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Engenharia química),

Universidade Federal de Alfenas, Poço de caldas, MG, 2014.

AZEVEDO, Paulo Gabriel Ferreira de; OLIVEIRA, Débora Carvalho da Silva;

CAVALCANTI, Luiz Antonio Pimentel. Processos físicos e químicos para o tratamento de efluentes: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e**

Sustentabilidade, v. 7, n. 17, p. 1667-1678, 2020.

BANDEIRA, Aline Alves; ESQUERRE, Karla Rodríguez; BORGES, Roxana Brasileiro. A regulamentação sobre o tratamento e a disposição final de efluentes industriais: avaliação do gerenciamento de efluentes no Polo Industrial de Camaçari, estado da Bahia. **Revista Direito Ambiental e sociedade**, v. 8, n. 2, p. 121-148, 2018.

BHARATHI, D., & RAJALAKSHMI, G. Lipases microbianas: Uma visão geral da triagem, produção e purificação. **Biocatálise e biotecnologia agrícola**. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>.

BOSSOLAN, N. R. S. **Introdução a Microbiologia**. Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos – Licenciatura em Ciências Exatas. Capítulo 3, p. 28-38, 2002.

BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Metabolism of acylglycerols. **Harper's Illustrated Biochemistry 29th ed. Murray, RK; Bender, DA**, p. 229-236, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 379, de 26 de abril de 1999. **Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 29 abr. 1999. Disponível em: [http:// www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br). Acesso em: 25 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n. 266, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 23 set. 2005. Seção 1. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18825&word=> Acesso em: 25 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n. 266, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 23 set. 2005. Seção 1. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18825&word=> Acesso em: 25 jan. 2024.

BRAZ, G., FERNANDEZ-GONZALEZ, N., LEMA, J., & CARBALLA, M. A resposta temporal do microbioma da digestão anaeróbica durante um choque de taxa de carga orgânica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 10285 - 10297. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9383-9>.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26(1), 75-80.

COUTO, E., CALIJURI, M., & ASSEMANY, P. (2020). Produção de biomassa em lagoas de alta taxa e liquefação hidrotérmica: Tratamento de águas residuais e integração de bioenergia. *The Science of the total environment*, 724, 138104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138104>.

CRINI, G., & LICHTFOUSE, E. Vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas para tratamento de águas residuais. *Environmental Chemistry Letters*, 17, 145-155. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0785-9>.

DA SILVA, Mayana Barreto et al. Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. *Scientia Plena*, v. 12, n. 5, 2016.

DE LIMA CAMPOS, Lara; DE OLIVEIRA, João Carlos Maia Dornelas. **Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse industrial a partir de amostras de compostagem**. 2019.

Disponível em <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/CONAMA/RE0430-130511.PDF>. Acesso em 22 de jan. 2024.

Disponível em: <<http://www.uezo.rj.gov.br/ojs/index.php/ast/article/view/125>>. Acesso em: 28 nov. 2023. doi: <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v4i1.125>.

Disponível em:

https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_35_7_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcdaltrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Acesso em: 22 de janeiro de 2024.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1225-1229, 2003.

DOS SANTOS, Natalia; DA SILVA, Laís Hernandes; DOS SANTOS, Alana Melo.

Tratamento de efluentes líquidos na indústria de laticínios: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 3, p. 168-176, 2022.

FEIL, A., SCHREIBER, D., HAETINGER, C., HABERKAMP, Â., KIST, J., REMPEL, C., MAEHLER, A., GOMES, M., & SILVA, G. Sustentabilidade na indústria de laticínios: uma revisão sistemática da literatura. **Environmental Science and Pollution Research**, 27, 33527 - 33542. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09316-9>.

FERREIRA, Camila Míryan de Oliveira. Isolamento e seleção de bactérias lipolíticas provenientes de água residual de abatedouro. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Produção Animal, **Universidade Federal Rural do Semi-Árido**, Mossoró, 2015.

FURINI, G., BERGER, J., CAMPOS, J., SAND, S., & GERMANI, J. Produção de enzimas lipolíticas por bactérias isoladas de sistemas de tratamento de efluentes biológicos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 90 3, 2955-2965. 2018. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170952>.

GARRIDO, J. V. M. L., BISPO, D. F., & SILVA, C. F. (2018). Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase e otimização da produção enzimática. **Scientia Plena**, 14(6). <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2018.064207>

GHATTAS, A., FISCHER, F., WICK, A., & TERNES, T. Biodegradação anaeróbica de contaminantes orgânicos (emergentes) no ambiente aquático. **Pesquisa sobre água**, 116, 268-295. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.001>.

GHUMRA, D., AGARKOTI, C., & GOGATE, P. Melhorias em tecnologias de tratamento de efluentes em Estações de Tratamento de Efluentes Comuns (CETPs): Revisão e avanços recentes. **Process Safety and Environmental Protection**, 147, 1018-1051. 2021.

<https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2021.01.021>.

GOFF, H., & HARTEL, R. **Sobremesas lácteas congeladas.**, 249-260. 2013.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6096-18>.

GONÇALVES, F. A. G. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – **Universidade Federal de Minas Gerais**, Minas Gerais, 2007.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, v. 11, p. 159-167, 1991.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, SL Uso de meios sólidos para detecção de produção de enzimas por fungos. **Micologia** 67:597-607. 1975.

HATİPOĞLU, A., & TÜRKOĞLU, H. Uma pesquisa sobre as características de qualidade do sorvete produzido usando alguns substitutos de gordura. **Journal of Food Science and Engineering**, 2020. 10. <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2020.01.001>.

HÖLKER, U; HÖFER, M; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 175- 186, 2004.

ILYAS, M., AHMAD, W., KHAN, H., YOUSAF, S., KHAN, K., & NAZIR, S. Resíduos plásticos como uma ameaça significativa ao meio ambiente – uma revisão sistemática da literatura. **Revisões sobre Saúde Ambiental**, 33, 383 - 406. 2018.

<https://doi.org/10.1515/reveh-2017-0035>.

JAVED, S., AZEEM, F., HUSSAIN, S., RASUL, I., SIDDIQUE, M., RIAZ, M., AFZAL, M., KOUSER, A., & NADEEM, H. Lipases bacterianas: Uma revisão sobre purificação e caracterização. **Progresso em biofísica e biologia molecular**, 132, 23-34. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.

JAVED, S., AZEEM, F., HUSSAIN, S., RASUL, I., SIDDIQUE, M., RIAZ, M., AFZAL, M., KOUSER, A., & NADEEM, H. Lipases bacterianas: Uma revisão sobre purificação e caracterização. **Progresso em biofísica e biologia molecular**, 132, 23-34. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.

- Jegannathan, K., & Nielsen, P. (2013). Avaliação ambiental do uso de enzimas na produção industrial – uma revisão de literatura. **Journal of Cleaner Production**, 42, 228-240. 2013. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2012.11.005>.
- KAMALI, M., SUHAS, D., COSTA, M., CAPELA, I., & AMINABHAVI, T. Considerações de sustentabilidade em tecnologias baseadas em membranas para tratamento de efluentes industriais. **Chemical Engineering Journal**. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2019.02.075>
- KIRAN, S., ARSHAD, Z., NOSHEEN, S., KAMAL, S., GULZAR, T., MAJEED, M. S., RAFIQUE, M. A. Microbial Lipases: Production and Applications: A Review. **Journal of Biochemistry Biotechnology and Biomaterials**, 1(2), 7-20. 2016.
- KOUR, D., KAUR, T., DEVI, R., YADAV, A., SINGH, M., JOSHI, D., SINGH, J., SUYAL, D., KUMAR, A., RAJPUT, V., YADAV, A., SINGH, K., SINGH, J., SAYYED, R., ARORA, N., & SAXENA, A. Microbiomas benéficos para biorremediação de diversos ambientes contaminados para sustentabilidade ambiental: status atual e desafios futuros. **Environmental Science and Pollution Research**, 28, 24917 - 24939. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13252-7>.
- KULKARNI, N.; GADRE, R.V. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. **Journal of Industrial Food Microbiology**, v.28, p.344- 348, 2002.
- LEHNINGER, A. L. CHAIRMAN'S REMARKS. In: **Horizons of Bioenergetics: Proceedings of a Symposium held at Bloomington, Indiana October 12-15, 1970**. Academic Press, 2014. p. 3.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LI, Z., YU, E., ZHANG, K., GONG, W., XIA, Y., TIAN, J., WANG, G., & XIE, J. Efeito do tratamento de água, estrutura da comunidade microbiana e características metabólicas em um sistema de tratamento de águas residuais de aquicultura em escala de campo. **Frontiers in Microbiology**, 11. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00930>.
- LIANG, K., DONG, W., GAO, J., LIU, Z., ZHOU, R., SHU, Z., & DUAN, M. As transições conformacionais e a dinâmica da lipase de *Burkholderia cepacia* reguladas por interfaces água-óleo. **Journal of chemical information and modeling**. 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00194>.

LIEW, W., KASSIM, M., MUDA, K., LOH, S., & AFFAM, A. Métodos convencionais e tecnologias emergentes de polimento de águas residuais para tratamento de efluentes de moinhos de óleo de palma: uma revisão. *Journal of environmental management*, 149, 222-35. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.10.016>.

LOCKS, M. C. Eletrocoagulação-flotação aplicada ao tratamento de águas residuais da indústria de laticínios. 2018. Tese (Bacharelado em Química Industrial), **Universidade do Sul de Santa Catarina**, Tubarão - SC, 2018.

LV, Z., ZHOU, J., ZHANG, Y., ZHOU, X., XU, N., XIN, F., MA, J., JIANG, M., & DONG, W. (2019). Técnicas para aumentar a tolerância de micróbios industriais a estresses abióticos: Uma revisão. *Biotecnologia e Bioquímica Aplicada*, 67. <https://doi.org/10.1002/bab.1794>.

MA, X., WANG, Y., DONG, K., WANG, X., ZHENG, K., HAO, L., & NGO, H. A tratabilidade de poluentes orgânicos vestigiais em efluentes de ETE e a redução da biotoxicidade associada por processos avançados de tratamento para melhoria da qualidade do efluente. *Pesquisa sobre água*, 159, 423-433, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.011>.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 6, p.1258:1272, 1995.

MARTINS, Pedro Alves. Lipases microbianas: prospecção, produção e aplicação. 2021. 228 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana) —**Universidade de Brasília**, Brasília, 2021.

MEENA, S., TIWARI, R., & SHARMA, A. (2020). Isolation and Characterization of Soil Bacteria from Industrial Site, Curr. Rese. *Agri. Far.* 1(2), 8-11. doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2582-7146.116>

MELANI, N., TAMBOURGI, E., & SILVEIRA, E. Lipases: Da Produção às Aplicações. *Separation & Purification Reviews*, 49, 143 - 158. 2020. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>.

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

MENDONÇA, H. V.; RIBEIRO, C. B. M.; NOGUEIRA, K. C. C. Remoção de matéria orgânica e nutrientes de águas residuais de laticínios em sistemas alagados construídos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 12-22, 2017.

MENEZES, G. D. G., **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3t5b8 por fermentação semi- sólida em biorreatores de coluna**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Instituto de Tecnologia, Seropédica, Rio de Janeiro, 2006.

MESSIAS, JOSANA MARIA; COSTA, BRUNA ZUCOLOTO DA; LIMA, VALERIA MARTA GOMES DE; GIESE, CRISTINE; DEKKER, ROBERT FRANS HUIBERT; BARBOSA, Aneli de Melo. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina. **Ciências Exatas e Tecnológicas** (Online), v. 32, p. 213-234, 2011.

METCALF, Leonard; EDDY, Harrison P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. McGraw Hill Brasil, 2015.

MIGUEL, A., JETTEN, M., & WELTE, C. O papel dos elementos genéticos móveis na degradação de micropoluentes orgânicos durante o tratamento biológico de águas residuais. **Water Research X**, 9. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100065>.

MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 25-37, 1996.

NAGANO, F.; DEON, R. L.; Usos da água na indústria: estudo de caso de um laticínio. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em administração). **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Pato Branco – PR, 2014.

NAIME, R.; GARCIA, A.C. Utilização de enraizadas no tratamento de efluentes agroindustriais. **Estudos Tecnológicos**, v. 1, n. 2, p. 11, jul/dez 2005.

NEI, P.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia, v. 1. **Escola de Química - UFRJ**, Rio de Janeiro, 62p. 2008.

OSBRADORS N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLÀ, C. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology letters**. v. 15, p. 357-360, 1993

- PHAM, V., KIM, J., CHANG, S., & CHUNG, W. Investigação de bactérias secretoras lipolíticas de um solo poluído artificialmente usando um método de cultura modificado e otimização de sua produção de lipase. *Microorganisms*, 9. 2021.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9122590>.
- PINTOR, A., VILAR, V., BOTELHO, C., & BOAVENTURA, R. Remoção de óleo e graxa de águas residuais: Tratamento por sorção como alternativa às tecnologias de ponta. Uma revisão crítica. *Revista de Engenharia Química*, 297, 229-255. 2016.
<https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.03.121>.
- RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme Microbiology Technology*, v.14, p.938-943, 1992.
- RUSSO, Mário Augusto Tavares. Tratamento de resíduos sólidos. **Universidade de Coimbra**, 2003.
- SANTOS, Paulo Henrique da Silva. **Uso de diferentes bases gordurosas para produção de sorvetes: um estudo reológico**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SARAIVA, C. B.; MENDONÇA, R. C. S.; SANTOS, A. L.; PEREIRA, D. A. Consumo de água e geração de efluentes em uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 64 n.1, p. 10-18, 2009.
- SCHMITT, D. M. F. Tratamento de águas residuárias da indústria de Laticínios pelos processos combinados coagulação/floculação/adsorção/ultrafiltração utilizando semente de moringa oleífera como coagulante. 2011. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Pós-graduação em engenharia química: **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, Toledo - PR, 2011.
- SERRA, Gonzalo. Um método simples para detecção da atividade lipolítica de microrganismos e algumas observações sobre a influência do contato entre células e substratos gordurosos. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 15-22, 1957.
- SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. v.48. n.2. p.201-211. 2015.
- SHARMA, D.; SHARMA, B. SHUKLA, A.K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, v.10, n.1, p.23-40, 2011. DOI: 10.3923/biotech.2011.23.

SHARMA, L. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipase Bacteriana.**, 8, 427-434. 2020. <https://doi.org/10.18782/2582-2845.8290>.

SHARMA, R.; CHISTI Y.; BANERJEE, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances** 19(2001) 627-662.

SHELATKAR, T., PADALIA, U., STUDENT, P. Lipase: An Overview and its Industrial Applications. **Int J Eng Sci**, 6(10), 2629-2631, 2016.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 1, n. 26, p. 116-122, 2006.

SILVA, L. D.; DANTAS, P. R.; PEREIRA NETO, L. M.; ARRUDA, V. C. M.; TAVARES, R. G.; SILVA, V. P. Eficiência da coagulação, floculação e decantação como tratamento primário de efluente têxtil. **Revista Geama**, v. 5, n. 1, p. 36-40, 2019.

SILVA, R.R.; SIQUEIRA, E. Q.; NOGUEIRA, I.S. Impactos ambientais de efluentes de laticínios em curso d'água na Bacia do Rio Pomba. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro**, v.23, n.2, p. 217-228, 2018.

SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1468-1474, 2008.

SILVA-BEDOYA, L., SÁNCHEZ-PINZÓN, M., CADAVID-RESTREPO, G., & MORENO-HERRERA, C. 2016. Análise da comunidade bacteriana de uma estação de tratamento de águas residuais industriais na Colômbia com triagem de microrganismos degradadores de lipídios. **Pesquisa microbiológica**, 192, 313-325. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.006>.

SIRISHA, E., RAJASEKAR, N., NARASU, M. L. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 5, p. 249-252, 2010.

SOUZA, J. C. B.; COSTA, M. D. R.; RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 1, p. 155-165, 2010.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, L.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.492-297, 1988.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. **Int J Sci Eng Res**, 3(7), 1-29. 2012.

TORQUATO, Ezaine Cristina Corrêa et al. Bioprospecção de cepas bacterianas ambientais com atividade lipolítica. **Acta Scientiae et Technicae**, [S.l.], v. 4, n. 1, ago. 2016. ISSN 2317-8957.

TRIBST, A. A. L. Efeito do processamento por alta pressão dinâmica combinado com tratamento térmico brando na inativação de *Aspergillus niger* em néctar de manga. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – **Universidade Estadual de Campinas**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo 2008.

VON SPERLING, M. Comparison of simple, small, full-scale sewage treatment systems in Brazil: UASB-maturation ponds-coarse filter; UASB-horizontal subsurface-flow wetland; vertical-flow wetland (first stage of French system). **Water Science and Technology**, v. 71, n. 3, p. 329–336, 2015.

WACKETT, L. P. Microbial consortia. **Environmental microbiology reports**, v.5, p.186-187, 2013.

ZHANG, Y., & ZHENG, M. Editorial: Exploração de enzimas altamente ativas, aprimoramento de desempenho e técnicas de processamento enzimático. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 10. 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1119604>.

ZUBAREVA, G. Tratamento de águas residuais profundas com teor de gordura excessivamente alto. **Ecologia e indústria da Rússia**. 2019. <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2019-10-34-38>.