



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS- RIO CLARO**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**BIODEGRADAÇÃO DE LODO DE ETA E ETE AVALIADA MEDIANTE ENSAIOS
DE TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

RALYVAN ARAÚJO DOS SANTOS

**RIO CLARO - SP
2023**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS- RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**BIODEGRADAÇÃO DE LODO DE ETA E ETE AVALIADA MEDIANTE ENSAIOS
DE TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

RALYVAN ARAÚJO DOS SANTOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em Ciências
Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador (a): Dra. Dânia Elisa Christofolletti
Mazzeo Morales
Co-orientador (a): Dra. Dejanira de Franceschi
de Angelis

**RIO CLARO- SP
2023**

S237b

Santos, Ralyvan Araújo dos

Biodegradação de lodo de ETA e ETE avaliada mediante ensaios de toxicidade e caracterização microbiológica / Ralyvan Araújo dos Santos. -- Rio Claro, 2023

129 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Coorientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Biorremediação. 2. Biofertilizante. 3. Daphnia similis. 4. Artemia salina. 5. Fitotoxicidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BIODEGRADAÇÃO DE LODO DE ETA E ETE AVALIADA MEDIANTE ENSAIOS DE TOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

AUTOR: RALYVAN ARAUJO DOS SANTOS

ORIENTADORA: DÂNIA ELISA CRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES

COORIENTADORA: DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DÂNIA ELISA CRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal / UFSCar Araras

Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO (Participação Virtual)

x

Profa. Dra. SILVIA TAMIE MATSUMOTO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / UFES

Profa. Dra. PATRICIA GIOVANELLA (Participação Virtual)
Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Rio Claro, 16 de fevereiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradecer a Deus por ter me dado forças e discernimento para realização desta pesquisa por mais de 4 anos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, por ter subsidiado a bolsa de pesquisa durante todo período do doutorado, meu obrigado.

Em especial, quero agradecer a minha querida orientadora e co-orientadora, Dânia Mazzeo e Dejanira de Angelis, por me acolherem no laboratório de toxicidade, pela ajuda que me deram em momentos mais difíceis que passei durante o doutorado, e por sempre me incentivarem a não desistir e finalizar a tese com muito mérito, obrigado mesmo, de coração.

Agradecer a equipe do Laboratório de Toxicidade, Dra. Dilza Nalin, pela ajuda em todas as etapas que realizei do doutorado, aos técnicos Márcio e ao Zito pela ajuda durante a montagem e análise dos experimentos realizados. E também a Mestra Jossandra pela ajuda e colaboração em alguns experimentos, meu obrigado a todos.

Agradecemos também a parceria com a Dra. Milene Ferro, pela ajuda nas análises de bioinformática que foi realizada na tese.

Agradecer as empresas Korin e Microgeo, por doarem os biofertilizantes que foram estudados nesta pesquisa, também a empresa BRK pela doação dos lodos de Esgotos e lodos de Águas.

Também quero agradecer a todos os meus amigos que conheci em Rio Claro e que sempre torceram por mim, em todas as fases do doutorado: Danilo da Silva, Diego Rezende, Petrus Zanon, Patrícia Giovanella, Alison, Aline Galli. E aos meus amigos de Manaus-AM, que mesmo longe, sempre acreditaram em mim: Adrian Arturo, Tayana e Kátia Cruz.

E por fim, um agradecimento especial a minha família: a minha mãe Cecy Araújo e ao meu pai Ronaldo Santos, que sempre me incentivaram a estudar, persistir e nunca desistir dos meus objetivos, mesmo estando longe, sempre me perguntavam como eu estava, me dando forças para prosseguir com o doutorado. E aqui estou eu... com o título de Doutor!

RESUMO

A população mundial em 2022 atingiu cerca de 8 bilhões de pessoas e, conseqüentemente, levou ao aumento no consumo de fontes de energia e na geração de resíduos oriundos da atividade humana como resultado do processo de tratamento das águas brutas e residuais (esgoto). Os lodos derivados de Estações de Tratamento de Água (LTA) e do tratamento do esgoto (LE), embora apresentem grandes quantidades de matéria orgânica e nutrientes, também contém microrganismos, dentre eles alguns patogênicos e contaminantes químicos de origem orgânica e inorgânica, de modo que, se não descartados em locais adequados, acabam gerando alteração no ambiente negativa em que se encontram. Contudo, um tratamento apropriado poderia possibilitar a utilização desses lodos como condicionadores de solos agrícolas. Diante destes fatos, o objetivo deste trabalho foi propor tratamentos para o LTA e o LE, isolados ou em associação, a partir do emprego de biofertilizantes (Bokashi (Inóculo I - In I) e Fermentado líquido (Inóculo II - In II) como indutores da biodegradação, a fim de diminuir sua carga poluidora e toxicidade, bem como caracterizar a microbiota de fungos e bactérias, buscando elucidar o processo de biorremediação dos lodos. Para isso, a biodegradação dos lodos foi avaliada por respirometria, mensurando alterações nas quantidades de CO₂ produzidas pelos diferentes tratamentos durante 68 dias. Foram testados dois biofertilizantes comercialmente disponíveis (In I e In II) para promoção da bioestimulação e bioaugmentação. A toxicidade dos tratamentos, antes e após a biodegradação, foi avaliada por ensaios de toxicidade aguda com microcrustáceos (*Artemia salina* e *Daphnia similis*) e germinação de sementes (*Lactuca sativa* e *Eruca sativa*). Alterações na comunidade microbiana durante a biodegradação desses resíduos foram avaliadas por sequenciamento de alto rendimento. A incorporação dos biofertilizantes aos tratamentos não resultou em aumento da eficiência da biodegradação. Além disso, o biofertilizante In I, quando adicionado ao LTA ou ao LE, ocasionou elevada toxicidade nas amostras iniciais, porém esse efeito foi diminuído ao longo do processo de biodegradação e conseqüentemente a comunidade bacteriana. O filo das Proteobacteria foi o mais predominante para os tratamentos de LTA+ In I e LE+ In I. A ausência de toxicidade nas amostras biodegradadas sugere que os lodos, após tratamento adequado, podem ser destinados para solos agrícolas como uma alternativa mais sustentável à sua disposição.

Palavra chaves: Biorremediação, Biofertilizante, *Daphnia similis*, *Artemia salina*, Fitotoxicidade

ABSTRACT

The world population in 2022 reached about 8 billion people and, consequently, led to an increase in the consumption of energy sources and in the generation of waste from human activity as a result of the treatment process of raw and wastewater (sewage). The sludge derived from Water Treatment Plants (WTS) and sewage treatment (SS), although they contain large amounts of organic matter and nutrients, also contain microorganisms, including some pathogens and chemical contaminants of organic and inorganic origin, so that which, if not disposed of in suitable places, end up causing changes in the negative environment in which they are found. However, an appropriate treatment could enable the use of these sludges as agricultural soil conditioners. In view of these facts, the objective of this work was to propose treatments for WTS and SS, isolated or in association, from the use of biofertilizers Bokashi (Inoculum I - In I) and Liquid Fermented (Inoculum II - In II) as inducers of biodegradation, in order to reduce its polluting load and toxicity, as well as to characterize the microbiota of fungi and bacteria, seeking to elucidate the sludge bioremediation process. For this, sludge biodegradation was evaluated by respirometry, measuring changes in the amounts of CO₂ produced by the different treatments during 68 days. Two commercially available biofertilizers (In I and In II) were tested to promote biostimulation and bioaugmentation. The toxicity of the treatments, before and after biodegradation, was evaluated by acute toxicity tests with microcrustaceans (*Artemia salina* and *Daphnia similis*) and seed germination (*Lactuca sativa* and *Eruca sativa*). Changes in the microbial community during biodegradation of these residues were evaluated by high-throughput sequencing. The incorporation of biofertilizers into treatments did not result in an increase in the efficiency of biodegradation. In addition, the In I biofertilizer, when added to WTS or SS, caused high toxicity in the initial samples, but this effect was reduced throughout the biodegradation process and consequently the bacterial community. The Proteobacteria phylum was the most predominant for the WTS+ In I and SS+ In I treatments. The absence of toxicity in the biodegraded samples suggests that the sludge, after adequate treatment, can be destined for agricultural soils as a more sustainable alternative at its disposal.

Keywords: Bioremediation, Biofertilizer, *Daphnia similis*, *Artemia salina*, *Phytotoxicity*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sistema de tratamento de água	13
Figura 2: Sistema de tratamento de Esgoto e suas principais fases de formação dos lodos. ...	17
Figura 3: Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA).....	19
Figura 4: Lagoa de Estabilização.....	20
Figura 5: Acompanhamento da produção diária de CO ₂ no período de 68 dias de biodegradação. A. Ensaio Controles; B. Ensaio com LTA; C. Ensaio com LE; D. Ensaio com LTA e LE associados.....	47
Figura 6: Produção de CO ₂ acumulada durante os experimentos respirométricos em 68 dias de biodegradação. A. Ensaio Controles; B. Ensaio com LTA; C. Ensaio com LTA; D. Ensaio com LTA e LE associados.....	48
Figura 7: Produção de CO ₂ acumulada devido à biodegradação dos lodos sob ação dos biofertilizantes (evolução de CO ₂ dos tratamentos, subtraindo-se os controles: solo; solo + inóculo I; solo + inóculo II) no período de 68 dias. A. Ensaio com LTA, LE e Inóculo I ; B. Ensaio com LTA, LE e Inóculo II; C. Ensaio com LTA, LE e associados com Inóculo I e II.	50
Figura 8: Eficiência da biodegradação (%) dos tratamentos com LTA (A), LE (B) e suas associações (C) suplementados com os inoculantes (I) e (II), durante 68 dias de biodegradação.....	53
Figura 9: Estrutura da comunidade bacteriana distribuída entre os principais filos identificados no período de 68 dias de biodegradação. A. LTA + In I (inicial); (B) LTA + In I (final); (C) LE + In I (inicial) e (A) LE + In I (final).....	84
Figura 10: Análise dos gêneros de bactérias compartilhados e exclusivos para os tratamentos de LTA+ In I (inicial e final) e LE+ In I (inicial e final) no período de 68 dias de biodegradação.....	86

Figura 11: Análise dos gêneros de fungos compartilhados e exclusivos para os tratamentos de LTA+ In I (inicial e final) e LE+ In I (inicial e final) no período de 68 dias de biodegradação.

.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Montagem dos tratamentos para o ensaio de respirometria.....	39
Tabela 2. Caracterização físico-química em porcentagem do LTA, LE, biofertilizantes (In I e In II) e solo.....	44
Tabela 3. Caracterização química dos lodos de LTA e LE.....	45
Tabela 4. Quantificações microbianas dos tratamentos, em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo seco), antes e após 68 dias de respirometria.....	54
Tabela 5. Diminuição da toxicidade com <i>Artemia salina</i> , mediante a análise da CL50 após processo de biodegradação.....	56
Tabela 6: Descrição dos tratamentos realizados.....	73
Tabela 7: Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com a espécie <i>Lactuca sativa</i> L, antes e após o processo de biodegradação.....	77
Tabela 8: Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com a espécie <i>Eruca sativa</i> L, antes e após o processo de biodegradação.....	78
Tabela 9: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LTA+In 1, antes da biodegradação.....	86
Tabela 10: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LTA+In 1, após a biodegradação.....	87
Tabela 11: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LE+In I, antes da biodegradação.....	87

LISTAS DE SIGLAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas
BOD- Incubadora Demanda Bioquímica de Oxigênio
CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CL50- Concentração Letal em 50%
CO- Carbono Orgânico
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO- Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
DSS- Dodecil Sulfato de Sódio
EB- Eficiência na Biodegradação
ETA- Estação de Tratamento de Água
ETE- Estação de Tratamento de Esgoto
g- Gramas
IG- Índice de Germinação
In I- Inoculo I
In II- Inoculo II
ITS- Internai Transcribed Spacer
KOH – Hidróxido de Potássio
L- Litros
LTA- Lodo de Tratamento de Água
M- Molar
MO- Matéria Orgânica
NBR- Normas Brasileiras
°C- Grau Celsius
OECD- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCA- Plate Count Agar
PNRS- Política Nacional de Resíduos Sólidos
RAFA- Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente
RNA- Ácido Ribonucleico
Rpm- Rotação por minutos
SABESP- Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SP – São Paulo

UFC- Unidade Formadoras de Colonias

umol- Micromol

UNESP- Universidade Estadual Paulista

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos.....	9
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1 Legislação de Resíduos Sólidos e Biossólidos.....	10
3.2 Processo de tratamento de água, geração de LTA e sua composição química.....	12
3.3 Destinação do Lodo de ETA.....	15
3.4 Processo de tratamento de esgoto, geração de LE e sua composição química.....	16
3.5 Destinação do Lodo de ETE.....	21
3.6 Microrganismos de Lodo.....	23
3.7 Ecotoxicologia.....	24
3.8 Metataxonômica.....	27
4 RESULTADOS.....	30
CAPÍTULO 1.....	31
4.1 INTRODUÇÃO.....	32
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.2.1 Coleta do lodo de tratamento de água e o do lodo de esgoto.....	35
4.2.2 Coleta de Solo.....	35
4.2.3 Caracterização físico-química das amostras de lodos.....	36
4.2.3.1 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH).....	36
4.2.3.2 Quantificação de Umidade e Sólidos Totais.....	36
4.2.3.3 Quantificação de Matéria Orgânica (MO).....	36
4.2.3.4 Quantificação de carbono orgânico (CO).....	37
4.2.4 Capacidade de Campo.....	37
4.2.5 Ensaio de biodegradação por respirometria.....	38
4.2.6 Construção da reta de calibração.....	38
4.2.7 Inóculo.....	38
4.2.8 Ensaio de Respirometria.....	39
4.2.9 Quantificação de bactérias heterotróficas totais e fungos dos tratamentos iniciais e finais.....	41
4.2.10 Ensaio de Toxicidade.....	41
4.2.11 Ensaio de Toxicidade Aguda.....	41
4.2.11.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	41
4.2.11.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	42
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.3.1 Caracterização físico-química.....	42
4.3.2 Avaliação da biodegradabilidade do LTA e LE no solo por suplementação de inoculantes.....	46
4.3.3 Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos.....	54
4.3.4 Acompanhamento da toxicidade aguda ao longo da biodegradação.....	55

4.4 CONCLUSÃO.....	57
4.5 REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 2.....	68
4.6 INTRODUÇÃO.....	69
4.7 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.7.1 Descrição e coleta dos materiais.....	71
4.7.2 Preparo dos tratamentos.....	73
4.7.3 Ensaios de fitotoxicidade com <i>Lactuca sativa</i> e <i>Eruca sativa</i>	73
4.7.4 Caracterização da comunidade de fungos e bactérias.....	74
4.7.5 Pré-processamento dos <i>Reads</i> e classificação taxonômica.....	75
4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.8.1 Fitotoxicidade.....	76
4.8.2 Caracterização microbiana dos tratamentos de LTA e LE.....	80
4.8.2.1 Comunidade bacteriana.....	82
4.8.2.2 Comunidade fúngica.....	89
4.9 CONCLUSÃO.....	94
4.10 REFERÊNCIAS.....	95
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
7 APÊNDICES.....	112

1 INTRODUÇÃO

Água potável é uma necessidade básica do ser humano e é imprescindível para todos os seres vivos. A maior parte da população depende da água fluvial ou lacustre para a sua sobrevivência. Para que a água vinda dos rios e de outras fontes possa ser utilizada com segurança, ela passa por um processo que denominamos tratamento de água. Geralmente isto ocorre em instalações construídas por engenheiros com as mais diversas complexidades, denominadas de Estações de Tratamento de Água (ETA).

As ETA operam com diferentes tecnologias dependendo da qualidade das águas que recebem. Nas ETA, as águas recebem a adição de produtos químicos que induzem a sua purificação e que, em princípio, envolve a sua coagulação, decantação, filtração e desinfecção, sendo, então, distribuída para o consumo.

Nas Estações de Tratamentos de Esgotos (ETE) as águas residuárias, provenientes de esgotos domésticos e industriais, recebem tratamentos biológicos que degradam as impurezas por meio de tratamento preliminar, tratamento primário, secundário e desinfecção (terciário).

Nos processos de tratamento, dependendo da qualidade da água bruta e do tratamento de esgoto, ambos resultam na formação de resíduos semissólidos, chamados de lodo de ETA (LTA) ou lodo de esgoto (LE), que contém elevado teor de água. Como cada ETA apresenta suas particularidades, o lodo resultante do tratamento da água vai depender, principalmente, da qualidade da água bruta, da tecnologia aplicada no tratamento e da sazonalidade. Enquanto para o LE, suas características vão depender, principalmente, de fatores antrópicos, como tipos de resíduos domésticos e industriais, dimensão da população

atendida, entre outros. No entanto, as condições sazonais também podem interferir no tipo de tratamento, o qual, por sua vez, também influencia no tipo de lodo gerado (aeróbio ou anaeróbio).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cada pessoa necessita, no mínimo, de 110 litros de água potável por dia para suprir suas necessidades, sendo que, no Brasil, este consumo pode chegar até 200 L/dia (SABESP, 2020). Assim, quanto maior o consumo de água potável, maior a quantidade de lodo de ETA produzido. Segundo Iwaki (2018), considerando-se apenas a população do Estado de São Paulo - Brasil, no ano de 2018, a produção de lodo seco de ETA, por dia, foi de 90 toneladas. O LTA, na maior parte das cidades onde a água é tratada, retorna ao rio, o que contribuiu para que as águas à jusante tenham sua qualidade prejudicada.

Em relação ao Brasil, onde apenas 50,8% do esgoto gerado recebe o devido tratamento (SNIS, 2021), estima-se que sua produção encontra-se em cerca de 370 mil toneladas de matéria seca a cada ano (MATEO-SAGASTA; RASCHID-SALLY; THEBO, 2015), com grande expectativas de aumento. O lodo de ETE, em sua maioria, é descartado em aterros sanitários, sem nenhum tratamento. Sendo assim, potencial contaminante de solo.

Diante desta realidade, estudos têm sido realizados para sugerir formas de disporem os lodos, afim de minimizar possíveis prejuízos ambientais. Assim, este estudo visa acrescentar informações que possam contribuir para tomadas de decisão por órgãos competentes, quanto ao descarte do lodo da ETA e ETE do município de Rio Claro, SP.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o uso de biofertilizantes como indutores em processo de biodegradação de lodos (LTA e LE), visando a minimização dos seus efeitos tóxicos e a estabilização da matéria orgânica.

2.2 Específicos

Estudar os efeitos da associação de LTA e LE com diferentes tratamentos pelo ensaio de respirometria;

Avaliar a fitotoxicidade da associação de LTA e LE com diferentes tratamentos em *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*;

Avaliar a toxicidade da associação de LTA e LE com diferentes tratamentos em *Artemia salina* e *Daphnia similis*;

Identificar os tratamentos que tiveram maior eficiência no processo de destoxificação de LTA e LE para sugerir métodos de disposição mais adequados e ambientalmente sustentáveis.

Caracterizar a comunidade fúngica e bacteriana dos diferentes tratamentos nas fases do processo de destoxificação do LTA e LE, utilizando sequenciamento massivo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Legislação de Resíduos Sólidos e Biossólidos

A Política Nacional de Resíduos Sólidos - PNRS, criada pela Lei nº 12.305, de 2010 e regulamentada pelo Decreto nº 7.404, de 23 de dezembro de 2010 (BRASIL, 2010), criou como um dos seus principais instrumentos o Plano Nacional de Resíduos Sólidos. A lei nº 12.305/10, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), contém instrumentos importantes para permitir o avanço necessário ao país no enfrentamento dos principais problemas ambientais, sociais e econômicos, decorrentes do manejo inadequado dos resíduos sólidos. A lei prevê a prevenção e a diminuição na geração de resíduos, tendo como proposta a prática de hábitos de consumo sustentável e um conjunto de instrumentos para propiciar o aumento da reciclagem e da reutilização dos resíduos sólidos (aquilo que tem valor econômico e pode ser reciclado ou reaproveitado) e a destinação ambientalmente adequada dos rejeitos (aquilo que não pode ser reciclado ou reutilizado).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão responsável pelas políticas ambientais, estabeleceu, inicialmente, pela resolução Nº 375, de 29 de agosto de 2006 e, recentemente, atualizada pela Resolução do CONAMA Nº 498/2020 critérios e procedimentos para a utilização do lodo de esgoto sanitário e produtos derivados, em áreas agrícolas, afim de se evitar riscos à saúde pública e ao meio ambiente e, ao mesmo tempo, atribuir benefícios à agricultura. Como o lodo é um resíduo intrínseco aos processos de tratamentos de esgotos e tende ao volume mínimo proporcional ao crescimento da população humana, uma solução adequada à sua disposição é medida que se impõe com urgência. Por conter diversos organismos patogênicos, elementos químicos, fonte de carga orgânica tóxica, metais pesados, contaminantes e organismos nocivos, os lodos possuem potenciais riscos à

saúde pública (BRASIL, 2020), Desse modo, para que o lodo possa ser aplicado em solos agrícolas, o LE deve atender aos critérios de potencial agrônômico, redução de atratividade de vetores, substâncias químicas e qualidade microbiológica, exigidos pela resolução CONAMA Nº 498/2020 (BRASIL, 2020)

Contudo, no Brasil, não há uma lei específica para a disposição de LTA em solos agrícolas. Considerando-se apenas o Estado de São Paulo, segundo o último levantamento, os municípios que realizavam o serviço de tratamento de água, preveem um montante de 152.039,82 toneladas/ano de lodo de ETA gerado no estado (CETESB, 2014), o que ressalta a necessidade de um destino ambientalmente sustentável para este resíduo, também com características desejáveis para a agricultura.

Ainda com base na política nacional de resíduos sólidos, cada estado tem o dever e a obrigação de se preocupar com seus resíduos sólidos gerados. O Estado de São Paulo abriga cerca de 445 municípios que seguem sua legislação própria, baseada na Lei estadual nº 12.300 de 16 de Março de 2006, da Política Estadual de Resíduos Sólidos. Em seu artigo 1º, a lei define como princípios e diretrizes, objetivos, instrumentos para a gestão integrada e compartilhada de resíduos sólidos, com vistas à prevenção e ao controle da poluição, à proteção e à recuperação da qualidade do meio ambiente, e à promoção da saúde pública, assegurando o uso adequado dos recursos ambientais no Estado de São Paulo (BRASIL, 2006). Porém, para garantir que a lei seja cumprida e respeitada, há um órgão no Estado de São Paulo responsável pela fiscalização dos resíduos oriundos das atividades humanas. A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB é a agência do Governo do estado responsável pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, com a preocupação fundamental de preservar e recuperar a qualidade das águas, do ar e do solo. Este órgão também estabelece em sua norma técnica P4.230,

publicada em maio de 2021, direcionamentos para a aplicação agrícola do LE (CETESB, 2021).

3.2 Processo de tratamento de água, geração de LTA e sua composição química

A água é fator essencial para manutenção da vida, a qual deve apresentar características adequadas para consumo. Por isso, a água quando é retirada da natureza, precisa passar por tratamentos constituídos por diversas etapas, como coagulação, decantação, filtração, desinfecção (que consistem na retirada de impurezas e possíveis patógenos) e correção de pH (RICHTER; NETTO, 1991). Atualmente, os métodos mais empregados são conhecidos como tratamentos convencionais, que controlam a dosagem de produtos químicos na água de captação para atender a legislação vigente para água potável.

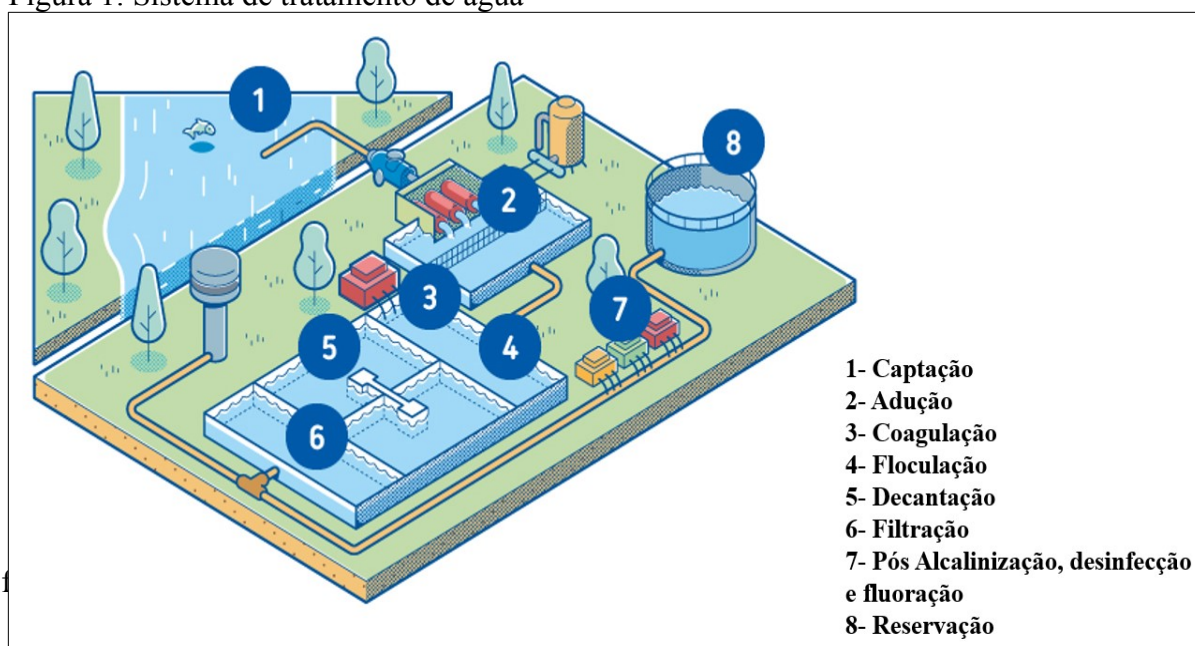
De acordo com a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de Maio de 2021 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021), que "dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade", o termo "água tratada" define aquela água que foi submetida a processos físicos, químicos ou combinação destes, visando atender ao padrão de potabilidade".

O tratamento convencional de água consiste nas seguintes etapas: Pré-cloração, alcalinização, coagulação, floculação, decantação, filtração, pós-alcalinização, desinfecção e fluoretação (PINHEIRO *et al.*, 2014; SABESP, 2020).

Na pré-cloração, o cloro é adicionado assim que a água chega à estação. Isso facilita a oxidação de matéria orgânica e metais. Na etapa de pré-alcalinização, a água recebe cal ou soda caustica, que servem para ajustar o pH aos valores exigidos nas fases seguintes do tratamento. Na fase de coagulação, é adicionado sulfato de alumínio, cloreto férrico ou outro

coagulante, seguido de uma agitação violenta da água. Assim, as partículas de impurezas ficam eletricamente desestabilizadas e mais fáceis de agregar. Após a coagulação, há uma mistura lenta da água, que serve para provocar a formação de flocos com as partículas e outras impurezas, em um processo denominado de floculação. Posteriormente, na decantação, a água passa por grandes tanques para separar os flocos das impurezas formadas na etapa anterior. A seguir, na filtração, a água atravessa tanques revestidos por camadas de pedras, areia e carvão antracito. Estes materiais são responsáveis por reter as partículas que restaram da fase de decantação. Então, na etapa de pós-alcalinização, é feita a correção final do pH da água, isto impede que ocorra a corrosão ou incrustação nas tubulações. Depois, na desinfecção, é feita a última adição de cloro no líquido antes de sua saída da Estação de Tratamento. Este procedimento garante que a água fornecida chegue isenta de bactérias patogênicas e vírus até a casa do consumidor. Por fim, também é realizada a fluoretação, que envolve a adição de flúor à água. Esta substância é considerada profilática na preservação dentária (SABESP, 2020) (Figura 1).

Figura 1: Sistema de tratamento de água



Fonte: BRK Ambiental

Durante o tratamento da água bruta, os lodos são gerados em duas etapas: Na de decantação e, posteriormente, na fase de filtração. Na primeira etapa de produção do lodo (denominada decantação) são gerados entre 60 a 95% deste material, e na etapa de filtração ocorre produção em torno de 5 e 10% do volume total. A maior parte desse lodo é descartada em corpos d'águas, sendo esta uma prática comum adotada pelas ETA. Este procedimento implica em impactos negativos ao ambiente, pois contribui para assoreamento de rios, aumento na concentração dos metais utilizados no processo de tratamento da água e contaminação aquática com outras substâncias tóxicas (WOLFF *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2022).

Os lodos gerados nos decantadores das ETA são resultados do processo de coagulação, floculação e sedimentação das partículas presentes na água bruta, que por meio de reações químicas e físicas, formam flocos que os tornam viáveis para processo de sedimentação ou de flotação.

Durante a fase coagulação do tratamento de água, vários sais de alumínio e sais de ferro são comumente utilizados para auxiliar na precipitação de partículas orgânicas e impurezas presentes na água. Com isso, a composição química do LTA pode variar de acordo com os tipos de coagulantes usados e do local onde é coletada a água bruta. Geralmente os elementos mais abundantes encontrados nos LTA são: Dióxido de Silício, Óxido de Alumínio, Óxido de Ferro, Óxido de Cálcio, Óxido de Potássio, Óxido de Magnésio, Óxido de Sódio, Dióxido de Titânio, Pentóxido de Fósforo, Óxido de Manganês, Óxido de Zinco, e alguns metais pesados, tais como, Bário, Zircônio, Rubídio, Cério, Estrôncio, Cobre, Chumbo, Níquel, Cromo, Gálio, Arsênio e Nióbio, o que acaba comprometendo os ecossistemas, caso sejam introduzidos em excesso (AHMAD *et al.*, 2016).

3.3 Destinação do Lodo de ETA

Segundo Ahmad *et al.* (2016) a geração de lodo produzido por uma estação gerenciada ultrapassa 100.000 toneladas/ano. A destinação do lodo ainda é um grande problema para a maior parte das ETA do país, pois aspectos sociais, econômicos e ambientais são fatores primordiais para se atentar com o destino do lodo. No Brasil, por não haver uma legislação vigente que obrigue a ETA a realizar um tratamento final para o lodo, a reciclagem e o correto gerenciamento do lodo não são considerados de grande relevância.

Contudo, para garantir um melhor o gerenciamento e um destino correto do resíduo foi criado a Lei 9433/1997 de Política Nacional de Recursos Hídricos (BRASIL, 1997) e a Lei 9605/1998 de Crimes ambientais (BRASIL, 1998). Segundo Silveira (2015) o lançamento de lodo de ETA *in natura* em corpos hídricos é considerado crime ambiental.

De acordo com a Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010, o lodo oriundo das ETA deve ser disposto em aterros sanitários ou destinados à incineração (BRASIL, 2010), uma vez que o lodo gerado, segundo a NBR 10.004, é considerado resíduo de classe II por não ser inerte ou perigoso (ABNT, 2004). No entanto, tais práticas são bastante onerosas, acarretando em um custo elevado para essas destinações.

Assim, há necessidade de se promover pesquisas que objetivam dar condições para que as ETA tenham possibilidades mais viáveis e econômicas para dispor adequadamente este resíduo. A aplicação no solo como condicionante representa uma alternativa altamente sustentável, desde que seja certificada a ausência de periculosidade desse resíduo (BABATUMDE, ZHAO, 2007; ODIMEGWU *et al.*, 2018).

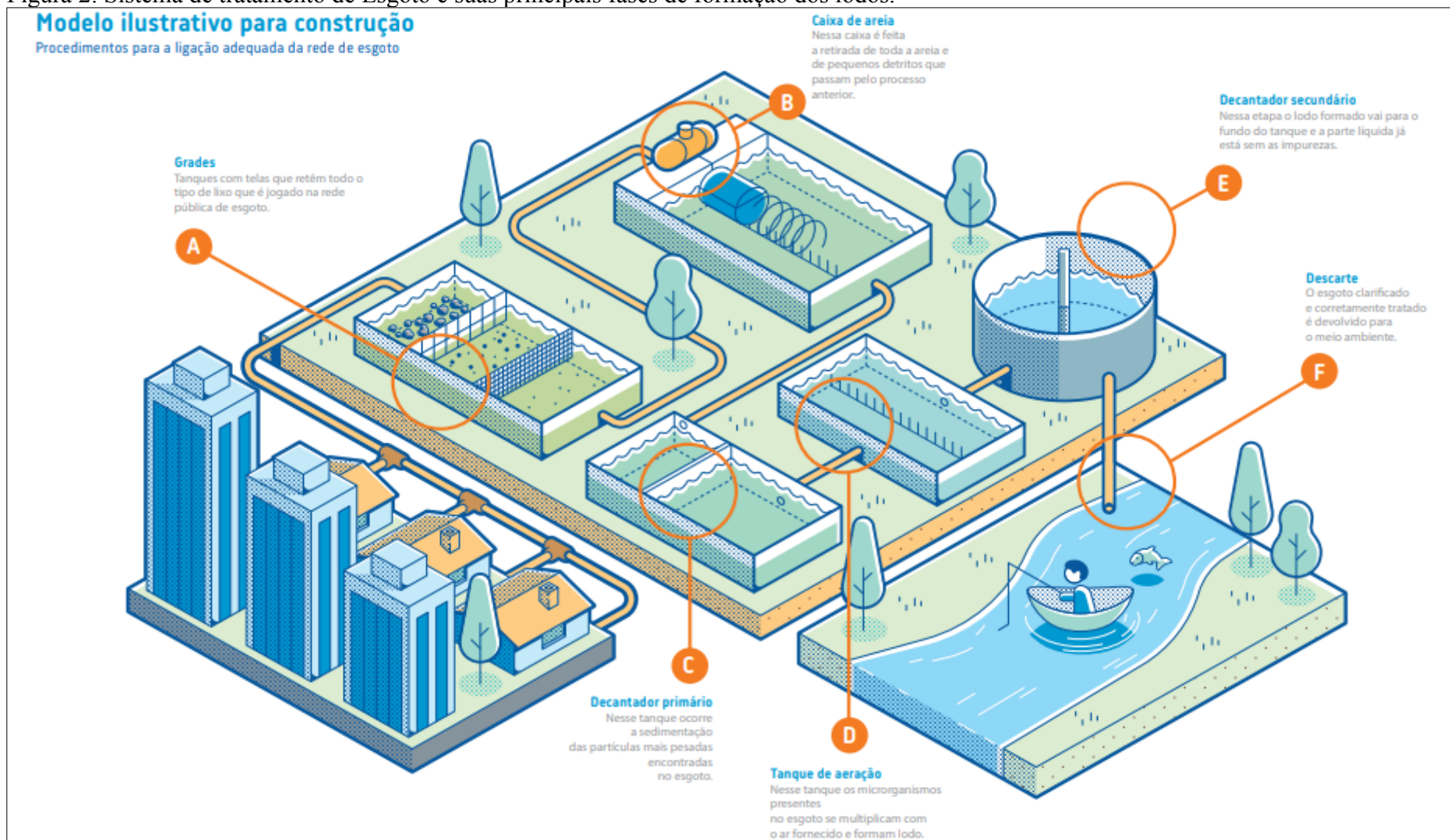
Outra possibilidade é a utilização do LTA para produção de cerâmica. Em um estudo que investigou a atividade térmica do lodo frente a uma temperatura de 1000 e 1050

°C, os pesquisadores verificaram que a presença de ferro e outros minerais são importantes para produzir artefatos quando adicionado com a mistura geradora de cerâmica. A comprovação foi efetuada por testes de termoestabilidade, resistência, durabilidade, pH, coloração por meio da técnica de raio x. Nestas condições, é possível utilizá-lo para confecção de filtros, pisos, telhas, tijolos e até mesmo blocos de concretos (KIZINIEVIČ *et al.*, 2013). Dentre outras utilidades do LTA, pode-se incluir a produção de bloquinhos leves para ornamentação, semelhantes àqueles utilizados como pedras de paisagismo (HUANG; WANG, 2013).

3.4 Processo de tratamento de esgoto, geração de LE e sua composição química

O LE é definido como resíduo proveniente do tratamento de águas residuais, sendo classificado em lodo primário e secundário. O lodo primário é composto pelos sólidos sedimentáveis de esgoto bruto, já o lodo secundário é formado na etapa biológica do tratamento, que é conhecido como lodo biológico ou lodo excedente (VON-SPERLING, 2018) é formado através do processo de tratamento de águas residuais (Figura 2).

Figura 2: Sistema de tratamento de Esgoto e suas principais fases de formação dos lodos.



Fonte: BRK Ambiental

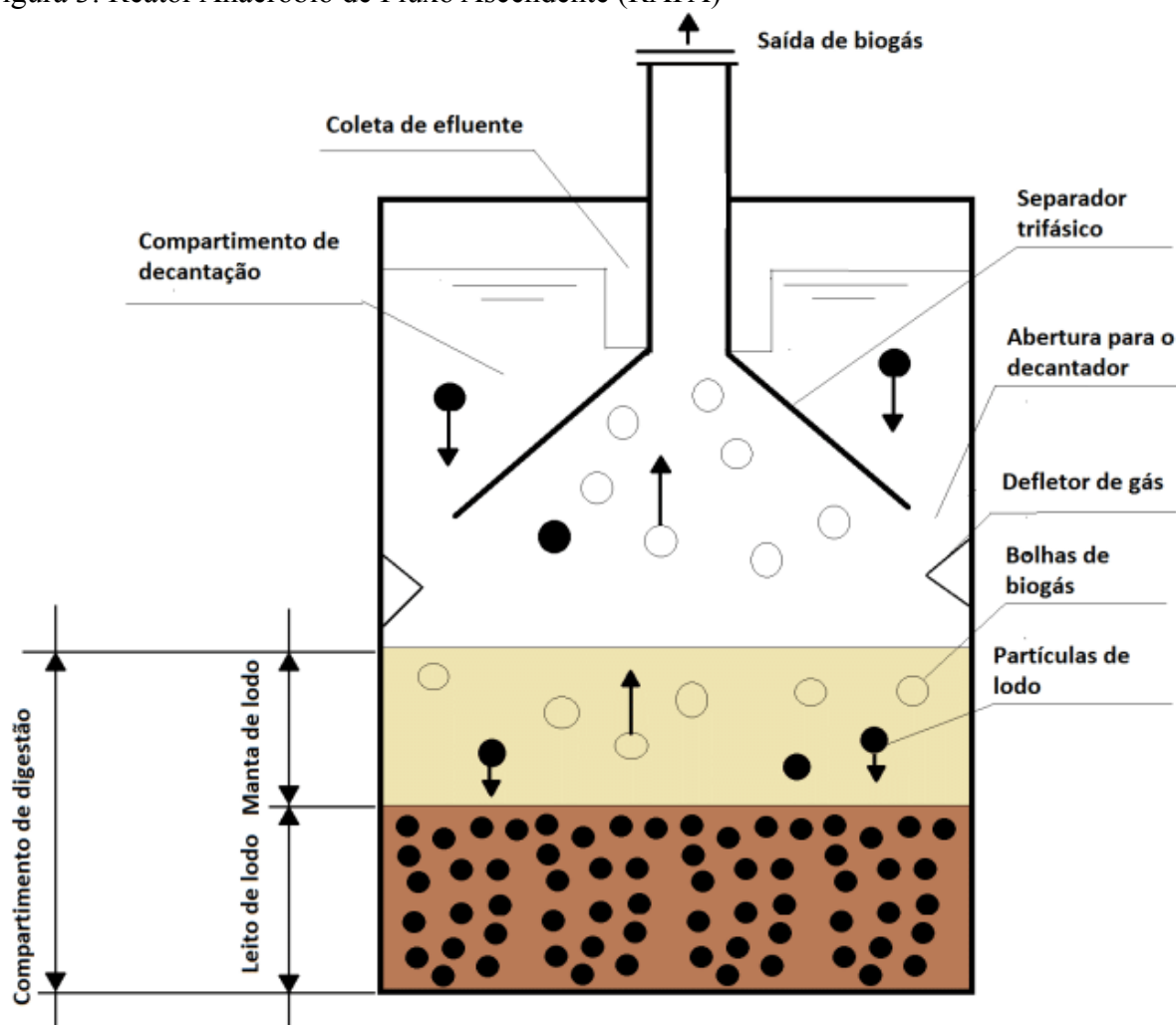
Os componentes que constituem o LE são gorduras, graxas, ceras, óleos e ácidos graxos, celulose, proteínas, sílica, ureia, nitrogênio, ácido fosfórico, ferro, óxido de cálcio, potássio, óxido de magnésio, alumínios, sendo que uma grande variedade de minerais e substâncias húmicas também estão presentes (TUROVSKIY; MATHAI, 2006). Quanto ao carácter químico dos LE, também podem ser encontrados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dioxinas, furanos e metais pesados (RAHEEM *et al.*, 2018). No entanto, as características químicas dos LE estão associadas à sua fonte de origem, pois os esgotos são provenientes de sistemas domésticos e industriais.

Cada esgoto apresenta suas características e particularidades e, partir dessas, é possível determinar o melhor modelo de sistema para tratá-los. Os sistemas de tratamentos, mais comumente utilizados são por métodos físico-químico, químico ou biológico, aeróbio ou anaeróbio (SPERLING, 2018).

O tratamento por lodo ativado utiliza agregados de células microbianas em forma de flocos, grânulos ou biofilme (YU, 2020). Esse sistema é composto por diversas unidades, que tem como finalidade principal de remover sólidos presentes no esgoto. De modo geral, esse sistema é constituído, nas etapas iniciais, por grades que removem os sólidos grosseiros e caixa de areia para remoção de areia, e decantador primário, onde ocorre a remoção dos sólidos sedimentáveis (lodo primário). No reator biológico, os sólidos que não são sedimentáveis são incorporados a massa biológica, que é retirada no decantador secundário (lodo secundário). Uma das partes deste lodo secundário retorna ao reator, a fim de se manter uma quantidade adequada de microrganismos enquanto a outra parte é descartada (PEDROZA *et al.*, 2010; NUVOLARI *et al.*, 2011).

No Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente (RAFA) (Figura 3). Neste reator a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é convertida, anaerobiamente, por bactérias dispersas no reator, onde o fluxo líquido é ascendente. A parte superior do reator é dividida nas zonas de sedimentação e de coleta de gás. A zona de sedimentação possibilita a saída do efluente clarificado e o retorno dos sólidos (biomassa) ao sistema, aumentando a sua concentração no reator. Neste sistema acontece a formação de gás metano e a quantidade de lodo gerado é baixa (SPERLING, 2018).

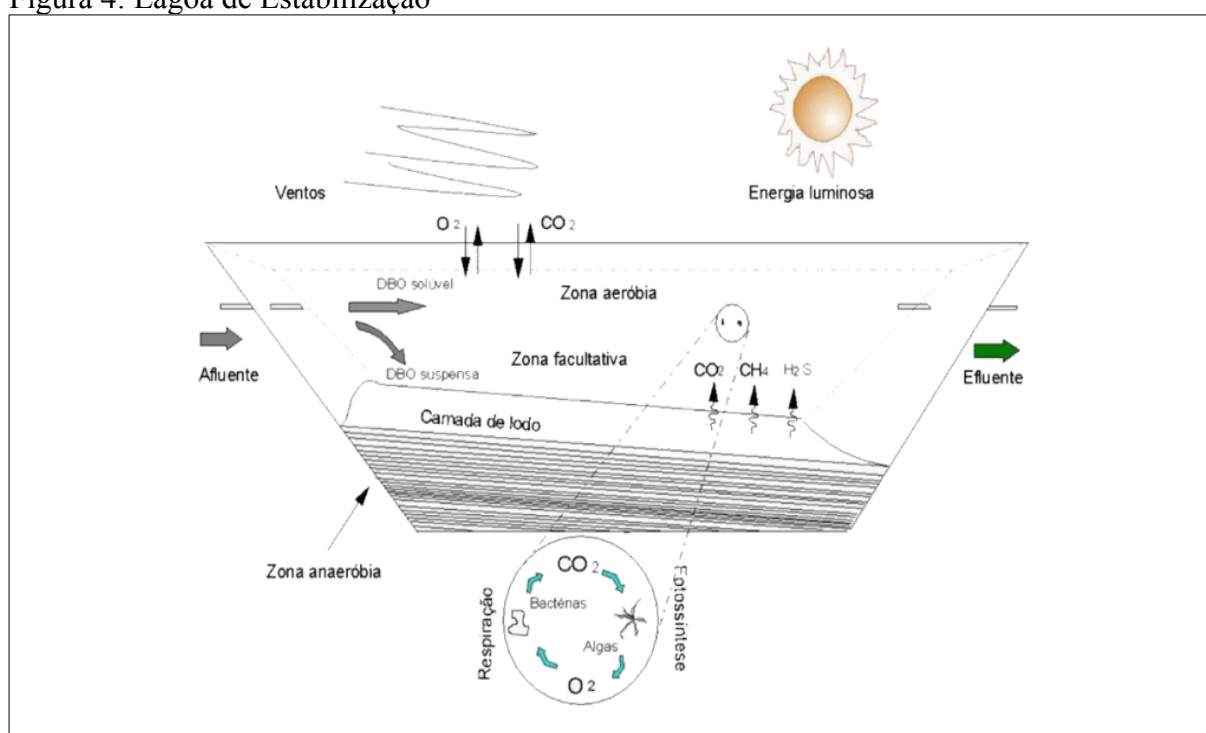
Figura 3: Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente (RAFA)



Fonte: Barros, 2016

Lagoa de estabilização (Figura 4) é um processo de tratamento de esgotos utilizado para remoção de matéria orgânica e de organismos patogênicos (lagoas de maturação). Trata-se de um processo natural, que ocorre quando se lança matéria orgânica num corpo d'água, a qual é degradada por meio de simbiose entre bactérias, fungos e algas (SOUSA, 2015; SPERLING, 2018).

Figura 4: Lagoa de Estabilização



Fonte: Marques, 2022.

O tratamento de Baías e Valas de Infiltração consiste na passagem do esgoto a partir de um filtro inserido no solo. Esses filtros são formados por areias de diferentes granulações e pedregulhos, na qual partículas sólidas são retidas (SABESP, 2020).

O tratamento por Flotação consiste num processo físico-químico, que adiciona um produto químico que induz a coagulação, a fim de facilitar a formação de flocos e, conseqüentemente, a remoção. Neste processo também ocorre a formação de bolhas que

atraem as partículas, fazendo com que estas flutuam e, a seguir, o lodo é retirado (CHAVES *et al.*, 2018).

3.5 Destinação do Lodo de ETE

Por apresentarem uma constituição química complexa, os LE são resíduos sólidos que podem ocasionar diversos problemas ambientais, por isso, requerem no final uma destinação correta. Contudo este gerenciamento ainda é problema para maior parte das ETE e, conseqüentemente, torna-se um problema rotineiro no Brasil e no mundo (RIGO *et al.*, 2014).

Atualmente, algumas formas de destinação para o lodo proveniente de tratamento de esgotos são: incineração, disposição em aterros sanitários, aplicação em áreas degradadas, destinação a processos de tratamento *Landfarming*, utilização na agricultura como fertilizante e condicionante de solo (SPEARLING, 2018).

Incineração é um processo relativo ao tratamento térmico de uma variedade de resíduos, que ocorrem em um tempo pré-determinado, expondo o material em alta temperatura, geralmente acima de 900°C (PEREIRA, 2012). O processo de incineração do lodo é mais simples do que a disposição *in natura* e vem ganhando adesão em vários países, este processo é realizado em forno devido a sua alta capacidade de incinerar, eficiência e controle de emissão de gases, porém ainda é um processo de elevado custo e que pode ocasionar a emissão de dioxinas (SPEARLING, 2018).

Disposição em aterros sanitários ainda é uma das alternativas mais adotadas pelas ETE do Brasil, pois o lodo não precisa passar por nenhum tipo de tratamento e é levado para uma área afastada da cidade, não oferecendo riscos à saúde humana. No entanto, sabe-se que o descarte de lodo em aterro sanitário afeta à produção de lixiviado e as emissões de CO₂

diretamente para a atmosfera (KACPRZAK *et al.*, 2017), além de acarretar em um custo extra para as ETE, principalmente em relação ao transporte desse resíduo até o aterro.

Em alguns locais, o lodo pode ser retirado das estações e levado para tratamentos *Landfarming*, em áreas de disposição de resíduos onde o substrato orgânico é degradado biologicamente (processo aeróbio) na camada superior do solo e a parte inorgânica é transformada ou fixada nesta mesma camada de solo. A degradação ocorre por meio da atividade microbiana, que é considerada de baixo custo, porém problemas podem ocorrer com essa disposição final, como acúmulo de metais pesados e elemento de difíceis decomposição (SPEARLING, 2018).

A disposição oceânica de lodo era uma prática adotada porém, com passar do tempo, esta prática foi proibida, principalmente em países Europa e Estados Unidos, no entanto a possibilidade de existirem locais, cuja à área geográfica é considerada pequena, como em ilhas, onde os rios fluem com maior rapidez ao oceano, que são usados para a disposição dos lodos (SHIU; LEE; CHIUEH, 2017).

O LE, após tratamento térmico, pode ser empregado na fabricação do cimento, o que diminui a produção de gases do efeito estufa em até 20 vezes, além de contribuir na economia das jazidas de matéria prima (PAVLÍK *et al.*, 2016).

Outras alternativas sustentáveis, fazem-se necessária e merecem atenção, pois os lodos apresentam potenciais para seu emprego na agricultura. Em países da União Europeia, o uso do lodo na agricultura é regulamentado apenas pelos limites de metais pesados (Cd, Cu, Hg, Pb e Zn) (HUDCOVÁ *et al.*, 2019). Tal prática, dependendo do lodo, pode ocasionar efeitos positivos ou negativos, uma vez que permite a recuperação da perda progressiva de matéria orgânica e nutriente do solo (positivo), mas pode acarretar nas dispersão de

contaminantes (negativo) (TOMEI *et al.*, 2016). O risco potencial de doenças bacterianas, virais e parasitárias que podem ser transmitidas através do ciclo lodo-solo-plantação-homem constitui o maior problema associado ao descarte de lodo para terras agrícolas e também pela contaminação de metais pesados que estão agregados aos lodos (HUDCOVÁ *et al.*, 2019).

3.6 Microrganismos de Lodo

Os lodos provenientes dos tratamentos de esgotos domésticos e industriais apresentam em sua composição grande diversidade microbiana. A mesma pode estar relacionada tanto com a eficiência, como com a ineficiência do tratamento de esgoto. O LE é um complexo sistema constituído por bactérias, protozoários, fungos e micrometazóários que se agregam sob a forma de flocos com variada atividade biológica. No tanque de aeração, o lodo ativado apresenta uma microbiota que inclui várias espécies de protozoários (flagelados, sarcodinos e ciliados) e metazoários (rotíferos, nematoides, tardigradas, gastrotróficos e oligoquetas). As espécies pertencentes aos gêneros *Opercularia* e *Trachelophyllum* e a espécie *Vorticella microstoma* geralmente indicam baixa qualidade de efluente, enquanto *Aelosoma* sp., *Arcella* sp., *Carchesium* sp., *Epistylis* sp., *Euglypha* sp., *Euplotes* sp., pertence a classe Monogononta, *Peranema* sp., *Tritigmostoma* sp., *Trochilia* sp., *Vorticella aquadulcis* e *Zoothamnium* sp. são considerados indicadores de alta qualidade no tratamento. Por outro lado, os organismos pertencentes ao filo Nematoda, *Opercularia* sp. e *V. microstoma* são relacionados a más condições de aeração (abaixo de 0,2-0,5 mg/O₂/L), enquanto *Aelosoma* sp., *Carchesium* sp., *Euglypha* sp., *Arcella* sp., classe Monogononta, as espécies *Trochilia* sp., *V. aquadulcis* e *Zoothamnium* sp. são indicadores de uma aeração satisfatória (acima de 1-2 mg/ O₂/ L) (GINORIS *et al.*, 2007).

O processo de nitrificação pode ser inferido pela ocorrência em altas densidades de *Aelosoma* sp., *Arcella* sp., *Carchesium* sp., *Coleps* sp., *Epistylis* sp., *Euplotes* sp., *Trochilia* sp. e a classe Monogononta. Além disso, a presença de *Peranema* sp. e *V. microstoma* indicam a formação recente de lodos (poucos dias), enquanto *Aelosoma* sp., *Arcella* sp., *Euglypha* sp., e as classes Digononta e Monogononta foram apontados como indicadores de lodo com tempo acima de 20 dias (GINORIS *et al.*, 2007).

No entanto, além dessa diversidade na microfauna, o lodo apresenta uma diversidade de fungos, bactérias, vírus e alguns parasitas que ocasionam riscos letais à saúde dos seres humanos. Dentre os microrganismos encontrados, estão o vírus causador da hepatite A, enterovírus, rotavírus e adenovírus, porém, as concentrações desses organismos podem variar de acordo com o tamanho da população que o originou. Além dos vírus, as bactérias são encontradas em abundância nos lodos, sendo que, a maior parte, pertencem aos gêneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Clostridium*, *Mycobacterium* e *Campylobacter*, as quais estão relacionadas a doenças respiratórias, de pele e doenças gastrointestinais aos seres humanos (MELI *et al.*, 2016). Outros organismos podem estar presentes, como protozoários, pertencentes aos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia*, e alguns ovos de *Ascaris* pertencente ao filo nematoda. São também encontrados no lodo, os fungos como *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena*, *Monascus rubber ascospores* e *Aspergillus niger* (ROMDHANA *et al.*, 2009).

3.7 Ecotoxicologia

Embora o LTA e o LE apresentem possibilidade de aproveitamento, para poderem ser propriamente utilizados com segurança, estes necessitam de ser avaliados por estudos biológicos que comprovem sua inocuidade em termos de risco ecotoxicológico.

Neste sentido, a Ecotoxicologia é o ramo da toxicologia relacionado com estudo do efeito tóxico, avaliando a ação de poluentes, sejam de origens naturais ou sintéticos, sob todos os constituintes dos ecossistemas, incluindo animais, plantas e microrganismos em um contexto geral (ZIENLIŃSKA *et al.*, 2020). Pesquisas envolvendo a Ecotoxicologia progrediram nestas últimas décadas devido à poluição ambiental originada pelo desenvolvimento industrial e crescimento populacional (ALI *et al.*, 2019). Uma forma para se determinar os efeitos de diferentes poluentes em uma determinada comunidade, seria o emprego de testes ecotoxicológicos utilizando bioindicadores como, algas (HUANG *et al.*, 2019), peixes (THORÉ *et al.*, 2021), microcrustáceos (BERGSTEN-TORRALBA *et al.*, 2020), bactérias e plantas (PLACHTOVA *et al.*, 2018), anelídeos (ENGELMANN *et al.*, 2018).

Algas: como indicadores biológicos tornam-se importantes, pois são considerados produtores primários na cadeia alimentar, ou seja, qualquer alteração no dinamismo da sua comunidade pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Dentre as vantagens da aplicação das algas destacam-se que são extremamente sensíveis às alterações externas do ambiente e apresentam um ciclo de vida relativamente curto, o que facilita uma melhor observação de efeitos tóxicos, conseqüentemente, em suas gerações posteriores (REGINATTO *et al.*, 1999). As algas comumente utilizadas em estudos de toxicidade são as espécies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum* e atualmente *Pseudokirchneriella subcapitata* (MA *et al.*, 2002; GEYER; SCHEUNERT; KORTE, 1985; FAIRCHILD *et al.*, 1997).

Peixes e microcrustáceos: são organismos aquáticos mais utilizados. Os microcrustáceos e peixes de água doce e salgada predominam nos ensaios biológicos. Estes organismos são importantes em muitas cadeias alimentares de variadas espécies de peixes,

apresentam um ciclo de vida relativamente curto, são facilmente manipulados em laboratórios, apresentam alta sensibilidade a diversos poluentes aquáticos, são pequenos e não necessitam de locais amplos para serem criados (SHAW; CHADWICK, 1998; KIM *et al.*, 2009). Organismos aquáticos mais comumente estudados em ensaios ecotoxicológicos são: o microcrustáceo de água doce, *Daphnia similis* (RODGHER; ESPÍNDOLA; LOMBARDI, 2010) e *Artemia salina* de água salgada (SVENSSON *et al.*, 2005), enquanto, os peixes são as espécies *Danio rerio* (PRETTI *et al.*, 2009), *Pimephales promelas* (NORBERG; MOUNT, 1985) e *Oreochromis niloticus* (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

Bactérias: *Aliivibrio fischeri* é uma espécie de bactéria que apresenta alta sensibilidade a fatores ambientais. A avaliação dos ensaios ocorre por meio do equipamento denominado microtox, que mede a bioluminescência da amostra. Este teste é considerado rápido e de fácil reprodutibilidade. O ensaio baseia-se na sensibilidade da bactéria que, ao entrar em contato com o agente poluidor (dependendo da toxicidade deste poluente), apresenta variações no padrão de sua luminescência de acordo com o efeito tóxico da amostra (BULICH, 1992). Assim, quanto maior a toxicidade da amostra, menor a bioluminescência. As normas da CETESB L5.228 (1988) também recomendam o teste de toxicidade aguda empregando a bactéria *Spirillum volutans*, analisada por meio da motilidade típica de movimento reverso por causa dos seus flagelos que, ao entrarem em contato com substâncias letais, alteram seu movimento, o que é considerado como parâmetro para medir a toxicidade.

Plantas: os ensaios de fitotoxicidade são também empregados com frequência na avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais. Um dos testes mais utilizados são os bioensaios com germinações de sementes, que consiste em colocar as sementes em contato com a amostra e, após alguns dias, por meio do desenvolvimento radicular, avaliar se esta apresenta potencial tóxico ou não. A utilização de sementes de plantas é considerada um teste

de baixo custo, com alta reprodutibilidade, bastante sensível às mudanças ambientais, químicas e físicas e de rápida duração. Vários estudos que utilizaram sementes comprovaram a eficácia da utilização de sementes de diversas plantas, como de pepino (*Cucumis sativus* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), rúcula (*Eruca sativa* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merr) (FRANCO *et al.*, 2017; ALAM *et al.*, 2007; GUNDERSON *et al.*, 1997).

Anelídeos: compõem a escala de teste toxicidade, sendo bioindicadoras de contaminação, principalmente de solos. Possuem ampla distribuição geográfica, sendo consideradas cosmopolitas, e são vulneráveis a diversos fatores ambientais (OECD, 1984a). As espécies recomendadas pela norma OCDE (1984b) são *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*. Estas espécies são encontradas em composto e pilhas de esterco e podem ser facilmente criadas em laboratório. Geralmente, os efeitos estudados para avaliar a toxicidade do poluente sob as minhocas são mortalidade, constrições segmentares e lesões rigidamente nos anéis, com duração, em média de 7 a 14 dias (VAN-LEEUEWEN, 1995; ABNT, 2014).

3.8 Metataxonômica

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de métodos independentes de cultivos, que são baseados na coleta de material biológico de amostras ambientais (metagenômica, metatranscriptômica e metaproteômica), abriu novas possibilidades para o estudo de microrganismos não cultiváveis e suas aplicações (BERINI *et al.*, 2017).

A metagenômica apareceu como nova possibilidade para estudos de comunidades microbianas, independentemente da capacidade dos organismos serem cultivados em laboratório pelos métodos convencionais, o que possibilitou a oportunidade de descrever a diversidade microbiana de qualquer tipo de ambiente, anteriormente ainda desconhecida (NAZIR, 2016).

Estas abordagens independentes de cultura baseiam-se na identificação de microrganismos a partir de ácidos nucleicos extraídos diretamente de amostras (solos, água, plantas e etc.).

A metataxonomia é utilizada para identificar a microbiota presente na amostra a partir do sequenciamento de genes marcadores, tendo tipicamente genes RNAr como alvo (ZOTTA *et al.*, 2022). Para esta metodologia são utilizados primers que amplificam regiões ou genes específicos (gene RNAr 16 S para bactérias; gene RNAr 18S e região ITS para fungos) e, com o material genético já extraído, este é amplificado a partir dos primers escolhidos e, em seguida, são criadas as bibliotecas onde o DNA é sequenciado (GOSH, 2018; LIU, 2020; ZOTTA *et al.*, 2022).

O sequenciamento de amplicon é de longe a abordagem mais utilizada para estudos metataxonômicos, entretanto, devido ao comprimento relativamente curto das regiões visadas, a resolução taxonômica é muitas vezes limitada ao gênero e menos frequentemente ao nível de espécie, dependendo do comprimento e qualidade das sequências (Parente *et al.* 2020). Mais recentemente, em decorrência do uso de sequenciamento de molécula única, variantes de sequência de Amplicon ou disponibilidade de bancos de dados otimizados, há aumento da resolução taxonômica (CALLAHAN *et al.* 2016; LI *et al.* 2017; JIN *et al.*, 2018; MO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019; PARENTE *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, pelas técnicas de metataxonômica foram descobertas cerca de 11.000 espécies de bactérias e archaeas. No entanto, na taxa atual de aproximadamente 600 novas descrições por ano, foi previsto que levaria mais de 1.000 anos para classificar todas as espécies remanescentes. Apesar dessa estimativa, ainda não se sabe quanto tempo levaria para

investigar as informações genômica e os arsenais enzimáticos de várias espécies microbianas frente à enorme quantidade de informação que vem sendo obtida (FERRER *et al.*, 2015).

A técnica de metagenômica é utilizada nos mais diversos campos da biotecnologia. NGUYEN *et al.*, (2022) estudaram a comunidade de microrganismos envolvida na co-fermentação da bebida alcoólica japonesa, o Saquê. LI *et al.*, (2020), estudaram a comunidade microbiana envolvidas no processo formação do lodo granular de estações de tratamentos de águas residuais que recebem adição de efluentes com alta salinidade. Também, a metataxonômica é aplicada na área clínica para caracterizar ambientes tóxicos, vetores de doenças em artrópodes e até mesmo no microbioma humano (CHIU; MILLER, 2019), além de ser muito utilizada nas ciências forenses (HAMPTON *et al.*, 2017).

4 RESULTADOS

A tese foi dividida em 2 capítulos:

O capítulo 1 é intitulado como: “**Biorremediação de lodos de tratamentos de água e esgoto por suplementação com biofertilizantes**”

O capítulo 2 é intitulado como: “**Fitotoxicidade e análise da comunidade de bactérias e fungos envolvida na biodegradação de LTA e LE associados com biofertilizantes**”.

CAPÍTULO 1

Biorremediação de lodos de tratamentos de água e esgoto por suplementação com biofertilizantes

Ralyvan Araújo dos Santos¹, Dejanira de Franceschi de Angelis¹, Dilza Aparecida Nalin de Oliveira Leite¹, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo^{2*}

1 Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brazil.

2 Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Centro de Ciências Agrárias, Araras, SP, Brazil.

* Corresponding author: daniamazzeo@ufscar.br, phone: +55 19 3543-2934; Departamento de Biotecnologia e Produção Animal e Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Anhanguera, km 174 - SP-330 - Araras - SP – Brazil, CEP: 13600-970.

RESUMO

Ações mais sustentáveis são necessárias para a disposição final dos resíduos provenientes das Estação de Tratamento de Água e Esgoto frente à enorme quantidade gerada e ao elevado risco ambiental. A presença de minerais e matéria orgânica no lodo de estação de tratamento de água (LTA) e no lodo do esgoto (LE) tornam o seu uso agrícola bastante promissor. Diante disso, este estudo objetivou promover a estabilização e a biodegradação desses resíduos em solo, isolados ou em associação, a partir da incorporação de dois diferentes tipos de biofertilizantes: Inóculo I (In I) fermentado sólido de vegetais e Inóculo II (In II) fermentado líquido, que atuaram como fontes de novos microrganismos e agentes estimulantes. A

toxicidade das amostras foi acompanhada ao longo do processo de biodegradação por meio de testes com *Daphnia similis* e *Artemia salina*. Os resultados da biodegradabilidade demonstraram que a bioaumentação/bioestimulação dos lodos levou a inibição do processo, indicando que os microrganismos autóctones, naturalmente presentes nesses resíduos, são mais eficientes na promoção de sua estabilização. Adicionalmente, a adição do biofertilizante In I aos tratamentos contendo LTA e LE isolados ocasionou elevada toxicidade para os organismos testados. Contudo, a toxicidade inicial observada nessas amostras diminuiu após os 68 dias do processo de biodegradação. Assim, embora o acréscimo dos biofertilizantes não tenha contribuído para um aumento da eficiência da biodegradação do LTA e do LE, as características físico-químicas, bem como a baixa toxicidade apresentada após o processo de biodegradação, indicam que esses resíduos, após a estabilização da matéria orgânica podem representar bons materiais para uso como condicionantes agrícolas.

Palavras chaves: *Daphnia similis*, *Artemia salina*, toxicidade, biodegradação, bioestimulação, bioaumentação.

4.1 INTRODUÇÃO

A população mundial em 2022 atingiu 8 bilhões de pessoas e, juntamente com o desenvolvimento urbano e econômico, implicará na geração e no aumento de quantidade imensa de resíduos sólidos, incluindo aqueles provenientes do tratamento das águas bruta e residual (NGUYEN *et al.*, 2022; UNPD, 2022). A taxa global estimada de lodo de esgoto produzido por ano é de, aproximadamente, 45 milhões de toneladas, em massa seca (ZHANG *et al.*, 2017; YASIR, 2020). Adicionalmente, o lodo resultante do tratamento da água bruta também é produzido em quantidades exorbitantes, representando cerca de 1 a 3% do volume a cada litro de água tratada (TURNER *et al.*, 2019).

Neste contexto, frente à imensa quantidade produzida e por apresentar propriedades químicas e estruturais adequadas, estudos propõem diferentes alternativas para sua reutilização, além das mais usuais, como o descarte em aterros sanitários ou corpos d'água (RAHEEM *et al.*, 2018; FRISTAK *et al.*, 2018). Entre essas alternativas incluem-se: produção de biogás por sistema anaeróbio; correção de solos, uma vez que contém micronutrientes de interesse para agricultura, como fósforo e potássio (KUMAR *et al.*, 2017); na indústria de construção civil, como parte da mistura do cimento para produção de blocos de concreto (LIU *et al.*, 2020), pirólise, entre outros. Além disso, a utilização concomitante desses dois resíduos associados apresenta grande potencialidade agrícola, pelo caráter mais mineral do lodo de tratamento de água (LTA) e mais orgânico do lodo de esgoto (LE) (FRANCO *et al.*, 2021). No entanto, muitos desses processos acabam sendo inviáveis, pois os LTA e o LE carregam contaminantes, que incluem microrganismos, inclusive os patogênicos, metais pesados, compostos orgânicos e inorgânicos (FIJALKOWSKL *et al.*, 2017; GODLEWSKA *et al.*, 2022; QRENAWI; RABAH, 2021).

Tais resíduos quando descartados diretamente em sistemas aquáticos e terrestres alteram os aspectos físicos e químicos e geram mudanças na composição da microbiota dos sistemas (MOHELICIC, 2018; YASIR, 2020; YESIL *et al.*, 2021). A introdução recorrente desses lodos no ambiente pode provocar alterações deletérias à biota e prejudicar diretamente a saúde humana, devido à sua toxicidade (HARDER *et al.*, 2017). Diante deste fato, estudos que propõem compreender a toxicidade, a estabilidade no ambiente e a composição dos LTA e LE são indispensáveis para proporcionar melhor disposição final e, conseqüentemente, a valorização desses resíduos, incentivando a economia circular (CHANG *et al.*, 2020; TONY, 2022).

Para viabilizar o aproveitamento de lodos de uma forma mais sustentável, ensaios de biodegradação associados a testes ecotoxicológicos têm sido propostos para se conhecer o seu real efeito quando introduzidos no ambiente (MAZZEO *et al.*, 2015; SOMMAGGIO *et al.*, 2018; FRANCO *et al.*, 2017; FRANCO *et al.*, 2021). A biodegradabilidade de resíduos em solo pode ser facilmente avaliada por testes de respirometria, os quais relacionam o potencial de degradação da amostra a partir da taxa de respiração da biomassa microbiana (DSOUZA *et al.*, 2022). Ainda, a adição de indutores biológicos pode auxiliar no processo de biodegradação, acelerando a mineralização de compostos tóxicos e favorecendo a estabilização da matéria orgânica por meio da bioestimulação e/ou bioaugmentação (MAZZEO *et al.*, 2020; REGO *et al.*, 2014).

Testes de toxicidade têm sido cada vez mais estudados em processo de biorremediação para avaliar a diminuição do efeito tóxico de substâncias nocivas aos organismos vivos (LAITANO; MATIAS, 2006). Vários organismos testes são usualmente empregados nestes ensaios, como algas (REGINATTO; KUNST; DURÁN, 1999), peixes, microcrustáceos (SHAW; CHADWICK, 2018; KIM *et al.*, 2009), bactérias (BULICH, 1992), plantas (FRANCO *et al.*, 2017; ALAM *et al.*, 2007; GUNDERSON *et al.*, 1997), anelídeos (VAN, 1995; ABNT, 2014), entre outros. Dentre os organismos-testes utilizados para a avaliação do potencial tóxico de lixiviados e solubilizados de resíduos, as espécies *Daphnia similis* (SOTERO-SANTOS; ROCHA; POVINELLI, 2005) e a *Artemia salina* (EL FELS; HAFIDI; OUHDOUCH, 2016) vêm sendo empregadas pela sua alta sensibilidade e possibilidade de compreensão do impacto desses resíduos sobre os recursos hídricos.

Apesar de diversos estudos buscarem por uma solução viável para seu aproveitamento, o LTA e o LE ainda constituem um sério problema, devido ao grande volume de produção e à sua carga poluidora ao ambiente (EID *et al.*, 2020; FRANCO *et al.*, 2022;

GAO *et al.*, 2020; KREJCIRIKOVA *et al.*, 2019; LISHA *et al.*, 2018). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a biodegradação desses resíduos, isolados e em associação, por ensaios respirométricos e comparar a efetividade da adição de dois diferentes biofertilizantes neste processo, para possíveis utilizações como condicionante de solo para agricultura. Adicionalmente, a toxicidade inicial dos resíduos, bem como a de subprodutos formados durante o processo de biodegradação, determinada a partir de ensaios com *Daphnia similis* e *Artemia salina*, também foi investigada.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta do lodo de tratamento de água e o do lodo de esgoto

O LTA utilizado neste estudo foi obtido em uma Estação de Tratamento de Água (ETA) de abastecimento público no município de Rio Claro- SP (coordenadas geográficas 22°24'21" S e 47°33'19" W), sendo coletado durante a lavagem de um dos decantadores (Com baldes previamente sanitizados com hipoclorito de sódio (água sanitária) para coleta de lodo de ETA e ETE). O lodo de esgoto (LE) proveniente do sistema de tratamento com Lodo ativado e RAFA, foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETA) Jardim Conduta, também localizada no município de Rio Claro- SP, nas seguintes coordenadas 22°25'43" S e 47°32'55" W. Após a coleta, os lodos foram armazenados em câmara fria, em temperatura variando de 4 °C a 7 °C, por um período de 15 dias, e posterior seu processamento.

4.2.2 Coleta de Solo

A escolha do solo se deu pelo fato de já está caracterizado, quanto sua composição granulométrica e ter sido usado por Franco (2019). O solo foi coletado nas dependências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), localizada no município de Rio Claro- SP, nas

seguintes coordenadas geográficas 22°23'48"S e 47°32'38"W. Este solo apresenta-se caracterizado quanto à sua composição granulométrica (Tabela Suplementar 1), presença de macro e micronutrientes e condutividade elétrica (Tabela Suplementar 2).

4.2.3 Caracterização físico-química das amostras de lodos

4.2.3.1 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Foram adicionadas 10 g de cada amostra em béqueres de 50 mL, contendo 25 mL de água destilada. Em seguida, as soluções foram homogeneizadas em agitador magnético e deixadas em repouso para decantação do material em suspensão por 1 hora. Então, as amostras foram agitadas novamente e mensuradas em pHmetro (DONAGEMA *et al.*, 2011).

4.2.3.2 Quantificação de Umidade e Sólidos Totais

Para quantificar a presença de água adicionou-se, em cápsulas previamente taradas, 10 g de cada amostra, seguida por secagem em estufa a 105 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o dessecador e, após resfriamento, foram pesadas. As análises foram realizadas em triplicata. A umidade foi calculada pela diferença da massa antes e após a secagem. A porcentagem de sólidos totais foi obtida a partir da relação entre a massa seca e a massa úmida, multiplicada por 100 (APHA *et al.*, 1998).

4.2.3.3 Quantificação de Matéria Orgânica (MO)

A quantidade de MO presente nas amostras foi obtida pelo método de calcinação, no qual as amostras previamente secas a 105°C foram calcinadas em mufla a 550°C por 3 horas. Após o resfriamento da mufla, as amostras foram retiradas e levadas ao dessecador, e

por fim, foram pesadas (KIEHL, 1985). A MO foi calculada pela diferença entre a massa seca a 105 °C e a massa final do material incinerado a 550°C, dividido pela sua massa seca.

4.2.3.4 Quantificação de carbono orgânico (CO)

A partir dos valores de teor de matéria orgânica das amostras, foi calculada a porcentagem de carbono orgânico (CO) utilizando a equação $CO = 0,425 \times MO - 2,064$, a qual permite a conversão do valor de matéria orgânica presente em resíduos orgânicos, obtido pelo método da mufla, em carbono orgânico (CARMO; SILVA, 2012). Para o solo e para os inóculos, o CO foi obtido multiplicando o fator de van Bemmelen de 0,58 pela quantidade de MO quantificada (HEATON; FULLENI; BHATTACHARYYA, 2016).

4.2.4 Capacidade de Campo

Para determinação da capacidade de campo, as amostras foram acondicionadas em funis contendo filtros de algodão. Então, adicionou-se água destilada até a sua completa saturação. Para evitar perda de água por evaporação, os funis foram vedados com filme de PVC. Aguardou-se o escoamento da água em excesso por 24 horas. A seguir, 10 g de cada amostra saturada foram transferidas para cápsulas de porcelana previamente taradas mantidas e submetidas a secagem a 105 °C por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram submetidas a pesagem. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Então, calculou-se a capacidade de campo pela diferença entre as massas do solo saturado e após a sua secagem, descontando a quantia inicial de água apresentada pela amostra, antes de sua saturação (obtida a partir da determinação do teor de umidade).

4.2.5 Ensaio de biodegradação por respirometria

Para a promoção da biodegradação dos resíduos estudados, utilizou-se o método de Bartha e Pramer (1965), seguindo a norma 307 da OECD (2002). O CO₂ produzido durante o período de incubação resultante da respiração dos microrganismos presentes nas amostras foi capturado em solução de KOH (0, 25 M) e quantificado pelo método eletroquímico a partir de leituras de condutividade (STROTMANN *et al.*, 2004), amostras foram lidas em dias variáveis..

4.2.6 Construção da reta de calibração

Antes de iniciar os experimentos de respirometria, foram preparadas 7 diferentes soluções com volumes definidos de KOH 0,25 M e K₂CO₃ 0,125 M, as quais foram medidas em condutivímetro. Então, uma reta analítica foi construída baseada na mensuração dos valores de condutividade dessas soluções (Equação 1).

$$y = -89,387 * x + 1571,7 \quad (\text{Equação 1})$$

A equação de regressão linear obtida foi usada para transformar a condutividade das amostras em micromol de CO₂ produzido, considerando que a partir da reação de CO₂ com KOH, cada mol de CO₂ produz um mol de CO₃⁻², conforme a equação 2.



4.2.7 Inóculo

Na tentativa de se promover uma aceleração na biodegradação dos resíduos estudados, dois diferentes biofertilizantes foram empregados como inóculo no ensaio de respirometria. O inóculo I (In I) corresponde a um composto sólido fermentado a base de

palha de arroz, melaço de cana de açúcar, farelos e tortas de origem vegetal e rico em microrganismos, disponível comercialmente e classificado como fertilizante orgânico composto classe A (Bokashi). O inóculo II (In II), também comercialmente disponível foi fornecido pela empresa Microgeo, localizada na cidade de Limeira, caracteriza-se por ser um biofertilizante líquido constituído por compostos orgânicos, microrganismos (bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas), metabólitos e quelatos organominerais. O In II é produzido a partir da fermentação contínua, em meio líquido e em sistema de batelada.

4.2.8 Ensaio de Respirometria

O ensaio que avalia a biodegradação por respirometria foi realizado a partir do preparo de 12 diferentes tratamentos, contendo solo, inóculo (I e II), LTA e/ou LE, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Montagem dos tratamentos para o ensaio de respirometria.

Tratamentos	Solo (g)	In I (g)	In II (mL)	LTA (g)	LE (g)
Tratamento 1	50	-	-	-	-
Tratamento 2	47,5	2,5	-	-	-
Tratamento 3	47,5	-	2,5	-	-
Tratamento 4	47,5	-	-	-	2,5
Tratamento 5	47,5	-	-	2,5	-
Tratamento 6	45	-	-	2,5	2,5
Tratamento 7	42,5	2,5	-	2,5	2,5
Tratamento 8	42,5	-	2,5	2,5	2,5
Tratamento 9	45	2,5	-	2,5	-
Tratamento 10	45	-	2,5	2,5	-
Tratamento 11	45	2,5	-	-	2,5
Tratamento 12	45	-	2,5	-	2,5

In I (Inóculo I); In II (Inóculo II); LTA (Lodo de Tratamento de Água); LE (Lodo de Tratamento de Esgoto)

As porcentagens utilizadas dos Lodos e inóculos foram escolhidas com base dos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa, Franco (2019) e Guerra (2005).

Cada frasco de respirômetro recebeu 50g de cada tratamento, a uma capacidade de campo ajustada para 60%. Ao braço menor do respirômetro, foram adicionados 10 mL da solução de KOH 0,2 M. A produção de CO₂ foi quantificada por meio de leituras de condutividade retirando-se as amostras de solução de KOH onde o CO₂ foi capturado com o auxílio de uma seringa. A cada leitura efetuada, a solução de KOH era renovada e os respirômetros eram oxigenados durante 1 minuto através dos filtros de cal sodada para manter a aerobiose do sistema. O ensaio foi realizado em quintuplicata por um período de 68 dias, em temperatura ambiente 25°C ± 5.

Após a finalização das leituras e conversão da condutividade medida em CO₂ produzido, esses valores foram utilizados para estimar a quantidade total de compostos orgânicos mineralizados, a partir do cálculo da taxa de eficiência da biodegradação (EB) apresentado na equação 3.

sendo:

EB= Total de carbono biodegradado na amostra (μmol) x 100 / Quantidade de carbono orgânico inicial na amostra (μmol) (Equação 3)

Considerando-se que 50% do carbono biodegradado é convertido a CO₂ e a outra metade é incorporada ao solo como húmus ou biomassa, estima-se que o total de carbono biodegradado seja relativo ao dobro da quantidade de CO₂ produzida (FRANCO *et al.*, 2022). Enquanto o carbono orgânico inicial de cada amostra foi obtido como descrito na seção 4.2.3.4

4.2.9 Quantificação de bactérias heterotróficas totais e fungos dos tratamentos iniciais e finais

Em Erlenmeyers de 125 mL contendo 90 mL de solução salina (0,85%) estéril, foram adicionados 10 g de cada tratamento. Posteriormente, os frascos foram agitados em agitador orbital por 10 minutos a 120 rpm. Em seguida, foram realizadas diluições decimais. Para a contagem de bactérias heterotróficas, utilizou-se a técnica de *Pour Plate* em meio *Plate Count Agar* (PCA), sendo as placas incubadas a 37 °C por 48 horas. Os fungos foram quantificados pela técnica de espalhamento em superfície em meio Agar Sabouraud Glicose 2%, seguido por incubação a 28 °C por 7 dias.

4.2.10 Ensaios de Toxicidade

Os ensaios de toxicidades foram realizados com os solubilizados aquosos dos tratamentos, antes e após os ensaios de respirometria. Os solubilizados aquosos foram preparados segundo as normas da NBR 10.006 (ABNT, 2004). Para isso, adicionou-se 125 g de cada uma dos tratamentos, onde as quintuplicatas foram misturadas para se ter a massa de 125 g e então adicionados em 500 mL de água destilada em béqueres de 1000 mL. Então, cada uma das amostras foi agitada por 5 minutos e, após, permaneceram em repouso por 7 dias a 25 °C ± 2 °C para decantação. Posteriormente, os sobrenadantes de cada recipiente foram filtrados e os solubilizados obtidos foram utilizados nos ensaios de toxicidade.

4.2.11 Ensaios de Toxicidade Aguda

4.2.11.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Foram utilizados neonatos de *D. similis* com cerca de 20 horas de vida, com cultura de fêmeas já estabelecidas. Foram empregados 5 microcrustáceos, os quais foram

adicionados em tubos de ensaios contendo os respectivos solubilizados aquosos com diluições 100; 50; 25; 12,5 e 5%, sendo o volume final dos tubos de 10 mL. A seguir, os tubos com os microcrustáceos foram deixados na incubadora, na ausência de luz, a 20 °C por 48 horas. Posteriormente, foi realizada a quantificação de organismos vivos e o cálculo do CL₅₀ a partir do método Trimmed Spearman-Kärber, usando o software JSPEAR (HAMILTON *et al.*, 1977). O controle de sensibilidade desse microcrustáceo foi feito com 1 g/L de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) .

4.2.11.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Os cistos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial aerada e com iluminação constante por 48 horas. Após a eclosão dos cistos, os náuplios jovens, com idade de até 48 horas, foram submetidos a teste de sensibilidade perante ao sulfato de zinco, onde 10 organismos foram adicionados em cada tubo de ensaio, contendo 10 mL de amostra teste com diferentes diluições e em 3 réplicas. Após esta etapa, novos cistos foram incubados em água do mar artificial e os náuplios que eclodiram foram usados para avaliar a toxicidade das amostras (SILVA, 2002). Foram utilizados 30 indivíduos para triplicatas, seguindo as seguintes diluições: 100, 50, 25, 12 e 5 %. Ao final, foi usado o método Trimmed Spearman-Kärber, software JSPEAR para calcular o CL₅₀ (HAMILTON *et al.*, 1977). O controle de sensibilidade desse microcrustáceo foi feito com 1g/L de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização físico-química

Dentre as características físico-químicas de resíduos orgânicos com potencialidade agrícola, a avaliação do pH é de extrema importância, já que essa medida

reflete diretamente na qualidade e na produtividade da cultura (HAMDI *et al.*, 2019). Além disso, o pH é um fator determinante para o crescimento e metabolismo microbiano (SHAH *et al.*, 2021). No presente estudo, ambos os lodos avaliados apresentaram características próximas da neutralidade, com valores de pH de 6,92 para o LE e de 7,02 para o LTA. Lodos de caráter alcalino (>12) podem ser potencialmente tóxicos para invertebrados de solo (RENAUD *et al.*, 2017) e lodos ácidos podem interferir nos processos químicos e biológicos do solo, além de afetar a disponibilidade dos nutrientes (PEREIRA *et al.*, 2020), limitando o seu uso agrícola. Embora a variação do pH desses resíduos depende diretamente das condições empregadas durante o processo de tratamento (PEREIRA *et al.*, 2020; QRENAWI; RABAH, 2021), os lodos aqui estudados apresentaram valores bastante satisfatórios para esse quesito, considerando um possível uso agrícola.

Os resultados da caracterização físico-química do LTA, LE, solo e inóculos: In I e In II, em termos de teor de água, matéria orgânica e carbono estão apresentados na tabela 2.

O LE apresentou teor de umidade de 83%, seguido respectivamente, pelo LTA (14,67%), Inóculo I (10,74%), Inóculo II (99,92%) e solo (11,83%) a diferença do inóculo I e II é que o In I é um inóculo sólido, por isso, tem uma umidade menor, enquanto o In II é líquido o que explica esta diferença entre um ser mais úmido que o outro. A umidade interfere na microbiota responsável pelo catabolismo de compostos de origem orgânica e inorgânica e, conseqüentemente, reflete no desempenho da biodegradação (PRADO-JATAR *et al.*, 1993; DIBBLE; BARTHA.,1979). Tal fato justifica a importância de ajustes da capacidade de campo das misturas contidas nos respirômetros.

Em termos de matéria orgânica, como esperado, o LE apresentou uma elevada quantidade, apresentando valores superiores a 5 vezes a porcentagem observada para o solo.

Já o LTA possui uma característica mais mineral com elevada quantidade de cinzas (2,5 vezes superior a do LE), apresentando cerca de 4 vezes menos matéria orgânica que o LE, embora seja 1,2 vezes superior à quantidade presente no solo utilizado. Desse modo, a associação desses dois resíduos constitui uma formulação interessante para condicionadores de solos agrícolas, como já demonstrado por outros autores (FRANCO *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022; SOUZA, 2021). Adicionalmente, a incorporação de biofertilizantes também pode auxiliar neste sentido, por apresentarem quantidades elevadas de matéria orgânica (tabela 2), além de serem fontes potenciais de microrganismos.

Tabela 2. Caracterização físico-química em porcentagem do LTA, LE, biofertilizantes (In I e In II) e solo.

Amostra	Umidade %	Massa seca %	Cinzas %	Matéria Orgânica (MO) %	Carbono Orgânico (CO) %
LTA	14,7 ± 0,05	85,3 ± 0,05	84,5 ± 0,06	15,5 ± 0,06	4,52 ± 0,02
LE	83,9 ± 0,33	16,1 ± 0,33	32,9 ± 0,08	67,0 ± 0,08	26,4 ± 0,03
In I	10,7 ± 0,88	89,2 ± 0,88	26,1 ± 0,56	73,8 ± 0,59	42,8 ± 0,34
In II	99,9 ± 0,04	0,08 ± 0,04	41,1 ± 0,89	58,9 ± 0,99	38,1 ± 0,91
Solo	11,8 ± 0,17	88,1 ± 0,17	87,2 ± 0,05	12,8 ± 0,05	7,41 ± 0,03

O conhecimento das características químicas dos resíduos permite considerações para avaliar o processo de biodegradação. Na tabela 3, estão registradas as características químicas dos lodos *in natura* LTA e LE utilizados, quanto à presença de compostos inorgânicos. Contudo, as características químicas podem sofrer alterações com a sazonalidade regional (HAIDONG *et al.*, 2020). Elementos químicos como fósforo, potássio, cálcio e magnésio são essenciais para o desenvolvimento das plantas (NADEEM *et al.*, 2018). Já os micronutrientes: sódio, zinco, cobre, manganês e ferro, elementos químicos presentes nos lodos estudados, estão envolvidos em diversos processos, incluindo fotossíntese e atividades enzimáticas (SIDHU *et al.*, 2019).

Tabela 3. Caracterização química dos lodos de LTA e LE

Elementos químicos	Lodos		Valores orientadores CONAMA (2020) em mg/Kg	EUA – USEPA 40 CFR/503 (mg/Kg)	Comunidade Europeia - Diretiva 86/278 EEC (mg/Kg)
	LTA	LE			
Fósforo Total (%)	47	5,59	NV	NV	NV
Potássio Total (%)	0,24	0,73	NV	NV	NV
Cálcio (%)	1,06	11,5	NV	NV	NV
Magnésio (%)	0,26	0,52	NV	NV	NV
Sódio (%)	0,07	0,16	NV	NV	NV
Zinco (%)	2,09	0,12	2800	2800	2500-4000
Cobre (%)	0,05	0,04	1500	1500	1000-1750
Manganês (%)	0,22	0,02	NV	NV	NV
Ferro (%)	18,9	1,20	NV	NV	NV
Cobalto (%)	-	-	NV	NV	NV
Níquel (mg/Kg)	7,11	27,1	420	420	320-400
Cádmio (mg/Kg)	-	0,50	39,0	39,0	20-40
Cromo (mg/Kg)	53,1	88,6	1000	NV	NV
Chumbo (mg/Kg)	79,1	26,5	300	300	750-1200

-= Não foi detectado a presença do elemento químico.

NV= Não há valores orientados

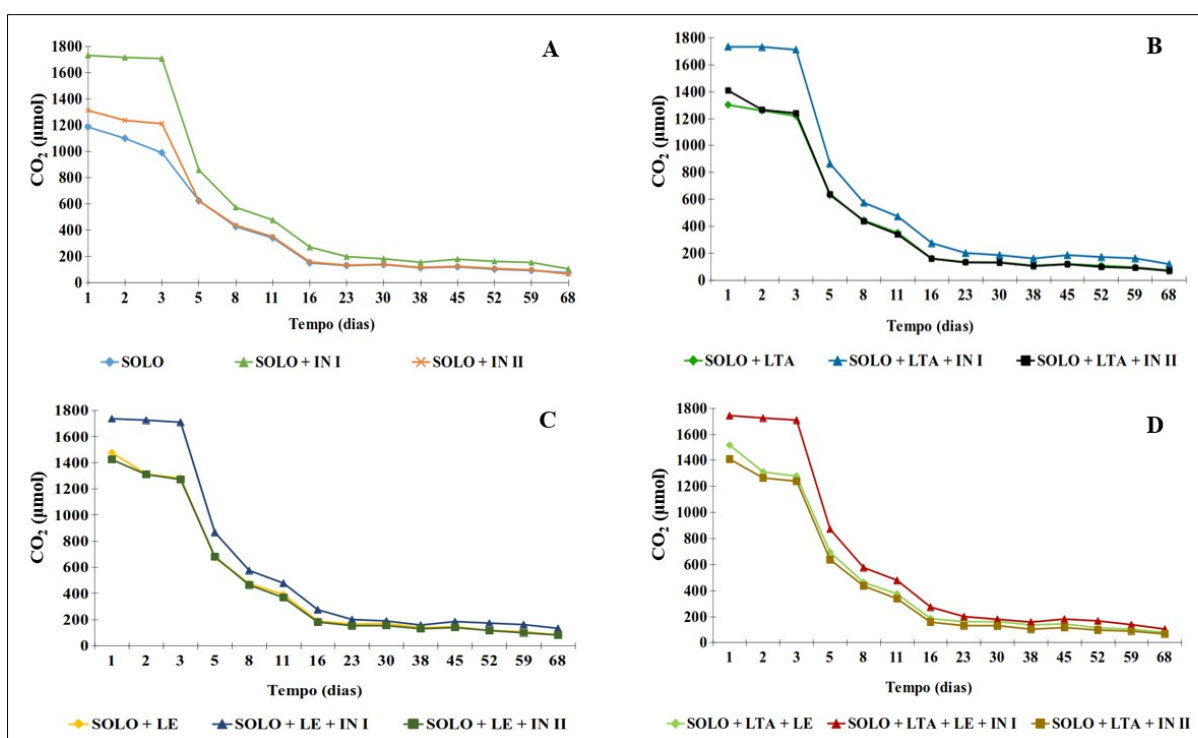
Além da presença desses elementos, também foi possível constatar a presença de metais pesados, os quais, quando presentes em altas concentrações, podem impedir o aproveitamento desses resíduos por sua elevada periculosidade ao ambiente. Para o LE, os valores dos metais quantificados neste estudo (tabela 3), encontram-se abaixo dos limites permitidos pela Resolução CONAMA n° 498/2020 (BRASIL, 2020), para a utilização do LE, de origem sanitária, em solos agrícolas. Dentre os 4 metais analisados (cádmio, chumbo, cromo e níquel), todos apresentaram concentração, pelo menos, 11 vezes inferior ao estabelecido pela legislação. O LTA estudado apresentou valores ainda mais baixos de metais, com exceção apenas do chumbo (tabela 3). Como, no Brasil, não existe uma norma específica para aproveitamento do LTA em solos, utilizando o CONAMA n° 498/2020 (BRASIL, 2020) para LE como referência, observa-se que o mesmo também se encontra abaixo dos limites orientadores determinados por essa resolução. Tal fato, ressalta a possibilidade de uso agrícola desses resíduos.

4.3.2 Avaliação da biodegradabilidade do LTA e LE no solo por suplementação de inoculantes

A biodegradação avaliada mediante a evolução de CO₂ produzido nos respirômetros demonstra que a produção de CO₂, nos primeiros 3 dias foi mais intensa, e que, gradualmente, foi diminuindo a partir do terceiro dia de experimento, essa fase mais intensa é devido a grande atividade microbiana que, conseqüentemente, diminui com passar dos dias. A partir desse período, observa-se a estabilização na produção de CO₂ até os 68 dias de acompanhamento (Fig. 5). A manutenção dos níveis de CO₂ foi relacionada ao processo de estabilização da matéria orgânica presente nos tratamentos. Franco *et al.* (2022) relataram constância nas taxas de CO₂ em amostras contendo LE e LE misturado ao LTA, apenas após 42 dias de biodegradação em solo. Isso indica que as concentrações utilizadas para a

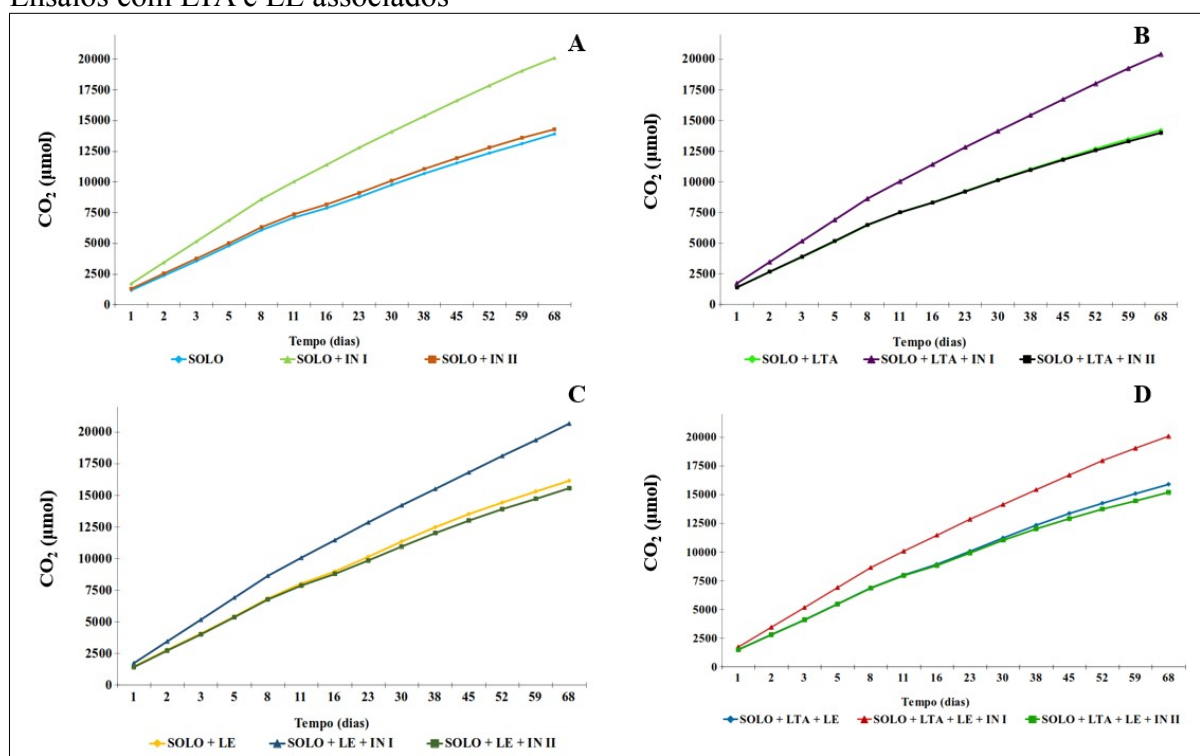
incorporação de cada resíduo no solo, bem como a adição de microrganismos adicionais aos originalmente presentes nas amostras possibilitaram a aceleração do processo. Sabe-se que a adição de fontes de carbono, bem como a incorporação de um *pool* de microrganismos pode favorecer positivamente o processo de biodegradação (RIMKUS *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2021).

Figura 5: Acompanhamento da produção diária de CO₂ no período de 68 dias de biodegradação. A. Ensaios Controles; B. Ensaios com LTA; C. Ensaios com LE; D. Ensaios com LTA e LE associados.



com o inóculo I, devido a maior quantidade de matéria orgânica, sendo o tratamento que continha LE, o que apresentou valores sutilmente mais elevados para esse parâmetro em relação aos tratamentos com LTA e com LTA e LE associados (Figura 6). A presença do inóculo II nos tratamentos levou a produção de CO₂ de, pelo menos, 1,3 vezes menor que o respectivo tratamento contendo o inóculo I.

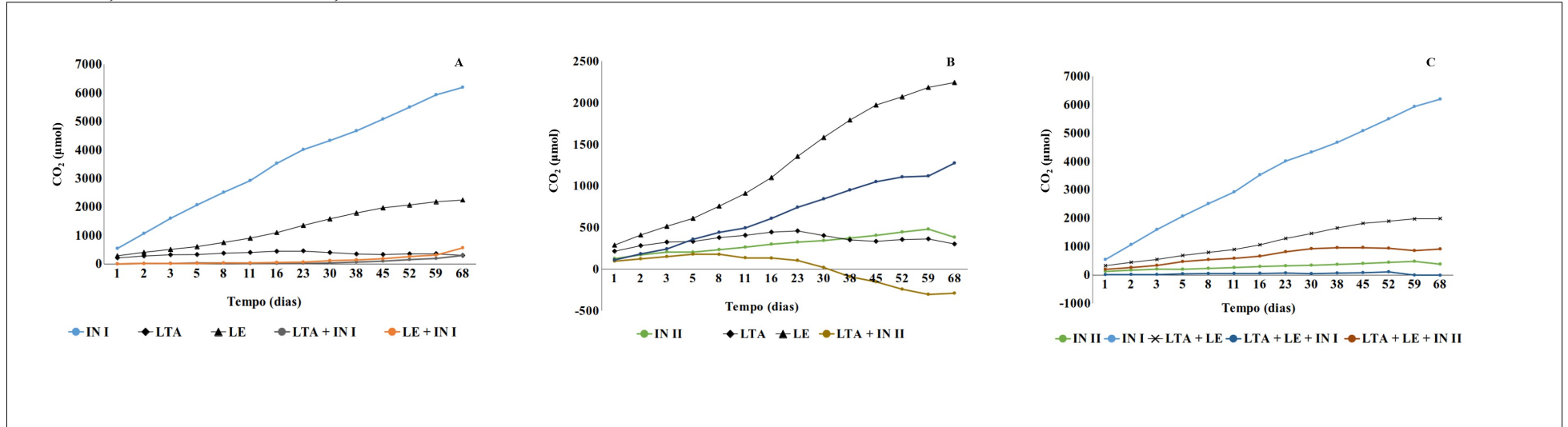
Figura 6: Produção de CO₂ acumulada durante os experimentos respirométricos em 68 dias de biodegradação. A. Ensaios Controles; B. Ensaios com LTA; C. Ensaios com LTA; D. Ensaios com LTA e LE associados



Contudo, pode-se observar, a partir dos resultados expressos na figura 7, que o aumento da produção de CO₂ em decorrência da presença do inóculo I é devido, principalmente, à degradação de compostos orgânicos presentes nesse próprio inóculo. Uma vez que, quando consideramos apenas o CO₂ produzido a partir da degradação dos lodos na ausência do inóculo I, os valores são mais elevados do que quando houve a adição deste inóculo (Figura 7A). Tal fato pode ser justificado pela presença de compostos orgânicos que foram mais facilmente assimilados pelos microrganismos, frente aqueles presentes no LTA e LE. Segundo Queiroz e Céspedes (2019), o inóculo utilizado (Bokashi), além de conter uma alta diversidade de microrganismos como fungos, bactérias e actinomicetos, também contém uma alta concentração de matéria orgânica e nutrientes. Como pode ser visualizado na Tabela 3, o inóculo I continha a maior quantidade de matéria orgânica dentre todos os outros materiais avaliados. Quanto ao inóculo II, sua incorporação aos lodos também levou à

diminuição da taxa de respiração microbiana quando comparada àquelas dos tratamentos de LTA e LE, sem a adição deste inóculo (Figura 7B). Quanto à associação dos lodos LTA e LE, nenhum dos inóculos estudados proporcionou o aumento da produção de CO₂ (Figura 7C).

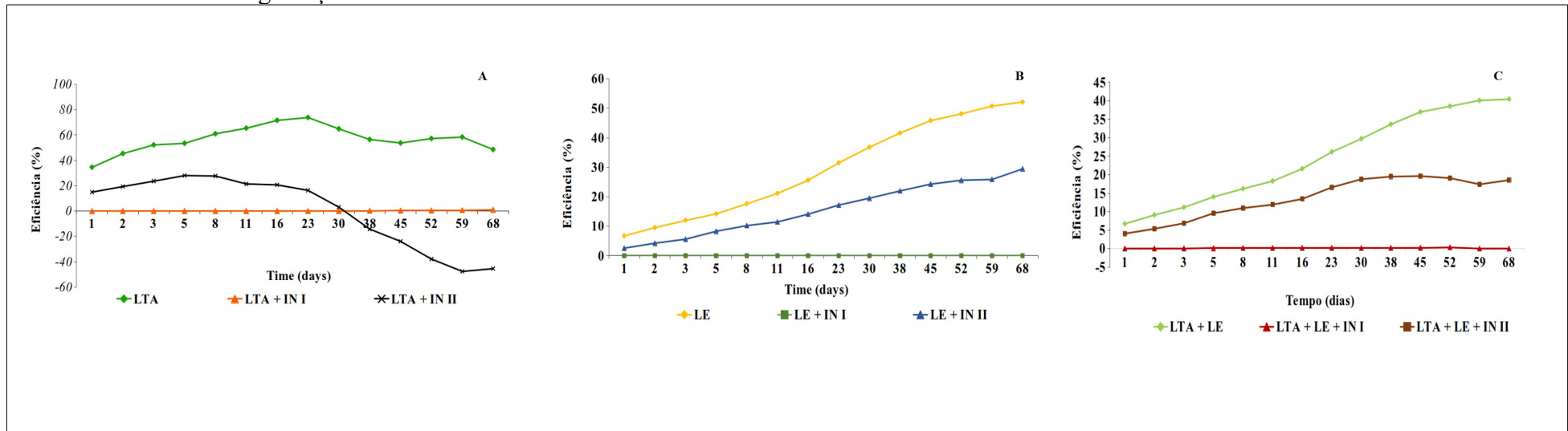
Figura 7: Produção de CO₂ acumulada devido à biodegradação dos lodos sob ação dos biofertilizantes (evolução de CO₂ dos tratamentos, subtraindo-se os controles: solo; solo + inóculo I; solo + inóculo II) no período de 68 dias. A. Ensaio com LTA, LE e Inóculo I ; B. Ensaio com LTA, LE e Inóculo II; C. Ensaio com LTA, LE e associados com Inóculo I e II.



Considerando apenas a assimilação do C proveniente do LTA e LE, ou seja, excluindo o C provindo do solo ou dos inóculos, foi possível calcular a eficiência da biodegradação desses resíduos (Figura 8). Desse modo, observa-se eficiência máxima de biodegradação do LTA superior a 70%, após 23 dias do processo (Figura 8A). Contudo, quando avaliamos a bioaugmentação/bioestimulação, a adição dos inóculo possibilitou valor de eficiência de biodegradação do LTA bem inferior, sendo de 28% após 5 dias de biodegradação e apenas 1% no final do processo para os inóculos II e I, respectivamente (Figura 8B). Guerra (2005), ao estudar a biodegradação de LTA puro ou quando adicionado ao solo, obteve taxas de eficiência variando entre 18 a 38%. Tal variação pode estar relacionada à diferença na proporção de LE utilizada, a qual foi muito superior à utilizada no presente estudo. Resultados similares foram observados quanto à eficiência de biodegradação do LE (Figura 8B), onde a adição dos inóculos levaram à diminuição desse parâmetro. No entanto, para o LE, a maior taxa de eficiência foi verificada após 68 dias do processo, sendo de 52,1% para o tratamento sem a adição de inóculo e 29,5% para o tratamento com adição do inóculo II. Esses menores valores de eficiência observados para o LE, quando comparados aos valores do LTA, devem-se, possivelmente, à quantidade inicial de matéria orgânica do LE ser consideravelmente maior (Tabela 3), necessitando de um maior período para ser completamente assimilada. Assim como no presente estudo, a porcentagem de matéria orgânica presente nos LE de maneira geral, encontra-se entre 60 a 80% (CHANG *et al.*, 2020). Para o tratamento com o inóculo I, não houve degradação do LE, evidenciando que o carbono presente neste inóculo estava sendo mais prontamente assimilado. Quanto ao ensaio realizado com as associações de LTA e LE (Figura 8C), a suplementação com os inóculos também acarretou em diminuição da eficiência da biodegradação, sendo esta, praticamente nula quando da presença do inóculo I. Tais resultados demonstram que, para promover a biodegradação desses resíduos, os microrganismos autóctones, naturalmente presentes nas amostras de LTA e LE, são mais

eficazes neste propósito. Pelo fato desses microrganismos já estarem pré-adaptados às condições do meio, a biodegradação é mais efetiva (KUMAR; GHOSHAL, 2017). Ainda, a adição de microrganismos não indígenas (alóctones) pode levar a problemas na adaptação dos mesmos aos substratos e/ou a competição com os microrganismos autóctones, ocasionando perda de eficiência do processo de biodegradação (AZUBUIKE *et al.*, 2016).

Figura 8: Eficiência da biodegradação (%) dos tratamentos com LTA (A), LE (B) e suas associações (C) suplementados com os inoculantes (I) e (II), durante 68 dias de biodegradação.



A partir da figura 8C, nota-se que a presença de LTA diminuiu a eficiência de biodegradação do LE em torno de 10%. Franco *et al.* (2021) também relataram esse mesmo efeito, atribuindo à característica mais mineral do LTA e menor quantidade de matéria orgânica disponível neste resíduo.

4.3.3 Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos

A contagem de microrganismos no início e ao final do processo de biodegradação está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificações microbianas dos tratamentos, em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo seco), antes e após 68 dias de respirometria

Tratamentos	Bactérias x 10 ⁶		Fungos totais x 10 ⁵	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Solo	14,29	5,97	15,62	17,66
In I	3,21	63,11	113,03	13,02
In II	13,48	2,47	7,53	9,72
LTA	2,690	1,65	9,86	14,88
LE	12,14	2,35	5,10	10,92
LTA+LE	11,21	9,74	12,63	23,66
LTA+LE+ In I	121,57	43,62	63,83	25,37
LTA+LE+ In II	21,65	20,37	16,5	9,51
LTA+ In I	98,81	38,83	35,61	43,1
LTA+In II	5,46	4,00	9,39	19,67
LE+In I	178,29	10,8	62,45	28,41
LE+In II	161,12	9,49	6,61	18,67

Em relação às bactérias heterotróficas, verificou-se diminuição numérica na comunidade bacteriana na fase final dos experimentos quando comparada com a fase inicial. Em processos de decomposição de resíduos orgânicos, esse decréscimo no número de bactérias é relacionado com uma queda na quantidade de matéria orgânica facilmente assimilável e ao elevado grau de maturação do composto final produzido (RASTOGI; NANDAL; KHOSLA, 2020). A exceção foi o tratamento contendo solo e inóculo I, o qual apresentou aumento de quase 20 vezes na quantidade de bactérias heterotróficas no final do processo. Tal fato pode ser justificado pela maior concentração de matéria orgânica presente nesse inóculo frente aos demais. Corroborando com Rastogi *et al.*, (2020), que em seu tratamento foi o que apresentou a maior taxa de produção de CO₂. Quanto aos fungos, a tabela

4, indica aumento em sua população para a maioria dos tratamentos, possivelmente devido à diminuição do pH por conta da formação de ácidos orgânicos ao longo do processo de decomposição da matéria orgânica (BERNAL; ALBURQUERQUE; MORAL, 2009). Outro resultado importante observado é que, com exceção do tratamento contendo LTA e inóculo I, todos os outros tratamentos nos quais houve a incorporação do inóculo I, há um decréscimo na quantidade de colônias fúngicas ao final do processo de biodegradação, esse decréscimo de fungos está associado ao caráter mineral do LTA. Isso sugere que este inóculo proporciona melhores condições para o crescimento bacteriano. Ainda, a variação em alguns tratamentos, em termos de contagem microbiana, pode ter sido gerada pela competição entre fungos e bactérias pelos nutrientes disponíveis nos ensaios ou pelas substâncias metabólicas produzidas, tendo uma relação antagonista (LINDBLUM; FISCHER; TRANVIK., 2006).

4.3.4 Acompanhamento da toxicidade aguda ao longo da biodegradação

Por se tratarem de uma matriz complexa e poderem acumular diferentes contaminantes, a avaliação da toxicidade das amostras de lodos nos diferentes períodos de biodegradação é crucial, principalmente quando se objetiva seu uso agrícola (MAZZEO *et al.*, 2015). A fim de se compreender possíveis alterações no potencial tóxico dos tratamentos propostos durante o processo de biodegradação, foram realizados testes de toxicidade aguda com microcrustáceos. Para *D. similis*, nos ensaios realizados com as amostras iniciais, antes da biodegradação, os únicos tratamentos que induziram toxicidade foram o LTA+ In I e LE+ In I, apresentando valores de CL₅₀ (Concentração letal a 50% dos organismos testados) de 35,53% e 29,26%, respectivamente. Para as demais amostras, mesmo utilizando a concentração de 100% do respectivo tratamento, nenhuma toxicidade foi observada. Na avaliação utilizando *A.salina*, valores de CL₅₀ puderam ser determinados para todos os

tratamentos (Tabela 5), sendo os mais tóxicos o LTA + In I e LE + In I, coincidente aos resultados obtidos para *D. similis*, estudos atestaram a toxicidade do LTA (BERNEGOSSI *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2022; SOTERO-SANTOS *et al.*, 2005) e do LE (HAWRYLIK *et al.*, 2022; JABŁOŃSKA-TRYPUĆ *et al.*, 2019; PRABHAKAR *et al.*, 2021; VENEGAS *et al.*, 2018). Contudo, no presente trabalho, a toxicidade observada parece ser referente ao efeito combinado do LTA ou LE com o inóculo I, uma vez que esses resíduos não apresentaram toxicidade elevada quando estavam presentes isoladamente no tratamento, a toxicidade inicial do inóculo I pode está associado a sua composição ter produtos tóxicos de origem vegetal, que em algum momento foi produzido durante a sua humificação. O fato do tratamento realizado apenas com o inóculo I ter apresentado um CL₅₀ de 53,5% para o teste com *A. salina*, sendo o terceiro tratamento mais tóxico, depois do tratamento LTA + In I e LE + In I houve uma diminuição da toxicidade, reforçam essa possibilidade.

Tabela 5. Diminuição da toxicidade com *Artemia salina*, mediante a análise da CL₅₀ após processo de biodegradação.

Tratamento	Inicial (CL ₅₀)	Final (CL ₅₀)	Decaimento da toxicidade
Solo	80,29	81,49	-1,20
In I	53,48	83,44	-29,96
In II	82,79	88,73	-5,94
LTA	91,26	90,02	1,24
LE	79,51	89,22	-9,72
LTA+ LE	86,32	90,63	-4,31
LTA+ LE + In I	65,87	92,66	-26,79
LTA+ LE + In II	91,57	90,13	1,44
LTA + In I	43,11	89,28	-46,17
LTA + In II	83,27	92,08	-8,81
LE + In I	36,20	68,00	-31,81
LE + In II	84,75	89,45	-4,70

No entanto, após o período de 68 dias de biodegradação, observou-se a completa eliminação da toxicidade dos tratamentos (9) LTA + In I e (11) LE + In I sob para *D. similis* no período final, bem como uma diminuição desse efeito para *A. salina* de cerca de 32% e

46% tratamentos (9) LTA + In I e (11) LE + In I, respectivamente. Tais resultados indicam que o processo de biodegradação empregado foi positivo na eliminação da toxicidade observada para estes tratamentos, além de não acarretar na formação de metabólitos tóxicos (que justifica o tratamento final com a diminuição da toxicidade para *A. salina* e diminuição total para *D. similis*, o que inviabilizaria o uso agrícola do material biodegradado. Ao estudarem possibilidades de tratamento do LE, Mazzeo *et al.* (2020) consideraram a biodegradação aeróbia como um procedimento fundamental para atenuar a toxicidade inicial apresentada por esse resíduo. Segundo Zhang *et al.* (2019), a toxicidade aguda está diretamente correlacionada com o grau de humificação da matéria orgânica. Assim, a eliminação do efeito tóxico observado para as amostras antes do período da biodegradação, indicam que houve a estabilização do alto conteúdo de matéria orgânica presente nesses tratamentos.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados das análises físico-químicas indicam que os resíduos estudados atendem os critérios exigidos para a aplicação em solos agrícolas, em termos de pH, nutrientes e baixa concentração de metais pesados, o que sugere uma possibilidade de aproveitamento desses lodos. Adicionalmente, as amostras de LTA e LE, isoladas ou em associação, apresentaram baixa toxicidade para os microcrustáceos aquáticos.

A suplementação dos tratamentos com os biofertilizantes levou a aumento na produção de CO₂ apenas para aqueles nos quais foram adicionados o In I. Contudo, ao avaliar a eficiência de biodegradação relativa dos lodos, observou-se que esta é mais alta quando não houve a incorporação dos biofertilizantes. Assim, os biofertilizantes escolhidos para promover a bioaumentação/bioestimulação dos lodos não acarretaram na aceleração do processo de

biodegradação de LTA e LE, isolados ou em associação. Isso indica que a comunidade autóctone desses lodos é mais efetiva na promoção de sua estabilização.

Além disso, a interação entre o biofertilizante In I e o LTA ou LE levou ao aumento da toxicidade observada para *D. similis* e *A. salina*, possivelmente pela alta carga orgânica das misturas. Contudo, diminuição da toxicidade foi observada após a biodegradação, demonstrando a importância desse processo para a estabilização desses resíduos. Tal fato ressalta o baixo risco de contaminação de corpos hídricos no entorno da aplicação desses resíduos, após estabilização, em solo.

4.5 REFERÊNCIAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia terrestre – Toxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae): NBR 15537.** São Paulo. 17P, 2014.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos sólidos: classificação: NBR 10.004.** São Paulo, v. 2, 2004.

ALAM, M. S.; KAUR, G.; JABBAR, Z.; JAVED, K.; ATHAR, M. Eruca sativa L. seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 910-920, 2007.

APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2540g. Total, Fixed, and Volatile Solids in Solid and Semisolid Samples. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; American **Water Works Association**: New York, 1998.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World J Microbiol Biotechnol** 32, 180, 2016.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5444-5453, 2009.

BERNEGOSI, A. C.; FREITAS, B. L. S.; CASTRO, G. B.; MARQUES, J. P.; TRINDADE, L. F.; LIMA E SILVA, M. R.; OGURA, A. P. A systematic review of the water treatment sludge toxicity to terrestrial and aquatic biota: state of the art and management challenges. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 57, n. 4, p. 282-297, 2022.

BRASIL (2020) **Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020**. Acesso em: <http://conama.mma.gov.br/option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=797>. Em 29 de Novembro de 2022.

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. **Process Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 45-47, 1992.

CARMO-SILVA, A. E.; GORE, M. A.; ANDRADE-SANCHEZ, P.; FRENCH, A. N.; HUNSAKER, D. J.; SALVUCCI, M. E. Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 1-11, 2012.

CHANG, Z.; LONG, G.; ZHOU, J. L.; MA, C. Valorization of sewage sludge in the fabrication of construction and building materials: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 154, p. 104606, 2020.

COSTA, T. R. A. A. D.; WEBER, O. B.; PESTANA, C. J.; CAPELO-NETO, J. Bioindicators assessing water quality and environmental impacts of water treatment plant sludge. **International journal of environment and sustainable development**, v. 16, n. 1, p. 25-42, 2017.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and environmental microbiology**, v. 37, n. 4, p. 729-739, 1979.

DONAGEMA, G. K.; DE CAMPOS, D. B.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. M. Manual de métodos de análise de solo. **Embrapa Solos**, Rio de Janeiro, 2 ed, p.230, 2011.

DSOUZA, A.; KISELCHUK, C.; LAWSON, J. A.; PRICE, G. W.; DIXON, M.; GRAHAM, T. Development of an automated, multi-vessel respirometric system to evaluate decomposition of composting feedstocks. **Biosystems Engineering**, v. 224, p. 283-300, 2022.

EID, E. M.; HUSSAIN, A. A.; TAHER, M. A.; GALAL, T. M.; SHALTOUT, K. H.; SEWELAM, N. Sewage sludge application enhances the growth of *Corchorus olitorius* plants and provides a sustainable practice for nutrient recirculation in agricultural soils. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 149-159, 2020.

FELS, E.L.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y. *Artemia salina* as a new index for assessment of acute cytotoxicity during co-composting of sewage sludge and lignocellulose waste. **Waste Management**, v. 50, p. 194-200, 2016.

FRANCO, H. A.; MARTINS, G. O. M., MUSSEL, Y. L.; MORENO, S. C.; THODE FILHO, S.; MARQUES, M. R.C. Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista de Estudos Ambientais**, v. 19, n. 1, p. 36-43, 2017.

FRANCO, N, M.; LEITE, D. A. N. O.; YABUKI, L. N. M.; ZANATTA, M. B. T.; MENEGARIO, A. A.; ANGELIS, D. F.; MAZZEO, D. E. C. Biodegradability of water treatment sludge influenced by sewage sludge, focusing its use in agriculture as soil conditioner. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 10, p. 9623-9638, 2021.

FRIŠTÁK, V.; PIPÍŠKA, M.; SOJA, G.; Pyrolysis treatment of sewage sludge: A promising way to produce phosphorus fertilizer. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1772-1778, 2018.

GAO, N.; KAMRAN, K.; QUAN, C.; WILLIAMS, P. T. Thermochemical conversion of sewage sludge: A critical review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 79, p. 100843, 2020.

GODLEWSKA, P.; OLESZCZUK, P. Effect of biomass addition before sewage sludge pyrolysis on the persistence and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in biochar-amended soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 429, p. 132143, 2022.

GUERRA, R. **Caracterização e Biodegradação de Lodo de Estações de Tratamento de Água para Descarte em Aterro Sanitário**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

GUNDERSON, C. A.; KOSTUK, J. M.; GIBBS, M. H.; NAPOLITANO, G. E.; WICKER, L. F.; RICHMOND, J. E.; STEWART, A. J. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 16, n. 12, p. 2529-2537, 1997.

H Aidong, H.; Xinyu, X.; Jinfeng W.; Hongqiang.; Ren. C. Characterization of dissolved organic matter in reclaimed wastewater supplying urban rivers with a special focus on dissolved organic nitrogen: A seasonal study. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114959, 2020.

HAMDI, H.; HECHMI, S.; KHELIL, M. N.; ZOGHLAMI, I. R.; BENZARTI, S.; MOKNITLILI, S.; HASSEN, A.; JEDIDI, N. Repetitive land application of urban sewage sludge: Effect of amendment rates and soil texture on fertility and degradation parameters. **Catena**, v. 172, p. 11-20, 2019.

HAMILTON, S. L.; MCLAUGHLIN, M.; KARLIN, A. Disulfide bond cross-linked dimer in acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 79, n. 3, p. 692-699, 1977.

HARDER, R.; PETERS, G. M.; SVANSTRÖM, M.; KHAN, S. J.; MOLANDER, S.; . Estimating human toxicity potential of land application of sewage sludge: the effect of modelling choices. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 22, n. 5, p. 731-743, 2017.

HAWRYLIK, E.; BUTAREWICZ, A.; ANDRAKA, M. Toxicity assessment of sewage sludge from municipal sewage treatment plants. **Ekonomia i Środowisko-Economics and Environment**, v. 82, n. 3, p. 257-268, 2022.

HEATON, L.; FULLEN, M. A.; BHATTACHARYYA, R. Critical analysis of the van Bemmelen conversion factor used to convert soil organic matter data to soil organic carbon data: comparative analyses in a UK loamy sand soil. **Espaço Aberto**, v. 6, n. 1, p. 35-44, 2016.

JABŁOŃSKA-TRYPUC, A.; WYDRO, U.; SERRA-MAJEM, L.; BUTAREWICZ, A.; WOŁEJKO, E. The comparison of selected types of municipal sewage sludge filtrates toxicity in different biological models: From bacterial strains to mammalian cells. Preliminary Study. **Water**, v. 11, n. 11, p. 2353, 2019.

KACPRZAK, M.; NECZAJ, E.; FIJAŁKOWSKI, K.; GROBELAK, A.; GROSSER, A.; WORWAG, M.; RORAT, A.; BRATTEBO, H.; ALMAS, A.; SINGH, B. R. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. **Environmental research**, v. 156, p. 39-46, 2017.

KIEHL, E. J. Fertilizantes Orgânicos. **Agronômica Ceres**, Piracicaba, Brasil, p. 417-431, 1985.

KIM, J. W.; ISHIBASHI, H.; YAMAUCHI, R.; ICHIKAWA, N.; TAKAO, Y.; HIRANO, M.; ARIZONO, K. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 227-232, 2009.

KUMAR, C. M.; GHOSHAL, N. Impact of land-use change on soil microbial community composition and organic carbon content in the dry tropics. **Pedosphere**, v. 27, n. 5, p. 974-977, 2017.

KUMAR, V.; CHOPRA, A. K.; KUMAR, A. A review on sewage sludge (Biosolids) a resource for sustainable agriculture. **Archives of Agriculture and Environmental Science**, v. 2, n. 4, p. 340-347, 2017.

KREJCIRIKOVA, B.; OTTOSEN, L. M.; KIRKELUND, G. M.; RODE, C.; PEUHKURI, R. Characterization of sewage sludge ash and its effect on moisture physics of mortar. **Journal of Building Engineering**, v. 21, p. 396-403, 2019.

LAITANO, K. D. S.; MATIAS, W. G. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 43-47, 2006.

LISHAN, X.; TAO, L.; YIN, W.; ZHILONG, Y.; JIANGFU, L. Comparative life cycle assessment of sludge management: a case study of Xiamen, China. **Journal of Cleaner Production**, v. 192, p. 354-363, 2018.

LIU, Y.; ZHUGE, Y.; CHOW, C.; KEEGAN, A.; LI, D.; PHAM, P.; HUANG, J.; SIDDIQUE, R. Utilization of drinking water treatment sludge in concrete paving blocks: Microstructural analysis, durability and leaching properties. **Journal of Environmental Management**, v. 262, p. 110352, 2020.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60-69, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; MISOVIC, A.; OLIVEIRA, F. A.; LEVY, C. E.; OEHLMANN, J.; DE MARCHI, M. R. R. Effects of biostimulation by sugarcane bagasse and coffee grounds on sewage sludges, focusing agricultural use: Microbial characterization, respirometric assessment and toxicity reduction. **Waste Management**, v. 118, p. 110-121, 2020.

MIHELICIC, J. R. **Sludge management: Biosolids and fecal sludge. Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)**, 2018.

MILLE-LINDBLOM, C.; FISCHER, H.; J. TRANVIK, L. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. **Oikos**, v. 113, n. 2, p. 233-242, 2006.

NADEEM, F.; HANIF, M. A.; MAJEED, M. I.; MUSHTAQ, Z. Role of macronutrients and micronutrients in the growth and development of plants and prevention of deleterious plant diseases—A comprehensive review. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v. 12, p. 31-52, 2018.

NGUYEN, M. D.; THOMAS, M.; SURAPANENI, A.; MOOM, M. E.; MILENE, N. A. . Beneficial reuse of water treatment sludge in the context of circular economy. **Environmental Technology & Innovation**, v. 28, nov. 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102651>

OECD - **Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals**. Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil. Paris, France, p. 307, 2002.

PEREIRA, I. S.; BAMBERG, A. L.; SOUSA, R. O.; MONTEIRO, A. B.; MARTINAZZO, R.; SILVEIRA, C. A. P.; SILVEIRA, A. O. Agricultural use and pH correction of anaerobic sewage sludge with acid pH. **Journal of Environmental Management**, v. 275, p. 111203, 2020.

PRABHAKAR, A. K.; MOHAN, B. C.; TAY, T. S.; LEE, S. S. C.; TEO, S. L. M.; WANG, C. H. Incinerated sewage sludge bottom ash-chemical processing, leaching patterns and toxicity testing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123350, 2021.

PRADO-JATAR, M.; CORREA, M.; RODRÍGUEZ-GRAU, J.; CARNEIRO, M. Oil sludge *Landfarming* biodegradation experiment conducted at a tropical site in eastern Venezuela. **Waste Management & Research**, v. 11, n. 2, p. 97-106, 1993. doi: <https://doi.org/10.1006/wmre.1993.1011>

QRENAWI, L. I.; RABAH, F. K. J. Sludge management in water treatment plants: literature review. **International Journal of Environment and Waste Management**, v. 27, n. 1, p. 93, 2021.

QUEIROZ, M.; CÉSPEDES, C. Bokashi as an Amendment and Source of Nitrogen in Sustainable Agricultural Systems: a Review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 237-248, 2019.

RAHEEM, A.; SIKARWAR, V. S.; HE, J.; DASTYAR, W.; DIONYSIOU, D. D.; WANG, W.; ZHAO, M. Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 337, p. 616-641, 2018.

RASTOGI, M.; NANDAL, M.; KHOSLA, B. Microbes as vital additives for solid waste composting. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03343, 2020.

REGINATTO, V.; KUNST, S.; DURÁN, N. Interferences of dark coloured waters and wastewater on algae toxicity assessment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 73, n. 3-4, p. 141-152, 1999.

RÉGO, A. P. J.; REGANHAN-CONEGLIAN, C. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. CO₂ production of soil microbiota in the presence of ametryne and biofertilizer. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 12, p. 1-6, 2014.

RENAUD, M.; CHELINHO, S.; ALVARENGA, P.; MOURINHA, C.; PALMA, P.; SOUSA, J. P.; NATAL-DA-LUZ, T. Organic wastes as soil amendments—Effects assessment towards soil invertebrates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 330, p. 149-156, 2017.

RIMKUS, A.; GUDRĀ, D.; DUBOVA, L.; FRIDMANIS, D.; ALSIŅA, I.; MUTER, O. Stimulation of sewage sludge treatment by carbon sources and bioaugmentation with a sludge-derived microbial consortium. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 146989, 2021.

SANTOS, T.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A.. Phyto-genotoxicity assessment of different associations between sludges from Water and Sewage Treatment Plants, before and after the bioremediation process. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 40029-40040, 2022.

SHAH, A. S.; WAKELIN, S. A.; MOOT, D. J.; BLOND, C.; LAUGRAUD, A.; RIDGWAY, H. J. *Trifolium repens* and *T. subterraneum* modify their nodule microbiome in response to soil pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 4, p. 1858-1869, 2021.

SHARMA, P.; PANDEY, A. K.; KIM, S. H.; SINGH, S. P.; CHATURVEDI, P.; VARJANI, S. Critical review on microbial community during in-situ bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 101826, 2021. d

SHAW, I.; CHADWICK, J. Principles of environmental toxicology. **CRC Press**, 2018.

SIDHU, M. K.; RATURI, H. C.; KACHWAYA, D. S.; SHARMA, A. Role of micronutrients in vegetable production: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 1S, p. 332-340, 2019.

SILVA, A. C. **Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado**. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. Dissertação de Mestrado, 126p, 2002.

SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

SOTERO-SANTOS, R. B.; ROCHA, O.; POVINELLI, J. valuation of water treatment sludges toxicity using the Daphnia bioassay. **Water Research**, v. 39, n. 16, p. 3909-3917, 2005.

SOUZA, A. C. Z. . **Uso sustentável do lodo de tratamento de água e esgoto: efeitos fitotóxicos, genotóxicos e possibilidade de uso antes e depois da biorremediação**. Dissertação de Mestrado p.159, 2021.

STROTMANN, U.; REUSCHENBACH, P.; SCHWARZ, H.; PAGGA, U. Development and evaluation of an online CO₂ evolution test and a multicomponent biodegradation test system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4621-4628, 2004.

TONY, M A Valorization of undervalued aluminum-based waterworks sludge waste for the science of “The 5 Rs’ criteria”. **Applied Water Science**, 12: 1-30, 2022.

TURNER, T.; WHEELER, R.; STONE, A.; OLIVER I. Potential Alternative Reuse Pathways for Water Treatment Residuals: Remaining Barriers and Questions—a Review. **Water Air Soil Pollut**, 230:1-30, 2019.

UNITED NATIONS. **World population Prospects 2022**. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. New York. ST/ESA/SER.A/437, 2022.

VAN-LEEUEWEN, C. J. Ecotoxicological effects. In: **Risk Assessment of Chemicals**. Springer, Dordrecht, 175-237, 1995.

VENEGAS, M.; LEIVA, A. M.; VIDAL, G. Influence of anaerobic digestion with pretreatment on the phytotoxicity of sewage sludge. **Water, Air, & Soil Pollution**, 229:1-11, 2018.

YASIR, M. Analysis of microbial communities and pathogen detection in domestic sewage using metagenomic sequencing. **Diversity**, v. 13, p.6, 2020.

YESIL, H; MOLAEY, R; CALLI, B.; TUGTAS, A. E. Removal and recovery of heavy metals from sewage sludge via three-stage integrated process. **Chemosphere**, 280:130650, 2021.

ZHANG, Q.; HU, J. J.; LEE, D.J.; CHANG, Y.; LEE, Y.J. Sludge treatment: Current research trends. **Bioresour. Technology**, v. 243, p. 1159-1172, 2017.

ZHANG, B.; SHAN, C.; HAO, Z.; LIU, J.; WU, B.; PAN, B. Transformation of dissolved organic matter during full-scale treatment of integrated chemical wastewater: molecular composition correlated with spectral indexes and acute toxicity. **Water research**, v. 157, p. 472-482, 2019.

CAPÍTULO 2

Fitotoxicidade e análise da comunidade de bactérias e fungos envolvidos na biodegradação de lodo de ETA e ETE associados com biofertilizantes.

Ralyvan Araújo dos Santos, Milene Ferro, Dejanira de Franceschi de Angelis, Dilza Aparecida Nalin de Oliveira Leite, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo*

RESUMO

O intenso uso dos recursos naturais e a possibilidade de escassez de matéria-prima nos próximos anos, associado ao avanço industrial e crescimento populacional, têm demandado práticas mais sustentáveis visando ao aproveitamento de resíduos. Em especial, aqueles com grandes quantidades de matéria orgânica e nutrientes, como os lodos provenientes de Estações de Tratamento de Água (LTA) e de Tratamento de Esgoto (LE), com o intuito de utilização na agricultura. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a fitotoxicidade de LTA e LE, isolados ou em associação, antes e após processo de bioaumentação e bioestimulação com biofertilizantes. Adicionalmente, buscou-se caracterizar a comunidade de bactérias e fungos envolvida na destoxificação desses resíduos por sequenciamento de alto rendimento de DNA da região 16S para bactérias e ITS para fungos. A toxicidade foi acompanhada ao longo do processo de destoxificação por meio de testes de germinação e alongamento do hipocótilo e radícula com sementes de *Lactuca sativa* L. e *Eruca sativa* L.. Os resultados demonstraram que a bioaumentação/bioestimulação dos lodos levou a um aumento na toxicidade do tratamento realizado com LTA e LE isolados com o acréscimo do biofertilizante In I. Porém, após a biodegradação, um decréscimo da toxicidade foi observada. Os filos Proteobacteria e Actinobacteria foram predominantes em todos os períodos avaliados e para ambos os tratamentos, enquanto o filo Bacteroidetes mostrou-se mais relacionado com o período final

da biodegradação. Para fungos, o filo dominante foi Ascomycota. Espécies exclusivas de bactérias e fungos foram identificadas como relacionadas ao tipo de resíduo e ao período da biodegradação.

Palavras chaves: Lodo de ETA, Lodo de ETE, *Lactuca sativa*, *Eruca sativa*, 16S e ITS, Biodegradação

4.6 INTRODUÇÃO

O intenso uso dos recursos naturais e a possibilidade de escassez de matéria-prima nos próximos anos têm forçado a humanidade a adotar práticas de economia circular como prioritárias (HELANDER *et al.*, 2019; KORHONEN; HONKASALO; SEPPÄLÄ, 2018). Neste sentido, o aproveitamento de resíduos orgânicos vem se destacando pela possibilidade da reciclagem dos inúmeros nutrientes neles presentes (RASHID; SHAHZAD, 2021; WAINAINA *et al.*, 2020).

Os resíduos produzidos pelas Estações de Tratamento de Água (ETA) e Esgoto (ETE), denominados lodo de ETA (LTA) e lodo de esgoto (LE), respectivamente, constituem bons exemplos de materiais com elevado potencial de aproveitamento, especialmente, na agricultura. Ambos são produzidos em centenas de milhões de toneladas, a cada ano, em todo o mundo, e contêm quantidades consideráveis de matéria orgânica, macronutrientes e micronutrientes, que, quando adicionados ao solo, podem contribuir para o aumento de sua fertilidade (MELO *et al.*, 2018; ODIMEGWU *et al.*, 2018).

Contudo, o LTA e, principalmente, o LE podem apresentar também uma variedade de substâncias químicas e biológicas que são nocivas à saúde humana e ao ambiente, incluindo metais, antibióticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), hormônios,

fenóis, entre outros (IRANZO *et al.*, 2018; NIETO *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2009; FIJALKOWSKI *et al.*, 2017). Assim, para evitar a dispersão de contaminantes e garantir a seguridade ambiental e ecotoxicológica, previamente a sua disposição no solo, esses resíduos necessitam passar por um processo de biotransformação visando à eliminação de sua possível toxicidade, bem como a estabilização da matéria orgânica (FRANCO *et al.*, 2022; MAZZEO *et al.*, 2016; 2023; SOMMAGGIO *et al.*, 2018). Para isso, estratégias de bioaumentação e bioestimulação vêm sendo sugeridas por serem consideradas de baixo custo e contribuir para acelerar o processo de tratamento de resíduos orgânicos, bem como a qualidade do composto final (CHARKHESTANI; KEBRIA, 2022; COSTA *et al.*, 2021; MAZZEO *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2018).

Nesse aspecto, estudos genômicos são primordiais para identificação e caracterização de microrganismos capazes de degradar compostos de natureza tóxica (CALLEJA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020). O acompanhamento de alterações na comunidade microbiana por sequenciamento de alto desempenho apresenta-se como uma importante ferramenta a ser utilizada em processos de biodegradação de resíduos orgânicos, como os lodos, permitindo uma melhor compreensão dos diferentes estágios de decomposição (YANG; SONG, 2019).

Adicionalmente, ensaios de toxicidade são cruciais para determinar a biodisponibilidade de contaminantes e verificar a formação de metabólitos tóxicos durante processos de tratamento de resíduos, como o LTA e o LE (MAZZEO *et al.*, 2015; SANTOS; SOMMAGGIO; MARIN-MORALES, 2022). Ensaios de germinação com sementes e alongação do crescimento da raiz e hipocótilo são reconhecidos por sua elevada sensibilidade à presença de contaminantes e alta sensibilidade, sendo recomendados para a avaliação do

potencial fitotóxico de resíduos provenientes de ETA e ETE (EID *et al.*, 2020; FRANÇA *et al.*, 2021; FRANCO *et al.*, 2021).

Desse modo, frente ao elevado potencial de aproveitamento do lodo de ETA e LE como condicionadores de solos, o presente trabalho buscou identificar alterações na estrutura da comunidade bacteriana e fúngica, durante a biorremediação desses resíduos, por bioestimulação/bioaugmentação. Embora alguns avanços tenham sido feitos nesse sentido, a composição microbiológica envolvida é parte crucial do processo de conversão de resíduos orgânicos e seu papel ainda é pouco compreendido, havendo uma necessidade de mais estudos com esse propósito (YANG; SONG, 2019). Adicionalmente, o potencial fitotóxico dos diferentes tratamentos contendo LTA, LE e os dois biofertilizantes testados, foi avaliado, antes e após o processo de biodegradação. Assim, pode-se relacionar os principais agentes microbiológicos envolvidos na diminuição da toxicidade desses resíduos, na tentativa de contribuir para estratégias futuras de detoxificação, visando seu uso seguro e sustentável na agricultura.

4.7 MATERIAL E MÉTODOS

4.7.1 Descrição e coleta dos materiais

O LE utilizado neste estudo foi proveniente da ETE do Jardim Conduta, localizada no município de Rio Claro – SP nas seguintes coordenadas geográficas (22°24'21" S e 47°33'19"W). As amostras foram coletadas após passarem pelo processo de centrifugação, apresentando as seguintes características: pH 6,92; 16,1% ($\pm 0,33$) de sólidos totais; 32,9% ($\pm 0,08$) de sólidos fixos e 67,0% ($\pm 0,08$) de sólidos voláteis. Esta ETE trata uma média de 160 L/s de esgoto sanitário, sendo responsável por cerca de 30% do total de

tratamento do esgoto da cidade, atendendo, aproximadamente, 80.000 habitantes. O tratamento realizado é do tipo misto, compreendendo reator RAFA (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente), seguido por lodo ativado.

O LTA empregado neste estudo foi obtido na ETA II nas seguintes coordenadas 22°25'43''S e 47°32'55''W, que é responsável pelo tratamento e abastecimento público de água potável de 60% dos habitantes do município de Rio Claro- SP (Brasil). Esta ETA apresenta tratamento do tipo convencional, com capacidade de operação de 500 L/s e produção diária de 35.000 m³ de água potável. O material estudado foi referente aos sólidos acumulados no fundo dos decantadores durante a etapa de decantação por um período de 30 dias, sendo coletado durante o processo de limpeza periódica desses tanques, apresentando pH 7,02; 85,3% ($\pm 0,05$) de sólidos totais; 84,5% ($\pm 0,06$) de sólidos fixos e 15,5% ($\pm 0,06$) de sólidos voláteis.

As coletas de LE e LTA seguiram os procedimentos para amostragem de resíduos descritos na NBR 10007 (ABNT, 2004). Após coleta, as amostras foram armazenadas em recipientes plásticos com tampa, sendo preservadas sob refrigeração (4°C) até a realização dos experimentos.

O solo utilizado para diluição e preparo dos tratamentos foi coletado nas dependências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), localizada no município de Rio Claro- SP. Trata-se de um solo de textura arenosa e condutividade elétrica de 0.623 (dS/m).

Adicionalmente, também foram empregados dois tipos de biofertilizantes comercialmente disponíveis. Um deles (In I) é um fertilizante orgânico sólido composto, de classe A (Bokashi), obtido a partir da fermentação de restos vegetais (palha de arroz, melaço de cana de açúcar, farelos e tortas de origem vegetal). O segundo (In II) é um biofertilizante

produzido em meio líquido por fermentação contínua e em sistema de batelada, sendo composto por substâncias orgânicas, microrganismos, metabólitos e quelatos organominerais.

4.7.2 Preparo dos tratamentos

Buscando o aproveitamento do LE e do LTA para o condicionamento de solos, diferentes tratamentos foram preparados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 6: Descrição dos tratamentos realizados

Tratamentos	Solo (g)	In I (g)	In II (mL)	LTA (g)	LE (g)
Tratamento 1	50	-	-	-	-
Tratamento 2	47,5	2,5	-	-	-
Tratamento 3	47,5	-	2,5	-	-
Tratamento 4	47,5	-	-	-	2,5
Tratamento 5	47,5	-	-	2,5	-
Tratamento 6	45	-	-	2,5	2,5
Tratamento 7	42,5	2,5	-	2,5	2,5
Tratamento 8	42,5	-	2,5	2,5	2,5
Tratamento 9	45	2,5	-	2,5	-
Tratamento 10	45	-	2,5	2,5	-
Tratamento 11	45	2,5	-	-	2,5
Tratamento 12	45	-	2,5	-	2,5

In I (Inóculo I); In II (Inóculo II); LTA (Lodo de Tratamento de Água); LE (Lodo de Tratamento de Esgoto)

Para promover a sanitização, estabilização da matéria orgânica e/ou destoxificação dos resíduos estudados, os tratamentos foram submetidos a um processo de biodegradação aeróbia, por um período de 68 dias, como descrito 4.2.8 do Capítulo 1.

4.7.3 Ensaios de fitotoxicidade com *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*

O teste de fitotoxicidade foi realizado com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*), seguindo os procedimentos propostos por Sobrero e Ronco (2004). Foram germinadas 20 sementes de cada espécie em placas de Petri individuais, contendo cada um dos diferentes tratamentos com os solubilizados obtidos. O controle negativo (CN) foi

realizado com água destilada e o controle positivo (CP) com sulfato de zinco heptahidratado (solução 0,05 M). Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara climática (tipo BOD), na ausência de luz, por um período de 120 h (cinco dias), a temperatura de 22 ± 2 °C. Os tratamentos foram em triplicata. Após o período de germinação, procedeu-se as medições da radícula e hipocótilo de cada uma das sementes, descartando-se aquelas com radículas de tamanho inferior a 5 mm. Após, foram calculados o Índice de germinação pela equação a seguir.

$$IG(\%) = \frac{(\% \text{ de germinação de sementes}) \times (\% \text{ crescimento radicular})}{100\%}$$

Os valores dos comprimentos da radícula e do hipocótilo foram comparados pelo teste de *Kruskal-Wallis* com o controle negativo a um nível de significância de 0,05. O teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar uma mesma amostra, antes e após o período de biodegradação. Os valores de IG foram comparados com o controle negativo a partir do teste ANOVA, um critério, também a um nível de significância de 0,05.

4.7.4 Caracterização da comunidade de fungos e bactérias

Os tratamentos 9 e 11 tiveram suas amostras congeladas a -20 °C para caracterização quanto a alterações na comunidade bacteriana e fúngica, antes e após o processo de biodegradação. Os tratamentos foram escolhidos mediante a ensaios de toxicidades avaliados por meio dos microcrustáceos *Artemia salina* e *Daphnia similis*, pois foram os tratamentos que tiveram maiores toxicidade iniciais e ao final houve perda/diminuição da toxicidade. Essas amostras foram enviadas à empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Brasil) para extração do DNA genômico e sequenciamento, conforme os protocolos internos da própria empresa. Para a extração do DNA genômico foi

utilizado o kit Powersoil DNA isolation (QIAGEN), sendo a concentração de DNA quantificada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™)

A biblioteca digital para identificação das bactérias foi estruturada para o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA, sendo os primers 341F (sequência CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO *et al.*, 2012). utilizados na amplificação. Para a identificação de fungos, utilizou-se o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1, empregando os primers ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) (SCHMIDT *et al.*, 2013) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE *et al.*, 1990).

As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). Os kits V3 com 600 ciclos ou V2 com 500 ciclos foram utilizados para paired-end e o kit V2, com 300 ciclos, para sequenciamento single-end.

4.7.5 Pré-processamento dos *Reads* e classificação taxonômica

Os dados brutos de sequenciamento obtidos foram inicialmente analisados no programa de controle de qualidade FASTQC, versão 0.11.5, Babraham Bioinformatics (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), sendo considerado o valor mínimo de *Phred* <20. A etapa de classificação taxonômica foi realizada no programa web MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology) (AZIZ *et al.*, 2008), o qual realiza a análise de dados metagenômicos de bibliotecas de amplicons 16S e ITS. Primeiramente, foi feita uma análise de filtragem por qualidade, retirando-se os *reads* duplicados artificialmente. Então, os *reads* selecionados foram alocados por similaridades, sendo considerada uma identidade mínima de 97% para, posteriormente, agrupar as sequências. As sequências mais longas de cada *Cluster* foram selecionadas como

representativa e utilizadas para a classificação taxonômica usando o programa BLAT (Kent, 2002) contra a base de dados M5rna (disponível na plataforma do MG- Rast), a qual integra os bancos de dados SILVA, Greengenes e RDP (Ribossomal Database Project). A partir desses processamentos, foram realizados os gráficos e tabelas dos grupos taxonômicos identificados, curva de rarefação e diagrama de Venn (BARDOU *et al.*, 2014).

4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.8.1 Fitotoxicidade

Os resultados dos bioensaios de fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula) estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Quanto ao tamanho do hipocótilo, nenhum dos tratamentos (não biodegradado e biodegradado) induziu um efeito tóxico para este parâmetro, uma vez que não levou a uma diminuição significativa de seu comprimento. Ainda, pode-se observar, que os tratamentos promoveram um aumento significativo do tamanho do hipocótilo, especialmente após passarem pelo processo de biodegradação. Um aumento mais pronunciado do tamanho do hipocótilo foi observado, principalmente, para os tratamentos que continham o biofertilizante In I, possivelmente devido ao seu reconhecido efeito estimulatório no crescimento de plantas, incluindo para as espécies *L. sativa* e *E. sativa* (LIMA *et al.*, 2022; PHOOI; AZMAN; ISMAIL, 2022; SOARES *et al.*, 2020).

Tabela 7: Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com a espécie *Lactuca sativa* L, antes e após o processo de biodegradação

Tratamentos	Processo	Germinação (média da quantidade de sementes por placa)	Hipocótilo (cm)	Radícula (cm)	IG (%)
Controle Negativo	-	19,3 ± 0,59	1,45 ± 0,11	2,29 ± 0,34	100
Controle Positivo	-	0	0 *	0 *	0 *
Tratamento 1	Inicial	18,0 ± 0,00	1,81 ± 0,12	2,02 ± 0,29	80,7 ± 2,42
	Final	19,0 ± 0,00	1,88 ± 0,07 *	1,45 ± 0,03 *+	61,9 ± 8,20
Tratamento 2	Inicial	19,0 ± 1,00	1,09 ± 0,43	1,29 ± 0,02*	55,2 ± 8,00
	Final	18,0 ± 1,73	2,07 ± 0,16*	1,46 ± 0,06 *	61,4 ± 8,60
Tratamento 3	Inicial	17,00 ± 0,00	1,66 ± 0,23	1,71 ± 0,14	64,8 ± 2,60
	Final	17,00 ± 0,00	1,76 ± 0,04	1,42 ± 0,05 *	54,4 ± 8,10
Tratamento 4	Inicial	16,0 ± 0,00	1,56 ± 0,11	1,52 ± 0,07*	54,6 ± 7,30
	Final	17,7 ± 0,58	1,82 ± 0,12	1,45 ± 0,21 *	56,8 ± 12,1
Tratamento 5	Inicial	16,7 ± 1,15	1,67 ± 0,03	1,81 ± 0,12	67,1 ± 2,30
	Final	18,3 ± 1,53	1,93 ± 0,32*	1,5 ± 0,28 *	61,4 ± 10,6
Tratamento 6	Inicial	17,00 ± 0,00	1,81 ± 0,28	1,44 ± 0,13	65,6 ± 11,8
	Final	18,3 ± 1,53	2,28 ± 0,50 *	1,27 ± 0,08 *	52,7 ± 11,4
Tratamento 7	Inicial	18,3 ± 0,58	1,78 ± 0,03	1,74 ± 0,71 *	69,3 ± 19,0
	Final	19,0 ± 0,00	1,94 ± 0,08*	1,44 ± 0,18 *	60,9 ± 6,50
Tratamento 8	Inicial	16,7 ± 0,58	1,60 ± 0,05	1,58 ± 0,16*	58,5 ± 1,20
	Final	19,0 ± 1,00	1,95 ± 0,19 *	1,31 ± 0,09 *	55,9 ± 8,90
Tratamento 9	Inicial	19,7 ± 0,58	1,40 ± 0,11	0,93 ± 0,08 *	41,2 ± 8,30*
	Final	17,67 ± 0,58	2,12 ± 0,18 *+	1,33 ± 0,12 *+	53,1 ± 11,3
Tratamento 10	Inicial	19,0 ± 1,00	1,89 ± 0,16	1,54 ± 0,20	66,2 ± 6,60
	Final	18,7 ± 0,58	1,83 ± 0,21	1,67 ± 0,06	68,4 ± 5,90
Tratamento 11	Inicial	18,7 ± 0,58	1,74 ± 0,20	1,44 ± 0,11 *	60,0 ± 5,20
	Final	18,0 ± 2,65	2,01 ± 0,19 *	1,71 ± 0,08	69,0 ± 13,4
Tratamento 12	Inicial	19,3 ± 2,65	1,71 ± 0,13	1,8 ± 0,08	78,6 ± 13,1
	Final	18,7 ± 0,58	1,64 ± 0,21	1,47 ± 0,21 *	61,4 ± 10,1

IG: Índice de Germinação (%); *: Estatisticamente Significativo em relação ao Controle Negativo ($p < 0,05$); +: Estatisticamente Significativo quando comparado ao mesmo tratamento não biodegradado ($p < 0,05$)

Tabela 8: Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com a espécie *Eruca sativa* L, antes e após o processo de biodegradação

Tratamentos	Processo	Germinação (média da quantidade de sementes por placa)	Hipocótilo (cm)	Radícula (cm)	IG (%)
Controle Negativo	-	17,3 ± 0,58	2,72 ± 0,16	2,35 ± 0,27	100
Controle Positivo	-	0	0*	0*	0 *
Tratamento 1	Inicial	17,02 ± 1,15	3,02 ± 0,08	3,06 ± 0,38	134 ± 30,8
	Final	14,3 ± 4,62	3,65 ± 0,09 *	2,52 ± 0,49	117 ± 29,1
Tratamento 2	Inicial	12,7 ± 0,58	2,80 ± 0,24	1,66 ± 0,43	52,4 ± 11,2
	Final	18,0 ± 1,73	4,58 ± 0,12 *+	2,72 ± 0,19	124 ± 23,8
Tratamento 3	Inicial	16,0 ± 1,73	2,82 ± 0,64	1,94 ± 0,48	81,1 ± 34,1
	Final	17,3 ± 1,15	3,77 ± 1,02	3,28 ± 0,26 *+	143 ± 23,2
Tratamento 4	Inicial	16,3 ± 1,53	3,11 ± 0,20	2,33 ± 0,12	95,3 ± 3,69
	Final	19,0 ± 1,00	3,32 ± 0,16*	3,36 ± 0,28 *	161 ± 24,3
Tratamento 5	Inicial	16,0 ± 1,00	2,99 ± 0,15	2,94 ± 0,26	113 ± 6,54
	Final	15,0 ± 1,00	3,63 ± 0,24 *	2,94 ± 0,17	112 ± 18,9
Tratamento 6	Inicial	15,0 ± 1,00	3,68 ± 0,97	3,09 ± 0,24	116 ± 10,3
	Final	18,0 ± 1,73	3,43 ± 0,51	3,07 ± 0,70	140 ± 38,7
Tratamento 7	Inicial	16,7 ± 2,52	3,72 ± 0,40 *	2,07 ± 0,10	86,7 ± 14,3
	Final	18,0 ± 2,65	4,25 ± 0,29 *	2,75 ± 0,19	123 ± 8,25
Tratamento 8	Inicial	17,7 ± 3,00	3,26 ± 0,24	3,15 ± 0,21	138 ± 25,0
	Final	20,0 ± 0,00	3,51 ± 0,20 *	3,46 ± 0,39 *	174 ± 18,4
Tratamento 9	Inicial	15,0 ± 1,73	3,04 ± 0,18	0,95 ± 0,21 *	34,5 ± 12,2*
	Final	19,3 ± 0,58	4,05 ± 0,05 *+	3,09 ± 0,38+	149 ± 30,4
Tratamento 10	Inicial	16,7 ± 2,08	3,57 ± 0,19*	4,25 ± 0,42 *	179 ± 31,0
	Final	17,3 ± 1,53	3,66 ± 1,25	3,06 ± 0,62	132 ± 21,3
Tratamento 11	Inicial	17,7 ± 2,52	4,09 ± 0,15*	2,35 ± 0,49	102 ± 12,2
	Final	14,0 ± 0,00	3,84 ± 0,08 *	3,43 ± 0,33 *+	122 ± 23,1
Tratamento 12	Inicial	18,3 ± 0,58	3,64 ± 0,35 *	3,32 ± 0,49 *	154 ± 35,0
	Final	16,7 ± 2,31	3,06 ± 0,18	2,77 ± 0,46	115 ± 30,4

IG: Índice de Germinação (%); *: Estatisticamente Significativo em relação ao Controle Negativo ($p < 0,05$); +: Estatisticamente Significativo quando comparado ao mesmo tratamento não biodegradado ($p < 0,05$)

Contudo, no bioensaio com *L. sativa*, um efeito inverso foi observado para o comprimento da radícula, onde uma inibição significativa do crescimento foi verificada para a maioria dos tratamentos, em especial, após a biodegradação, possivelmente pela formação de subprodutos tóxicos. Porém, para essa espécie, o próprio solo utilizado como controle também apresentou um efeito fitotóxico para a radícula após a biodegradação, justificando o observado. Já para *E. sativa*, nenhum efeito tóxico para esse parâmetro foi detectado, com exceção do tratamento 9 (LTA + In I), o qual também induziu a diminuição mais pronunciada para ambas as espécies avaliadas. No entanto, foi possível notar, tanto para o bioensaio com *L. sativa* como para *E. sativa*, uma melhora significativa no crescimento da radícula das sementes expostas a esse tratamento (9), quando se compara os valores antes e após a biodegradação, indicando que este processo foi efetivo para diminuir a toxicidade desse tratamento. Ainda, é interessante notar um aumento no índice de germinação (IG), que leva em conta, não só o comprimento das radículas, mas também a porcentagem de germinação para esse tratamento em ambos os ensaios, sendo este aumento bastante expressivo para *E. sativa* (Tabela 8). Um decréscimo significativo na toxicidade aguda inicial desse mesmo tratamento também foi observado para ensaios com *Daphnia similis* e *Artemia salina*, após processo de biodegradação (ver Capítulo 1). Destaca-se ainda, o aumento significativo observado para o tratamento 11 (LE + In I) nas radículas de *E. sativa*, após o período de biodegradação. Embora para os organismos vegetais aqui empregados, nenhum efeito tóxico foi observado, este tratamento (11) levou a maior toxicidade para *Daphnia similis* e *Artemia salina*, porém com uma diminuição desse efeito após a biodegradação, como apresentado no capítulo 1.

Outros autores também relataram que o LE, antes do processo de biodegradação, prejudica significativamente o desenvolvimento do hipocótilo e/ou radícula de diferentes plantas (CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019; FRANCO *et al.*, 2022; MAZZEO

et al., 2015, 2020; SANTOS; SOMMAGGIO; MARIN-MORALES, 2022). Adicionalmente, o LTA também pode ser prejudicial ao desenvolvimento vegetal, dependendo das concentrações utilizadas (BITENCOURT *et al.*, 2021). No entanto, neste estudo, esse efeito também foi observado nos tratamentos 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 12, após o período de 68 dias de biodegradação, exclusivamente, com o ensaio com *L. sativa*, indicando a necessidade de um tempo adicional de estabilização para eliminação da toxicidade, especialmente quando se objetiva sua aplicação agrícola.

4.8.2 Caracterização microbiana dos tratamentos de LTA e LE

O emprego da metataxonômica vem auxiliando na compreensão de processos ocorridos durante a compostagem do lodo, incluindo eventos de transformação de metais (LIU *et al.*, 2022), disponibilização de nutrientes (CAO *et al.*, 2021), transferência de genes de resistência a antibióticos (TANG *et al.*, 2023), entre outros. No presente estudo, esta ferramenta auxiliou na compreensão comunidade de bactérias e fungos, que provavelmente estão envolvidos no processo de biodegradação dos lodos de ETA e ETE associados ao inóculo I. Desse modo, essa análise foi realizada com os tratamentos 9 (LTE + In I) e 11 (LE + In II), antes e após o período de biodegradação, que foram os únicos que induziram um efeito tóxico significativo nos ensaios iniciais o qual, posteriormente, diminuiu com a realização da biodegradação.

As curvas de rarefação, obtidas com o número total de sequências referentes aos gêneros bacterianos e fúngicos de cada tratamento estão apresentadas como materiais suplementares (Figura S1 e Figura S2). Foi possível observar a formação de um platô uniforme para a maioria das amostras a partir do achatamento da curva, com o aumento do número de *reads*. Tais observações indicam que os resultados do sequenciamento foram suficientes para refletir a diversidade das amostras, sem a necessidade de aumentar a profundidade do sequenciamento. As exceções foram os resultados da comunidade fúngica

dos tratamentos LTA + In I (9) e LTA + In II (11), anteriormente à realização da biodegradação.

4.8.2.1 Comunidade bacteriana

A análise da comunidade de bactérias revelou um maior número de sequências (*reads*) para o tratamento 9, após o período de biodegradação, seguido pelo tratamento 11, também após a biodegradação (Tabela 9).

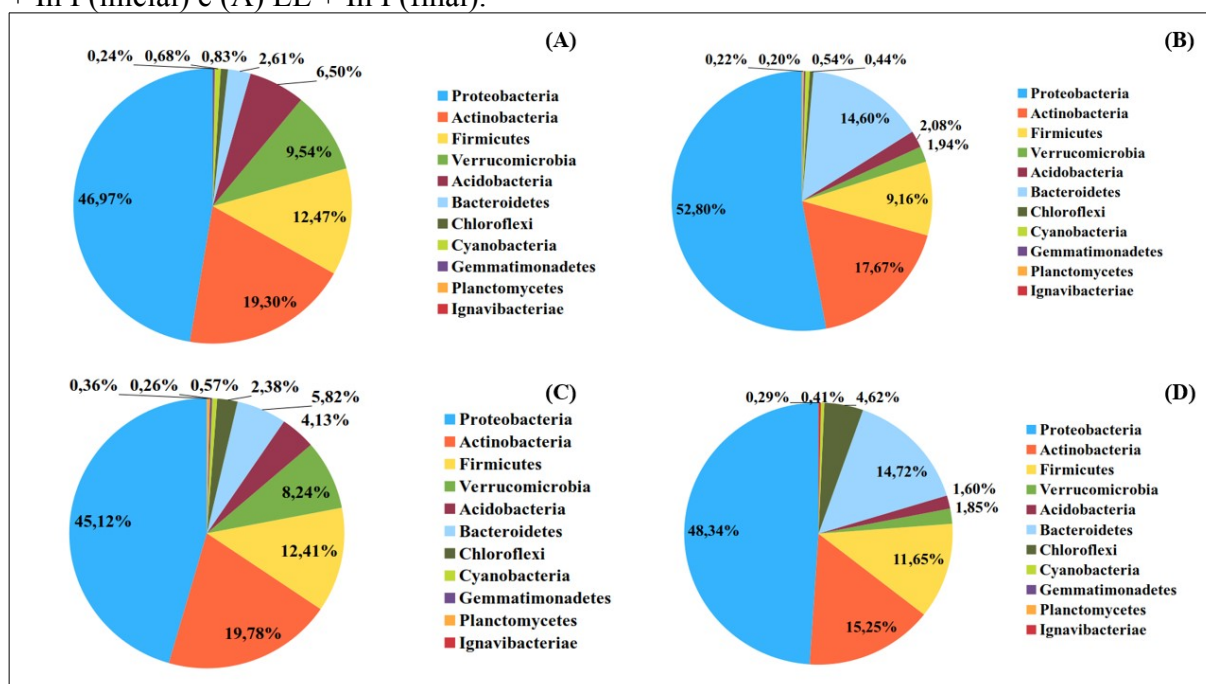
Tabela 9. Abundância total e índices de diversidades de bactérias e fungos, mediante aos *Reads* classificados, *Shannon Index* e *Simpson Index*.

	N°	Biodegradação	Abundância	Diversidade	
			<i>Reads</i> Classificados	<i>Shannon Index</i> (H) / (H / LN (N))	<i>Simpson Index</i> (1-D)
Bactérias	Tratamento 9 LTA + In I	Inicial	34407	4,820 / 0,7004	
		Final	63325	5,008 / 0,7165	
	Tratamento 11 LE + In I	Inicial	48143	5,179 / 0,7276	
		Final	55818	5,290 / 0,7468	
Fungos	Tratamento 9 LTA + In I	Inicial	18262	2,830 / 0,6911	
		Final	42735	1,590 / 0,4107	
	Tratamento 11 LE + In I	Inicial	37191	2,136 / 0,5519	
		Final	49335	0,982 / 0,2472	

Contudo, no tempo inicial (antes da biodegradação) tabela 9, o tratamento 11 revelou um maior número de sequências quando comparado ao tratamento 9. Tal fato indica que a biodegradação promoveu um aumento da abundância bacteriana para ambos os tratamentos e que, embora inicialmente, a carga de bactérias fosse maior no tratamento com LE, a biodegradação do LTA associado com o biofertilizante I acarretou em um substrato que melhor favoreceu o crescimento bacteriano. Em termos de diversidade (Tabela 9), avaliada pelo índice de *Shannon* e pelo índice de *Simpson*, foi possível verificar que os tratamentos que continham LE em sua composição apresentaram uma maior diversidade. Além disso, também se nota Tabela 9 para Bactérias que a diversidade aumenta nos dois tratamentos após o período de biodegradação. A diferença entre o número de sequências e diversidade entre o LE e o LTA observada pode estar relacionada a constituição química desses resíduos, uma vez que o LE apresenta uma maior quantidade de matéria orgânica de fácil assimilação, enquanto o segundo possui uma maior recalcitrância e também pode ter sido ocasionado pela presença de metais pesados, bem como Chumbo (Capítulo1), a qual pode ser convertida após o processo de biodegradação (Franco *et al.*, 2022). Quanto à dinâmica da composição bacteriana, em nível de filo, nota-se que Proteobacteria (superior a 45%) foi o filo dominante para ambos os tratamentos, seguido por Actinobacteria (superior a 15%), tanto para o período inicial como final da biodegradação (Fig. 9). O terceiro e o quarto filo mais abundante foram coincidentes entre os tratamentos 9 e 11, diferenciando-se ao longo do processo de biodegradação, sendo Firmicutes e Verrucomicrobia para o período anterior a biodegradação e Bacteroidetes, seguido por Firmicutes no período final analisado. De acordo com Nozhevnikova *et al.* (2019), exemplares dos filios Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes são as principais bactérias envolvidas na compostagem de resíduos orgânicos sólidos.

Ainda é interessante notar que, após a biodegradação, ocorreu um aumento na abundância de bactérias pertencentes aos filos Proteobacteria e Bacteroidetes, sendo que este último passou a ocupar a terceira posição dentre os dez mais abundantes, superando Firmicutes, Verrucomicrobia e Acidobacteria. Um aumento crescente de espécies pertencentes ao filo Bacteroidetes ao longo do processo de decomposição de resíduos sólidos também foi observado por Yang e Song (2019), sendo os maiores valores registrados, após 265 dias, para a última etapa do processo referente à fase metanogênica (superior a 40%). Adicionalmente, bactérias pertencentes ao filo Firmicutes são mais dominantes durante a fase termofílica da estabilização da matéria orgânica (NOZHEVNIKOVA *et al.*, 2019). Assim, o decréscimo observado para esse filo indica que a biodegradação estava progredindo para a etapa final da estabilização.

Figura 9: Estrutura da comunidade bacteriana distribuída entre os principais filos identificados no período de 68 dias de biodegradação. A. LTA + In I (inicial); (B) LTA + In I (final); (C) LE + In I (inicial) e (D) LE + In I (final).

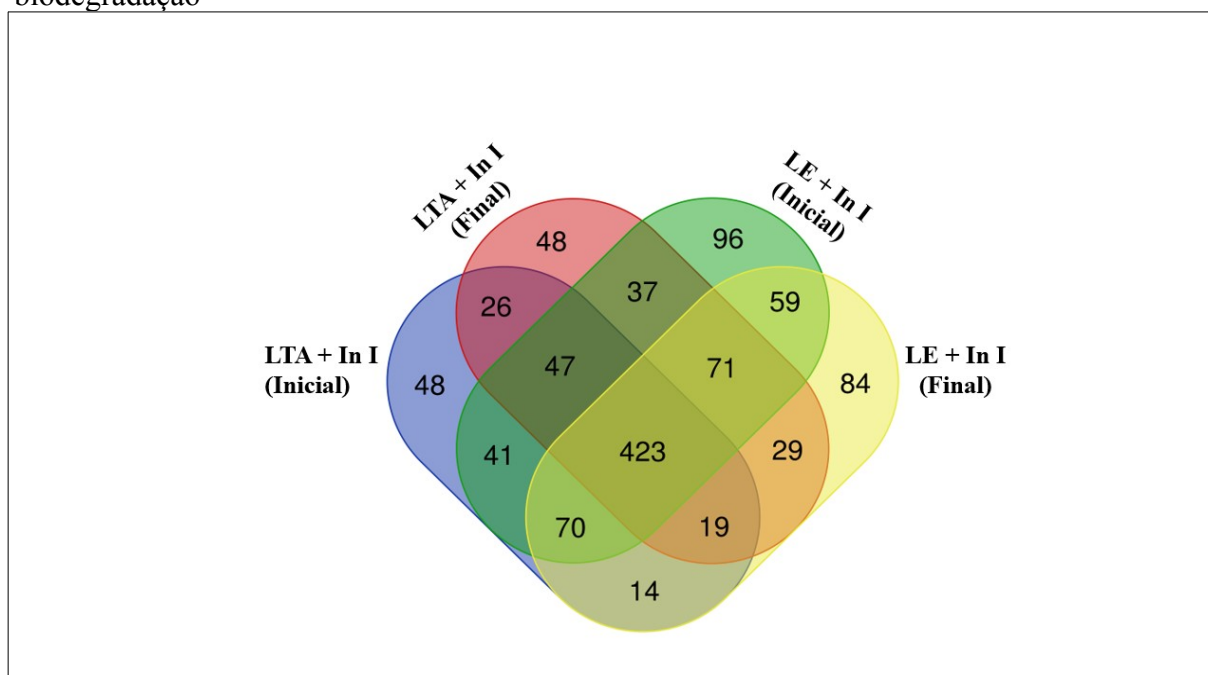


Dentre os outros seis filos encontrados, os quais representam apenas cerca de 10% da comunidade bacteriana, todos estavam presentes nos tratamentos 9 (antes e após biodegradação) e 11 (antes da biodegradação). No entanto, para a amostra 11, no período final de biodegradação, um novo filo foi observado (Ignavibacteriae), enquanto representantes de Gemmatimonadetes e Planctomycetes não foram mais detectados, esta diferença na mudança de filos, está ligada a disponibilidade de nutrientes que foram disponibilizados durante o processo de biodegradação, o que explica a detecção de uns e o desaparecimento de outros. Outro estudo também constatou o aparecimento de representantes do filo Ignavibacteriae em processos de digestão de LE, possivelmente pela diminuição do oxigênio disponível no substrato (ZHENG *et al.*, 2018), o que indica que não houve a aeração do substrato por completo, gerando regiões sem a presença de oxigênio ao longo do processo.

Ao se comparar as sequências identificadas, em nível de gênero, a partir do diagrama de Venn, para todos os tratamentos analisados, observa-se que os mesmos compartilharam o total de 423 gêneros (Figura 10). Quando essa comparação é feita para um mesmo resíduo, porém em diferentes tempos da biodegradação, observa-se que o LTA+ In I compartilha 515 gêneros (Tabela Suplementar 3), enquanto 173 gêneros são exclusivos para o período inicial e 185 gêneros são exclusivos para o período final. Em relação ao LE+ In I, 221 gêneros são exclusivos do período inicial e 146 gêneros são do período final. Além disso, um maior número de gêneros é compartilhado para esse tratamento (623 gêneros) em comparação ao LTA + In I. Ainda é possível observar a partir da figura 6, que as quatro diferentes amostras avaliadas apresentaram gêneros exclusivos, sendo 48 para LTA+ In I inicial, 48 para LTA+ In I final, 96 para ao LE+ In I inicial e 84 para LE+ In I final. Outros estudos também observaram que, embora algumas correlações possam ser observadas, a comunidade

bacteriana apresenta especificidade ao material compostado e se altera com a estabilização da matéria orgânica e destoxificação (NEHER *et al.*, 2013; GURMESSA *et al.*, 2021).

Figura 10: Análise dos gêneros de bactérias compartilhados e exclusivos para os tratamentos de LTA+ In I (inicial e final) e LE+ In I (inicial e final) no período de 68 dias de biodegradação



As tabelas 9, 10, 11 e 12 apresentam as 10 espécies mais abundantes identificadas para cada um dos tratamentos, antes e após a biodegradação. As espécies *Roseimicrobium* sp. ORNL1 e *Rhodoplanes* sp. Z2-YC6860 foram as únicas presentes em todas as amostras. Além disso, ambas foram as mais abundantes tanto para o tratamento contendo LE (11) como para o com LTA (9), no período inicial da biodegradação, os quais ainda compartilharam outras 5 espécies em comum (*Candidatus Koribacter versatilis*, *Devosia* sp. A16, *Paludibaculum fermentans*, *Pseudolabrys* sp. FHR47, *Sphingomonas lutea* e *Hyphomicrobium nitrativorans*).

Tabela 9: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LTA+In 1, antes da biodegradação.

Filo	Espécies	n.º de seqüências
Verrucomicrobia	<i>Roseimicrobium</i> sp. ORNL1	2463
Pseudomonadota	<i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860	1554
Actinobacteria	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i>	1091
Pseudomonadota	<i>Devosia</i> sp. A16	998

Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium hassiacum</i>	843
Acidobacteria	<i>Paludibaculum fermentans</i>	567
Pseudomonadota	<i>Pseudolabrys</i> sp. FHR47	514
Pseudomonadota	<i>Sphingomonas lutea</i>	375
Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i>	348
Pseudomonadota	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i>	347

Tabela 10: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LTA+In 1, após a biodegradação.

Filo	Espécies	nº de sequências
Pseudomonadota	<i>Steroidobacter denitrificans</i>	3093
Actinobacteria	<i>Kribbella qitaiheensis</i>	1696
Proteobacteria	<i>Bacillus velezensis</i>	878
Bacteroidetes	<i>Chitinophaga oryzae</i>	707
Pseudomonadota	<i>Cupriavidus</i> sp. EM10	687
Verrucomicrobia	<i>Roseimicrobium</i> sp. ORNL1	677
Pseudomonadota	<i>Devosia</i> sp. A16	630
Proteobacteria	<i>Georhizobium profundi</i>	622
Pseudomonadota	<i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860	618
Pseudomonadota	<i>Sphingomonas lutea</i>	564

Tabela 11: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LE+In I, antes da biodegradação.

Filo	Espécies	Sequências
Verrucomicrobia	<i>Roseimicrobium</i> sp. ORNL	12493
Pseudomonadota	<i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860	1638
Actinobacteria	<i>Aquihabitans</i> sp. Kera 3	945
Actinobacteria	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i>	858
Verrucomicrobia	<i>Verrucomicrobium</i> sp. GAS474	803
Pseudomonadota	<i>Devosia</i> sp. A16	706
Chloroflexi	<i>Caldilinea aerophila</i>	655
Pseudomonadota	<i>Pseudolabrys</i> sp. FHR47	613
Pseudomonadota	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i>	520
Firmicutes	<i>Paludibaculum fermentans</i>	478

Tabela 12: Lista das dez espécies mais representativas encontradas no tratamento LE+In I, após a biodegradação.

Filo	Espécies	Sequências
Bacteroidota	<i>Solitalea canadensis</i>	2398
Chloroflexi	<i>Caldilinea aerophila</i>	1101
Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	968
Chloroflexi	<i>Pelolinea submarina</i>	685
Actinobacteria	<i>Cellulomonas</i> sp. zg-ZUI188	583

Bacteroidetes	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	560
Pseudomonadota	<i>Sphingomonas dae chungensis</i>	517
Verrucomicrobia	<i>Roseimicrobium</i> sp. ORNL1	511
Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i>	504
Pseudomonadota	<i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860	492

Outro ponto interessante observado é que, embora o filo Proteobacteria foi o dominante para todos os tratamentos e em ambos os períodos avaliados, as espécies representativas desse filo apareceram apenas no oitavo e nono lugar em termos de abundância, quando listadas entre as 10 mais abundantes. Nesse caso, o filo Pseudomonadota, caracterizado pela presença de bactérias fototróficas facultativas anoxigênicas (HIRAISHI e IMHOFF, 2021), foi um dos mais encontrados. Estas bactérias são degradadoras de material vegetal morto e matéria orgânica (ZHAN *et al.*, 2018), o que explica sua presença em todos os tratamentos analisados.

A presença de bactérias do gênero *Roseimicrobium* sp. ORNL1 é um ponto interessante visando ao aproveitamento dos lodos na agricultura, uma vez o gênero *Roseimicrobium* sp. é encontrado em associação simbiótica com raízes de plantas, favorecendo o desenvolvimento das mesmas (PODAR *et al.*, 2020). Contudo, a presença da enterobactéria *E. coli* no tempo final da biodegradação para o tratamento contendo LE indicou que o processo precisaria ter sido realizado por mais tempo para promover a sanitização do mesmo, uma vez que outros autores já observaram que procedimentos como o aqui utilizados são efetivos na eliminação de enterobactérias (MAZZEO *et al.*, 2015; 2020; SOMMAGGIO *et al.*, 2018). Por outro lado, a identificação de *Chitinophaga oryzae* após a biodegradação do tratamento LTA + In I pode contribuir para aumentar a fertilidade do solo e promover crescimento das plantas, já que são bactérias capazes de solubilizarem fosfato e zinco, disponibilizando esses nutrientes para as plantas (CHUNG *et al.*, 2012), tornando o emprego desse tratamento como aditivo agrícola bastante interessante.

4.8.2.2 Comunidade fúngica

Os resultados obtidos com o sequenciamento da região ITS revelaram a comunidade fúngica, antes e depois do processo de biodegradação, para os tratamentos LTA + In I e LE + In I.

Os gêneros de fungos mais abundantes encontrados no tratamento inicial de LTA foram *Aspergillus*, correspondendo a 38,56%, seguidos por *Fusarium* (14,83%), *Penicillium* (10,82%), *Scheffersomyces* (9,0%) e *Tetrapisispora* (3,94%), todos pertencentes ao filo Ascomycota. Nesta amostra, este filo apresentou abundância superior à 90%, seguido pelo filo Basidiomycota (6,69%), sendo o gênero *Marasmius*, o mais abundante deste filo. No período final da biodegradação, no tratamento LTA + In I (9), houve uma alternância nos gêneros encontrados, onde os mais abundantes foram *Fusarium* (39,77%), seguido por *Purpureocillium* (21,41%), *Nakaseomyces* (6,36%), *Colletotrichum* (2,05%) e *Thermothelomyces* (1,58%). Adicionalmente, também ocorreu uma diminuição de cerca de 15% no número de sequências identificadas como pertencentes ao filo Ascomycota e de cerca de 6% para Basidiomycota (6,69% para 0,32%), em relação ao período inicial.

Quanto à amostra LE + In I (11), no período inicial, os gêneros de fungos mais abundantes encontrados no tratamento inicial de LE foram *Nakaseomyces* (39,39%), seguidos por *Candida* (7,76%), *Zygosacchamoyces* (3,40%), *Cryptococcus* (4,05%) e *Aspergillus* (3,63%). Ainda, em concordância com as amostras inicial e final do tratamento LTA + In I, o filo mais predominante foi o Ascomycota (75,75%), seguido pelo filo Basidiomycota (6,61%), sendo, novamente, quantificado *Marasmius* como o gênero mais abundante deste filo. Representantes deste gênero apresentam elevado potencial de destoxificação/biodegradação de compostos recalcitrantes (VANTAMURI; SHETTAR, 2020)

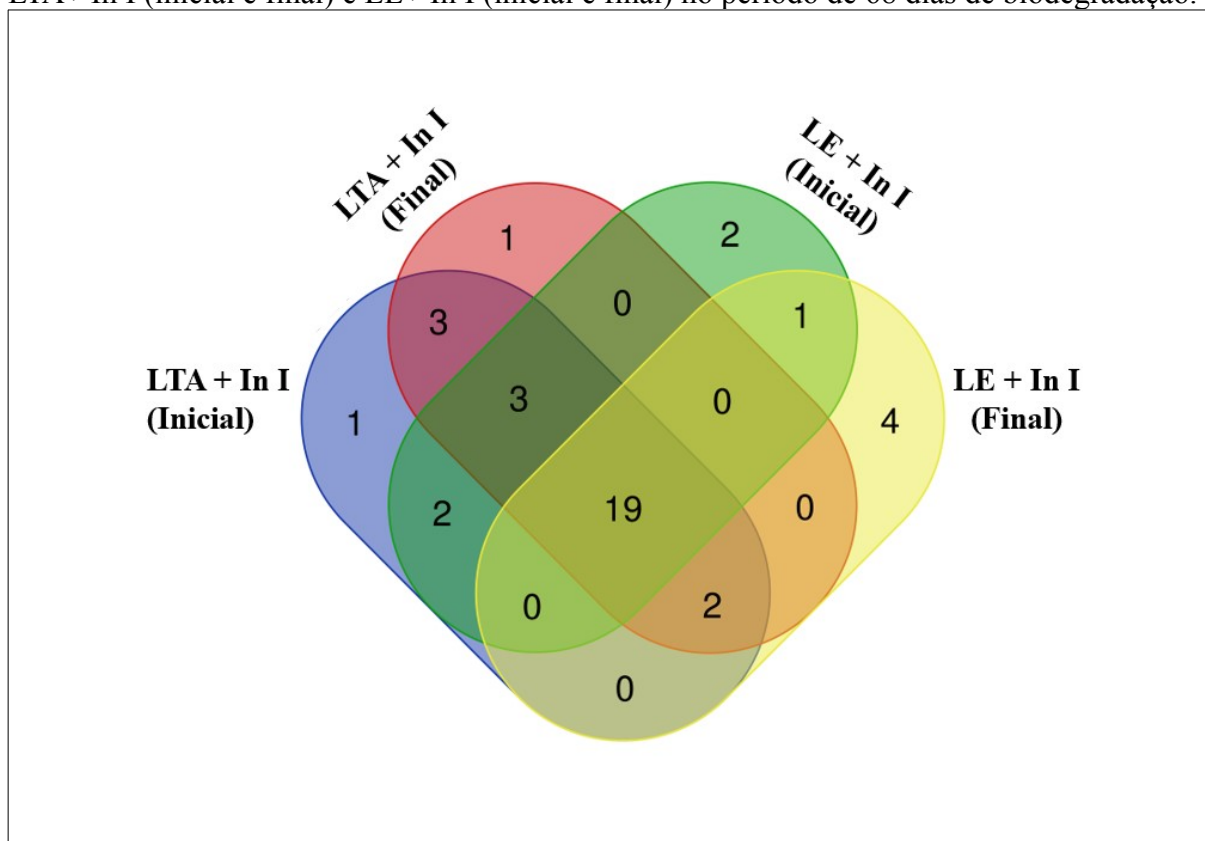
bem como na degradação de sedimentos de argila (FAJAR *et al.*, 2020), podendo ter contribuído para o decréscimo da toxicidade observada para esse tratamento.

No período final de biodegradação do tratamento LE + In I, o gênero *Nakaseomyces* (70,7%) se manteve como o mais abundante, além de apresentar um aumento pronunciado neste tempo. Porém uma sucessão ocorreu para as demais posições, nas quais observou-se a presença de *Fusarium* (12,27%), *Purpureocillium* (4,21%), *Colletotrichum* (0,9%) e *Kluyveromyces* (0,86%). Mais uma vez, os filios Ascomycota (91,54%) foi mais abundantes. Contudo, diferentemente do que foi observado para o tratamento ETA + In 1, um aumento da porcentagem de sequências pertencentes ao filo Ascomycota foi constatada.

A maior abundância observada para o filo Ascomycota está relacionada ao fato deste incluir o maior grupo de fungos terrestres e aquáticos, contribuindo com mais de 65% dos fungos atualmente conhecidos, os quais são reconhecidos biodegradadores de matéria orgânica e responsáveis por grande parte da transformação de poluentes (ASSRESS *et al.*, 2019).

Na tentativa de identificar gêneros chaves para o processo de destoxificação do LTA e LE, foi realizado um comparativo geral com todos os gêneros de fungos encontrados nos tratamentos (Figura 11 e Tabela suplementar 4).

Figura 11: Análise dos gêneros de fungos compartilhados e exclusivos para os tratamentos de LTA+ In I (inicial e final) e LE+ In I (inicial e final) no período de 68 dias de biodegradação.



A partir da análise de Venn, verifica-se que 19 gêneros são compartilhados entre todos os tratamentos, nas fases iniciais e finais. As espécies predominantes compartilhadas entre todos os tratamentos foram *Candida orthopsilosis*, *Fusarium oxysporum* e *Candida glabrata*. As espécies de levedura *C. orthopsilosis* e *C. glabrata* já foram identificadas em solos de várias regiões do mundo, incluindo no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2013; MOREIRA; DO VALE, 2020; SAMARASINGHE *et al.*, 2021). A primeira é reconhecida por sua elevada atividade na produção das enzimas lipolíticas esterases e lipases (CARVALHO *et al.*, 2013) e a segunda, pela produção de biosurfactante (GUSMÃO; RUFINO; SARUBBO, 2010). Os resíduos estudados no presente estudos são reconhecidas fontes de gorduras (BARROS *et al.*, 2015; GIRISHA *et al.*, 2014), o que pode ter favorecido a manutenção dessas espécies nas amostras estudadas. Já a espécie *F. oxysporum* apresenta potencial comprovado para a

biorremediação de diversos contaminantes, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (OBI *et al.*, 2020). Ainda, essa espécie é bastante resistente a presença de metais pesados, sendo bastante empregada na biorremediação de ambientes contaminados por esses elementos químicos (AMATUSSALAM; ABUBACKER; RAJENDRAN, 2011; DARWESH; MATTER, 2022). Essa tolerância aos metais justifica a presença dessas espécies nos resíduos empregados. Contudo, este fungo está associado à infecção de plantas (ANLI *et al.*, 2022) causando a doença fusariose, o que pode ser um fator negativo para a utilização dos tratamentos propostos na agricultura. Desse modo, uma esterilização prévia à aplicação dos tratamentos no solo seria requerida.

Quando se compara um mesmo tratamento, antes e após a biodegradação, o LTA + In I (9) compartilha 27 gêneros, sendo as espécies mais abundantes em comum *C. orthopsilosis*, *F. oxysporum*, *C. glabrata* e *Fusarium graminearum*. Já para o tratamento LE+In I (11), 20 gêneros foram compartilhados nos dois períodos estudados (Figura 6), sendo as espécies mais abundantes compartilhadas *Tetrapisispora phaffii*, *C. orthopsilosis*, *F. oxysporum* e *C. glabrata*. *Fusarium graminearum* é um decompositor e potencial biodegradador por ser capaz de sintetizar enzimas como lignina peroxidase, manganês peroxidase, amilase, lacase, entre outras (GANESH; DINESHRAJ; YOGANATHAN, 2017), podendo ter contribuído para a diminuição da toxicidade observada. Contudo, ele também é um reconhecido fitopatógeno (MEYER-WOLFARTH *et al.*, 2021). Surpreendentemente, a presença da levedura *T. phaffii* nas amostras contendo LE pode exercer algum controle sobre os fungos fitopatogênicos, uma vez que secretam toxina killer com ação antimicótica (CHEN, 2017).

Também foi possível verificar que os tratamentos apresentaram gêneros exclusivos, o que sugere uma alteração na comunidade fúngica em decorrência da composição

da amostra associada ao período da biodegradação. O gênero *Thermothielavioides* foi encontrado apenas no tratamento LTA + In I (9), no período inicial. Trata-se de fungo termofílico verdadeiro, citado na literatura como produtor de enzimas β -galactosidases (SERVA *et al.*, 2021), as quais estão associadas à biodegradação de lodo ativado (MORGAN-SAGASTUME; ALLEN, 2005; KRAH *et al.*, 2016). Porém, não há informações concludentes na literatura a respeito desse gênero de fungo quanto ao seu potencial de biorremediação de poluentes ambientais, ressaltando a importância de estudo genômicos mais detalhados sobre a microbiota de lodos provenientes de LTA e LE. Para esse mesmo tratamento, porém após a biodegradação, observou-se, com exclusividade, o gênero *Drechmeria*, o qual está associado com o controle biológico de pragas pela sua ação como endoparasita de organismos de solo, principalmente da classe dos nematoides (CRUZ *et al.*, 2021), além de ser caracterizado como endofítico de plantas, contribuindo no controle de bactérias patogênicas que ocasionam doenças em plantas (ZHAO *et al.*, 2018). Desse modo, esse gênero apresenta importância ecológica benéfica à saúde do solo e de plantas, sendo assim, a utilização do LTA tratado na área agrícola, seja como biofertilizante ou agente de biocontrole de patógenos relacionados a, deve ser levado em consideração. Já para o tratamento LE + In I (11), antes da biodegradação, foram observados dois gêneros exclusivos, *Brettanomyces* e *Naumovozyma*, ambos pertencentes a classe Saccharomycetes. As leveduras representantes desta classe são fermentadoras de açúcares, degradadoras de matéria orgânica e tolerantes a ácido (VARDANYAN; VYRIDES, 2019). Assim, a formação de ácidos orgânicos durante a biodegradação de matéria orgânica (BERNAL; ALBURQUERQUE; MORAL, 2009), com possível diminuição do pH, pode ter favorecido o aumento dessa classe de 60,61% para 72,34% ao final do período de biodegradação. O tratamento LE + In I, após a biodegradação, foi o que mais apresentou gêneros exclusivos de fungos, sendo eles *Puccinia*

(Pucciniomycetes), *Ustilaginoidea* (Sordariomycetes) e *Torulaspota* (Saccharomycetes). Os gêneros *Puccinia* e *Ustilaginoidea* estão relacionados a doenças chamadas de ferrugem, ocorrendo em plantação de trigo e em gramíneas (CHEN, 2020), sendo este último também relacionado a doença do carvão preto no arroz, que compromete seu rendimento e sua produção (JIEHUA *et al.*, 2019). Embora esses gêneros são fitopatogênicos, seu potencial como agentes biorremediadores ainda é pouco investigado. Por fim, o gênero *Torulaspota* está também associado à grandes produtores de lipases.

4.9 CONCLUSÃO

Os resultados das análises de fitotoxicidade de *L. sativa* e *E. sativa* indicam que não foram constatados níveis significativos de toxicidade para a maioria dos parâmetros avaliados (germinação e comprimento do hipocótilo). Contudo, a diminuição no comprimento das radículas de *L. sativa* expostas a maioria dos tratamentos, ressalta a necessidade de cautela para o aproveitamento desses resíduos. No entanto, o processo de biodegradação levou a minimização desses efeitos. Por outro lado, o efeito estimulatório observado para *E. sativa* indica que o LE e o LTA apresenta potencial agrônômico para algumas culturas.

O sequenciamento de bactérias e fungos, foram essenciais para entender a como que a comunidade microbiana se comporta perante a biodegradação de LTA e LE associados ao biofertilizante (In I). No entanto, estudos futuros para a identificação das vias metabólicas de degradação de contaminantes, bem como na estabilização da matéria orgânica presente nesses resíduos permitirá uma maior elucidação do processo.

Uma maior diversidade de bactérias foi verificada em relação aos fungos, sendo o filo Proteobacteria com maior predominância para bactérias e Ascomycota para fungos. Levando em consideração que a grande maioria dos microrganismos encontrados no presente

estudo é de origem ambiental, e em poucos casos, são patógenos, existe uma clara possibilidade de utilização do LTA e LE em solos agrícolas, desde que tratados de forma eficaz, sendo assim, sugerindo no presente trabalho mais estudos para sua possível aplicação.

Contudo, um tempo mais prolongado de biodegradação para total eliminação da toxicidade e sanitização dos tratamentos é sugerido.

4.10 REFERÊNCIAS

AMATUSSALAM, A.; ABUBACKER, M. N.; RAJENDRAN, R. Babu. In situ *Carica papaya* stem matrix and *Fusarium oxysporum* (NCBT-156) mediated bioremediation of copper. **Biosciences, Biotechnology Research Asia**, v. 9, n. 2, p. 757-764, 2012.

ASSRESS, H. A.; SELVARAJAN, R.; NYONI, H.; NTUSHELO, K.; MAMBA, B. B.; MSAGATI, T. A. Diversity, co-occurrence and implications of fungal communities in wastewater treatment plants. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

ANGELICA, C. D. S.; KARINA, T. M. E. G.; DISNEY, R. D.; CRISTINA, F. S.; ROSANE, F. S. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: study of the enzymatic activities. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 32, p. 4176-4190, 2013.

BARROS, H. S.; SOUZA, L. V.; SANTOS, A. P. B.; SOUZA, L. D.; SANTOS, A. Extração do material lipídico presente na espuma e no lodo de esgoto sanitário através de diferentes métodos. **HOLOS**, v. 6, p. 137-145, 2015.

BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5444-5453, 2009.

BITENCOURT, G.A.; APOLARI, J. P.; DE SOUZA, G.; MONTEIRO, R. T. R. Lodo gerado em Estação de Tratamento de Água: Avaliação preliminar da toxicidade em plantas de milho. **Scientia Plena**, v. 16, n. 12, 2021.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

CALLEJA-RODRIGUEZ, A.; PAN, J.; FUNDA, T.; CHEN, Z.; BAISON, J.; ISIK, F.; WU, H. X. Evaluation of the efficiency of genomic versus pedigree predictions for growth and wood quality traits in Scots pine. **BMC genomics**, 21(1), 1-17.

CAO, L.; LIAO, L.; SU, C.; MO, T.; ZHU, F.; QIN, R.; LI, R. Metagenomic analysis revealed the microbiota and metabolic function during co-composting of food waste and residual sludge for nitrogen and phosphorus transformation. **Science of The Total Environment**, v. 773, p. 145561, 2021.

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 21, p. 21475–21483, 2019.

CHARKHESTANI, A.; KEBRIA, D. Y. Investigation of effective microorganisms bioaugmentation in an on-site aerobic food waste composter. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 9, p. 8507–8522, 5 set. 2022.

CHEN, K. Identification of bacterial species in Kuwaiti waters through DNA sequencing. In: IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012015, 2017.

CHEN, X. Pathogens which threaten food security: *Puccinia striiformis*, the wheat stripe rust pathogen. **Food Security**, v. 12, n. 2, p. 239-251, 2020.

COSTA, L. A.M.; COSTA, M. S. S.M.; DAMACENO, F. M.; CHIARELOTTO, M.; BOFINGER, J.; GAZZOLA, W. Bioaugmentation as a strategy to improve the compost quality in the composting process of agro-industrial wastes. **Environmental Technology & Innovation**, v. 22, p. 101478, 2021.

CRUZ, G.; LEÓN, L.; BETHANCOURT, A.; RÍOS, N.; KRAUSE, R.; SANDOVAL, N. Antagonistic effects of native strains of the soil fungus *Paecilomyces* against gastrointestinal nematode and protozoan parasites of pigs in Panama. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 45, p. 204-210, 2021.

DARWESH, O. M.; LI, H.; MATTER, I. A. Nano-bioremediation of textile industry wastewater using immobilized CuO-NPs myco-synthesized by a novel Cu-resistant *Fusarium oxysporum* OSF18. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-13, 2022.

FIJALKOWSKI, K.; RORAT, A.; GROBELAK, A.; KACPRZAK, M. J. The presence of contaminations in sewage sludge–The current situation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 1126–1136, 2017.

FRANCO, N. M.; LEITE, D. A. N. O.; YABUKI, L. N. M.; ZANATTA, M. B. T.; MENEGARIO, A. A.; ANGELIS, D. F.; MAZZEO, D. E. C. Biodegradability of water treatment sludge influenced by sewage sludge, focusing its use in agriculture as soil conditioner. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 10, p. 9623–9638, 2022.

GIRISHA, S. T.; RAVIKUMAR, K.; GIRISH, V. Lipid extraction for biodiesel production from municipal sewage water sludge. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 242-249, 2014.

GURMESSA, B.; MILANOVIC, V.; PEDRETTI, E. F.; CORTI, G.; ASHWORTH, A. J.; AQUILANTI, L.; COCCO, S. Post-digestate composting shifts microbial composition and degrades antimicrobial resistance genes. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125662, 2021.

GUSMAO, C. A. B.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1683-1692, 2010.

HELANDER, H.; PETIT-BOIX, A.; LEIPOLD, S.; BRINGEZU, S. How to monitor environmental pressures of a circular economy: An assessment of indicators. **Journal of Industrial Ecology**, v. 23, n. 5, p. 1278–1291, 27 out. 2019.

IRANZO, M.; GAMÓN, M.; BOLUDA, R.; MORMENEO, S. Analysis of pharmaceutical biodegradation of WWTP sludge using composting and identification of certain microorganisms involved in the process. **Science of the Total Environment**, v. 640, p. 840-848, 2018.

JIEHUA, Q.; SHUAI, M.; YIZHEN, D.; SHIWEN, H.; YANJUN, K. *Ustilaginoidea virens*: a fungus infects rice flower and threatens world rice production. **Rice Science**, v. 26, n. 4, p. 199-206, 2019.

KORHONEN, J.; HONKASALO, A.; SEPPÄLÄ, J. Circular Economy: The Concept and its Limitations. **Ecological Economics**, v. 143, p. 37–46, jan. 2018.

KRAH, D.; GHATTAS, A. K.; WICK, A.; BRÖDER, K.; TERNES, T. A. Micropollutant degradation via extracted native enzymes from activated sludge. **Water research**, v. 95, p. 348-360, 2016.

LIMA, D. P. D.; FREGONEZI, G. A. D. F.; HATA, F. T.; VENTURA, M. U.; RESENDE, J. T. V. D.; WANDERLEY, C. D. S.; FIGUEIREDO, A. Use of reduced Bokashi doses is similar to NPK fertilization In Iceberg lettuce production. **Agronomía Colombiana**, v. 40, n. 2, 31 ago. 2022.

LIU, J.; BAO, Z.; WANG, C.; WEI, J.; WEI, Y.; CHEN, M. Understanding of mercury and methylmercury transformation in sludge composting by metagenomic analysis. **Water Research**, v. 226, p. 119204, nov. 2022.

MAZZEO, D. E. C.; CASADO, M.; PIÑA, B.; MARIN-MORALES, M. A. Detoxification of sewage sludge by natural attenuation and implications for its use as a fertilizer on agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 978–985, 2016.

MAZZEO, D. E. C.; DOMBROWSKI, A.; OLIVEIRA, F. A.; LEVY, C. E.; OEHLMANN, J.; MARCHI, M. R. R. Endocrine disrupting activity in sewage sludge: Screening method, microbial succession and cost-effective strategy for detoxification. **Journal of Environmental Management**, v. 330, p. 117207, mar. 2023.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60–69, 2015.

- MAZZEO, D. E. C.; MISOVIC, A.; OLIVEIRA, F. A.; LEVY, C. E.; OEHLMANN, J.; MARCHI, M. R. R. Effects of biostimulation by sugarcane bagasse and coffee grounds on sewage sludges, focusing agricultural use: Microbial characterization, respirometric assessment and toxicity reduction. **Waste Management**, v. 118, p. 110–121, 2020.
- MELO, W.; DELARICA, D.; GUEDES, A.; LAVEZZO, L.; DONHA, R.; ARAÚJO, A.; MACEDO, F. Ten years of application of sewage sludge on tropical soil. A balance sheet on agricultural crops and environmental quality. **Science of the total environment**, v. 643, p. 1493–1501, 2018.
- MEYER-WOLFARTH, F.; OLDENBURG, E.; MEINERS, T., MUÑOZ, K.; SCHRADER, S. Effects of temperature and soil fauna on the reduction and leaching of deoxynivalenol and zearalenone from *Fusarium graminearum* infected maize stubbles. **Mycotoxin research**, v. 37, n. 3, p. 249-263, 2021.
- MORGAN-SAGASTUME, F.; ALLEN, D. G. Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45 C. **Water research**, v. 39, n. 6, p. 1061-1074, 2005.
- NEHER, D. A.; WEICHT, T. R.; BATES, S. T.; LEFF, J. W.; FIERER, N. Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79512, 2013.
- NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 29, n. 7, p. 1484-1489, 2010
- NOZHEVNIKOVA, A. N.; MIRONOV, V. V.; BOTCHKOVA, E. A.; LITTI, Y. V.; RUSSKOVA, Y. I. Composition of a microbial community at different stages of composting and the prospects for compost production from municipal organic waste. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 55, p. 199-208, 2019.
- ODIMEGWU, T. C.; ZAKARIA, I.; ABOOD, M. M.; NKETSIAH, C. B. K.; AHMAD, M. Review on different beneficial ways of applying alum sludge in a sustainable disposal manner. **Civil Engineering Journal**, v. 4, n. 9, p. 2230–2241, 2018.
- PARK, J. M.; LEE, S. B.; KIM, J. P.; KIM, M. J.; KWON, O. S.; JUNG, D. I. Behavior of PAHs from sewage sludge incinerators in Korea. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 690-695, 2009.
- PHOOI, C. L.; AZMAN, E. A.; ISMAIL, R. Role of Organic Manure Bokashi Improving Plant Growth and Nutrition: A Review. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 38, n. 4, 2022.
- RASHID, M. I.; SHAHZAD, K. Food waste recycling for compost production and its economic and environmental assessment as circular economy indicators of solid waste management. **Journal of Cleaner Production**, v. 317, p. 128467, out. 2021.
- SANTOS, T.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A. Phyto-genotoxicity assessment of different associations between sludges from Water and Sewage Treatment Plants, before and after the bioremediation process. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 40029–40040, 3 jun. 2022.

SOARES, K. R. M.; FERREIRA, C. C.; DA SILVA RAMOS, A.; LOBATO, A. C. N.; FRAXE, T. J. P.; SANTOS, H. P.; CASTRO, A. P. Production of Arugula Under Doses of Bokashi Fermented Compound. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 10, p. 181, 15 set. 2020.

SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; PAMPLONA-SILVA, M. T.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere**, v. 199, p. 10–15, 2018.

TANG, Z.; HUANG, C.; LI, W.; LI, W.; TAN, W.; XI, B.; ZHU, L. Horizontal transfer of intracellular and extracellular ARGs in sludge compost under sulfamethoxazole stress. **Chemical Engineering Journal**, v. 454, p. 139968, fev. 2023.

VARDANYAN, A.; VYRIDES, I. Acidophilic bioleaching at high dissolved organic compounds: Inhibition and strategies to counteract this. **Minerals Engineering**, v. 143, p. 105943, 2019.

WAINAINA, S.; AWASTHI, M. K.; SARSAIYA, S.; CHEN, H.; SINGH, E.; KUMAR, A.; TAHERZADEH, M. J. Resource recovery and circular economy from organic solid waste using aerobic and anaerobic digestion technologies. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122778, abr. 2020.

WANG, H.; ZHAO, Y.; WEI, Y.; ZHAO, Y.; LU, Q.; LIU, L.; WEI, Z. Biostimulation of nutrient additions on indigenous microbial community at the stage of nitrogen limitations during composting. **Waste Management**, v. 74, p. 194–202, abr. 2018.

YANG, S.; SONG, L. Succession of bacterial community structure and metabolic function during solid waste decomposition. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121865, nov. 2019.

ZERVA, A.; LIMNAIOS, A.; KRITIKOU, A. S.; THOMAIDIS, N. S.; TAOUKIS, P.; TOPAKAS, E. A novel thermophile β -galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* producing galactooligosaccharides from acid whey. **New Biotechnology**, v. 63, p. 45-53, 2021.

ZHAO, J. C.; WANG, Y. L.; ZHANG, T. Y.; CHEN, Z. J.; YANG, T. M.; WU, Y. Y.; ZHANG, Y. X. Indole diterpenoids from the endophytic fungus *Drechmeria* sp. as natural antimicrobial agents. **Phytochemistry**, v. 148, p. 21-28, 2018.

ZHENG, W.; YU, Z.; XIA, Y.; WEN, X. Influence of polyaluminum chloride on microbial characteristics in anaerobic membrane bioreactors for sludge digestion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, p. 1005-1017, 2018.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disposição final dos lodos provenientes de ETA e ETE como condicionadores de solo na agricultura é pautada, principalmente, em suas características físico-químicas. Como comprovado no presente estudo, medições de pH, elevada quantidade de matéria orgânica, nutrientes e carbono orgânico contribuem diretamente para seu potencial agrônomo. Somado a isso, concentração de metais, bem abaixo do estabelecido pela resolução CONAMA n° 498/2020 para disposição em solo, favorece seu aproveitamento.

Contudo, por se tratarem de matrizes complexas, o LTA e o LE, os quais podem conter centenas de contaminantes, existe a necessidade de análises mais detalhadas, como a avaliação da biodegradabilidade desses resíduos, juntos ou associados, além da avaliação da toxicidade por meio de diferentes organismos e *endpoints*.

Neste sentido, este trabalho mostrou que a incorporação de biofertilizantes na tentativa de estimular a estabilização da matéria orgânica desses resíduos, como fonte de nutrientes adicionais e microrganismos, não foi efetiva, demonstrando que microrganismos autóctones biodegradaram os lodos com maior facilidade. No entanto, a diminuição dos níveis de toxicidade observada para alguns tratamentos destacou o potencial desse processo e do aproveitamento desses resíduos na agricultura.

O estudo de metagenômica revelou que a grande maioria dos microrganismos identificados são comuns a todos os tratamentos. Contudo, gêneros e espécies exclusivas ressaltam a especificidade de cada tipo de lodo e o período da biodegradação, podendo ser utilizados como marcadores de cada etapa do processo. Ainda, pela elevada complexidade da

comunidade microbiana detectada, não foi possível estabelecer uma relação direta entre toxicidade e agente biodegradador.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-JUNIOR, C. H.; OLIVEIRA, M. G. D.; CARDOSO, P. H. S.; MANDÚ, T. D. S.; FLORENTINO, A. L.; OLIVEIRA, F. C.; CAPRA, G. F. Sewage sludge application in *Eucalyptus urograndis* plantation: availability of phosphorus in soil and wood production. **Frontiers in Environmental Science**, v.8, pag 1-14, 2020.

ABNT, **Associação Brasileira de Normas Técnicas. Águas - Determinação de Resíduos (Sólidos)-Método Gravimétrico: NBR 10664**. Rio de Janeiro, v. 14, 1989.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas técnicas. Águas - Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) - Método de Incubação (20°C, cinco dias): NBR 12614**. Rio de Janeiro, p. 5, 1992.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos sólidos: classificação: NBR 10.004**. São Paulo, v. 2, 2004.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática–Toxicidade aguda–Método de ensaio com *Daphnias* spp. Cladóceras, Crustácea: NBR 12713**. Rio de Janeiro, v. 12713, p. 23, 2009.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia terrestre – Toxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae): NBR 15537**. São Paulo. 17P, 2014.

ADAMS, G. O.; FUFYIN, P. T.; OKORO, S. E.; Ehinomen, I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28-39, 2015.

ADEWUYI, Y. G. Sonochemistry in environmental remediation. 1. Combinative and hybrid sonophotochemical oxidation processes for the treatment of pollutants in water. **Environmental Science & technology**, v. 39, n. 10, p. 3409-3420, 2005

AHMAD, T.; AHMAD, K.; ALAM, M. Characterization of water treatment plant's sludge and its safe disposal options. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 950-955, 2016.

ALAM, M. S.; KAUR, G.; JABBAR, Z.; JAVED, K.; ATHAR, M. *Eruca sativa* L. seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 910-920, 2007.

ANDREOLI, C. V.; PINTO, M. **Aproveitamento do lodo gerado em estações de tratamento de água e esgotos sanitários, inclusive com a utilização de técnicas consorciadas com resíduos sólidos urbanos**. 273p. Projeto PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, 2001.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F.; RONTELTAP, M. Sludge treatment and disposal. **IWA Publishing**, 2007.

BABATUNDE, A. O.; ZHAO, Y. Q. Constructive approaches toward water treatment works sludge management: an international review of beneficial reuses. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 129-164, 2007.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BERINI, F.; CASCIELLO, C.; MARCONE, G. L.; MARINELLI, F. Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS microbiology letters*, v. 364, n. 21, p.211, 2017.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2006.

SÃO PAULO. Lei nº 12.300, de 16 de março de 2006. Institui a Política Estadual de Resíduos Sólidos e define princípios e diretrizes. Disponível em: «<https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2006/lei-12300-16.03.2006.html>». Acessado em: 20 maio 2020.

BRASIL, PNRS. Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 3, 2010.

BRASIL. Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Águas-ANA. **Lei Nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Da Política Nacional de Recursos Hídricos**. Brasil: 1997. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19433.htm. Acessado em: 20 maio 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente -MMA. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Brasil: 1998**. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=320>. Acessado em: 18 maio 2020.

BRUCE, A. M.; DAVIS, R. D. Sewage sludge disposal: current and future options. In: *Water Pollution Research and Control Brighton*. **Pergamon**, p. 1113-1128, 1988.

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. **Process Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 45-47, 1992

CAIXETA, D. M. **Geração de energia elétrica a partir da incineração de lixo urbano: o caso de Campo Grande/MS**. Monografia de Especialização, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J. A.; Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, 13(7), 581-583.

CASTRO, R. A. **Tratamento de lodo de esgoto urbano no solo com microorganismos de "Landfarming" e substrato oleoso**. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Determinação da Demanda Química de Oxigênio- método da Oxidação por Dicromato de potássio em Refluxo, Norma: L5. 121**. São Paulo, 1 ed, 1990.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Teste de toxicidade aguda utilizando *Spirillum volutans* – método de ensaio, Norma: L5.228**. São Paulo, 1998.

CETESB . **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Plano de Resíduos Sólidos do Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 1, 2014.

CETESB.. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Inventário Estadual de Resíduos Sólidos Urbanos**. São Paulo, 2019.

CHAVES, A.P.; LEAL, L. S. F; BRAGA, P. F. A. Flotação. **Tratamento de Minerais**, 6 ed, cap.10, p. 409-459, 2018.

CHIU, C. Y.; MILLER, S. A. Clinical metagenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 341-355, 2019.

CHOUDHARY, M.; PETER, C. N.;SHUKLA, S. K.; GOVENDER, P. P.; JOSHI, G. M.; WANG, R. Environmental Issues: A Challenge for Wastewater Treatment. In: Green Materials for Wastewater Treatment. **Springer** , p. 1-12, 2020

CIEŚLIK, B. M.; NAMIEŚNIK, J.; KONIECZKA, P. Review of sewage sludge management: standards, regulations, and analytical methods. **Journal of Cleaner Production**, v. 90, p. 1-15, 2015.

COELHO, S. T.; VELÁZQUEZ, S. M. S. G.; SILVA, O. C. D. Geração de energia elétrica a partir do biogás proveniente do tratamento de esgoto. **Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural**, São Paulo, 2006.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 313, DE 29 DE OUTUBRO DE 2002**. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/residuos/CONAMA3132002.pdf>. Acessado em: 20 maio 2020.

DONAGEMA, G. K.; DE CAMPOS, D. B.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G; VIANA, J. M. Manual de métodos de análise de solo. **Embrapa Solos**, Rio de Janeiro, 2 ed, p.230, 2011

FAIRCHILD, J. F.; RUESSLER, D. S.; HAVERLAND, P. S; CARLSON, A. R. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 353-357, 1997.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; BARGIELA, R.; STREIT, W. R.; GOLYSHINA, O. V.; GOLYSHIN, P. N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 22-34, 2016.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz. **Toxicidade**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/virtual%20tour/hipertextos/up1/toxicidade.html>. Acessado em: 22 junho 20210.

FRANCO, H. A.; MARTINS, G. O. M., MUSSEL, Y. L.; MORENO, S. C.; THODE FILHO, S.; MARQUES, M. R.C. Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista de Estudos Ambientais**, v. 19, n. 1, p. 36-43, 2017.

GEYER, H.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. The effects of organic environmental chemicals on the growth of the alga *Scenedesmus subspicatus*: A contribution to environmental biology. **Chemosphere**, v. 14, n. 9, p. 1355-1369, 1985.

GINORIS, Y. P.; AMARAL, A. L.; NICOLAU, A.; COELHO, M. A. Z.; FERREIRA, E. C. Development of an image analysis procedure for identifying protozoa and metazoa typical of activated sludge system. **Water research**, v. 41, n. 12, p. 2581-2589, 2007.

GHOSH, A.; MEHTA, A.; KHAN, A. M. Metagenomic analysis and its applications. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: **ABC of Bioinformatics**. [S.l.]: Elsevier, 2018. v. 1–3. p. 184–193

GUERRA, R. C. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no terminal marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP visando sua disposição final**. Tese de Doutorado, Rio Claro-São Paulo, p.125, 2009

GUNDERSON, C. A.; KOSTUK, J. M.; GIBBS, M. H.; NAPOLITANO, G. E.; WICKER, L. F.; RICHMOND, J. E.; STEWART, A. J. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 16, n. 12, p. 2529-2537, 1997.

HALL, J. E.; DALIMIER, F. Waste management–sewage sludge: survey of sludge production, treatment, quality and disposal in the EC. **EC Reference**, n. B4-3040, p. 014156, 1994.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998.

HANJIE, Z. Sludge treatment to increase biogas production. Skolan för arkitektur och samhällsbyggnad, **Kungliga Tekniska Högskolan**, 2010.

HAMPTON, M.J.T.; LOPEZ, J. V.; GILBERT, J. A. The human microbiome: an emerging tool in forensics. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 228, 2017.

HORTON, N. C.; MATHEW, P. A. NKp44 and natural cytotoxicity receptors as damage-associated molecular pattern recognition receptors. **Frontiers In Immunology**, v. 6, p. 31, 2015.

HUANG, C. H.; WANG, S. Y. Application of water treatment sludge in the manufacturing of lightweight aggregate. **Construction and Building Materials**, v. 43, p. 174-183, 2013.

HUGENHOLTZ, Philip; TYSON, Gene W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481-483, 2008.

IWAKI, G. **Destinação Final de Lodos de ETAs e ETES. Portal Tratamento de Água, 2018**. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/destinacao-final-de-lodos-de-et-as-e-et-es>. Acessado em: 19 junho 2020.

KACPRZAK, M.; NECZAJ, E.; FIJAŁKOWSKI, K.; GROBELAK, A.; GROSSER, A.; WORWAG, M.; SINGH, B. R. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. **Environmental research**, v. 156, p. 39-46, 2017.

KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, n. 1, p. 1-16, 2001

KIEHL, E. J. Fertilizantes orgânicos. Piracicaba, **Agronômica Ceres**, 1985.

KIM, J. W.; ISHIBASHI, H.; YAMAUCHI, R.; ICHIKAWA, N.; TAKAO, Y.; HIRANO, M.; ARIZONO, K. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 227-232, 2009.

KIZINIEVIČ, O.; ŽURAUŠKIENĖ, R.; KIZINIEVIČ, V.; ŽURAUŠKAS, R. Utilisation of sludge waste from water treatment for ceramic products. **Construction and Building Materials**, v. 41, p. 464-473, 2013.

JAEGER, N.; MORAES, J. P.; KLAUCK, C. R.; GEHLEN, G.; RODRIGUES, M. A. S.; ZIULKOSKI, A. L. Cytotoxicity assays to evaluate tannery effluents treated by photoelectrooxidation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 53-61, 2015.

JIN, H.; MO, L.; PAN, L.; HOU, Q.; LI, C.; DARIMA, I.; YU, J. Using PacBio sequencing to investigate the bacterial microbiota of traditional Buryatian cottage cheese and comparison

with Italian and Kazakhstan artisanal cheeses. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 8, p. 6885-6896, 2018.

LAITANO, K. S.; MATIAS, W.G. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 43-47, 2006.

LI, J.; ZHENG, Y.; XU, H.; XI, X.; HOU, Q.; FENG, S.; SUN, T. Bacterial microbiota of Kazakhstan cheese revealed by single molecule real time (SMRT) sequencing and its comparison with Belgian, Kalmykian and Italian artisanal cheeses. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2017.

LI, W.; YAO, J. C.; ZHUANG, J. L.; ZHOU, Y. Y.; SHAPLEIGH, J. P. Metagenomics revealed the phase-related characteristics during rapid development of halotolerant aerobic granular sludge. **Environment international**, v. 137, p. 105548, 2020.

LIU, Q.; MENG, X.; LI, T.; RAZA, W.; LIU, D.; SHEN, Q. The growth promotion of peppers (*Capsicum annuum* L.) by *Trichoderma guizhouense* NJAU4742-based biological organic fertilizer: Possible role of increasing nutrient availabilities. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1296, 2020.

LOWE, J. J.; JELDEN, K. Strategies for Waste Management and Decontamination. In: Bioemergency Planning. **Springer, Cham**, p. 53-66. 2018.

MCGHEE, T. J.; STEEL, E. W. **Water Supply and Sewerage**. New York: McGraw-Hill, 1991.

MA, J.; XU, L.; WANG, S.; ZHENG, R.; JIN, S.; HUANG, S.; HUANG, Y. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, n. 2, p. 128-132, 2002.

MAÑAS, P.; LAS HERAS, J. Phytotoxicity test applied to sewage sludge using *Lactuca sativa* L. and *Lepidium sativum* L. seeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 273-280, 2018.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MATSUMOTO, S. T. ; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I ; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the Genotoxic and Mutagenic Effect of Chromium residues Present in Tannery Effluents Using the Micronucleus and Comet Assay in *Oreochromis niloticus* and Chromosomes Aberrations in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MELI, K.; KAMIKA, I.; KESHRI, J.; MOMBA, M. N. B. The impact of zinc oxide nanoparticles on the bacterial microbiome of activated sludge systems. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39176, 2016.

MO, L.; YU, J.; JIN, H.; HOU, Q.; YAO, C.; REN, D.; ZHANG, H. Investigating the bacterial microbiota of traditional fermented dairy products using propidium monoazide with single-molecule real-time sequencing. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 5, p. 3912-3923, 2019

NAZIR, As. Review on metagenomics and its applications. **Imperial Journal of Intersdisciplinary Research**, v. 2, n. 10, 2016.

NGUYEN, N. T. H.; WANG, W. Y.; HUANG, W. L.; HUANG, C. L.; HIANG, T. Y. Metagenomics analyses of microbial dynamics associated with putative flavor development in mash fermentation of sake. **LWT**, p. 113570, 2022.

NORBERG, T. J.; MOUNT, D. I. A new fathead minnow (*Pimephales promelas*) subchronic toxicity test. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 4, n. 5, p. 711-718, 1985

ODIMEGWU, T. C.; ZAKARIA, I.; ABOOD, M. M.; NKETSIAH, C. B. K.; AHMAD, M. Review on different beneficial ways of applying alum sludge in a sustainable disposal manner. **Civil Engineering Journal**, v. 4, n. 9, p. 2230-2241, 2018.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline 208: Terrestrial Plants, Growth Test. **OECD Guidelines for testing of chemical**. OECD Paris. (1984).

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guideline for testing of chemicals** n°207, 1984b.

PALANIAPPAN, M.; GLEICK, P. H.; ALLEN, L.; COHEN, M. J.; CHRISTIAN-SMITH, J.; SMITH, C. Clearing the Waters, A Focus on Water Quality Solutions; **United Nations Environment Programme & Pacific Institute**: Oakland, CA, USA, 2010.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ZOTTA, T.; The microbiota of dairy milk: A review. **International Dairy Journal**, v. 107, p. 104714, 2020.

PAVLÍK, Z.; FOŘT, J., ZÁLESKÁ, M.; PAVLÍKOVÁ, M.; TRNÍK, A. Energy-efficient thermal treatment of sewage sludge for its application in blended cements. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 409-419, 2016.

PEDROZA, M. M.; VIEIRA, G. E. G.; DE SOUSA, J. F.; CASTILHO, P. A.; LEAL, E. R. M.; CRUZ, M. C. Produção e tratamento de lodo de esgoto—uma revisão. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 147-158, 2010.

PEREIRA, K. L. A. **Estabilização de um solo com cimento e cinza de lodo para uso em pavimentos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2012.

PORRAS, Á. C.; LIMA, I. R.; MORITA, D. Incorporação do lodo das estações de tratamento de água e agregado reciclado de resíduo da construção civil em elementos de alvenaria-tijolos estabilizados com cimento. **Ciencia e Ingeniería Neogranadina**, v. 18, n. 2, p. 5-28, 2008.

PRETTI, C.; CHIAPPE, C.; BALDETTI, I.; BRUNINI, S.; MONNI, G.; INTORRE, L. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 4, p. 1170-1176, 2009.

PULICHARLA, R.; DAS, R. K.; BRAR, S. K.; DROGUI, P.; SARMA, S. J.; VERMA, M.; VALERO, J. R. Toxicity of chlortetracycline and its metal complexes to model microorganisms in wastewater sludge. **Science of The Total Environment**, v. 532, p. 669-675, 2015.

REGINATTO, V.; KUNST, S.; DURÁN, N. Interferences of dark coloured waters and wastewater on algae toxicity assessment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 73, n. 3-4, p. 141-152, 1999.

REN, S. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. **Environment international**, v. 30, n. 8, p. 1151-1164, 2004.

RIGO, M. M.; RAMOS, R. R.; CERQUEIRA, A. A.; SOUZA, P.; MARQUES, M. Destinação e reuso na agricultura do lodo de esgoto derivado do tratamento de águas residuárias domésticas no Brasil. **Gaia Scientia**, v. 8, n. 1, p. 174-186, 2014.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; LOMBARDI, A. T. Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1027-1033, 2010

ROMDHANA, M. H.; LECOMTE, D.; LADEVIE, B.; SABLAYROLLES, C. Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 87, n. 6, p. 377-386, 2009

SAPESP- Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. **Tratamento de Água**. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=47>. Acessado em: 23 maio 2020.

SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo). Dicas de economia. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=140>. Acesso em: 29 jul. 2020.

SÃO PAULO, Lei nº 12.300, de 16 de março de 2006. **Institui a Política Estadual de Resíduos Sólidos e define princípios e diretrizes**. Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2006/lei-12300-16.03.2006.html>. Acessado em: 21 maio 2020.

SARON, A.; LEITE, V. M. B. Quantificação de lodo em estação de tratamento de água. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. p. 201, 2001.

SILVA, A. C. **Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado**. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. Dissertação de Mestrado, 126p, 2002.

SILVEIRA, C.; KURODA, E. K.; ABE, C. H.; YOSHIKI, L.; HIROOKA, E. Y. Desaguamento do lodo de estações de tratamento de água por leito de drenagem/secagem. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, n. 2, p. 297-306, 2015.

SHAW, I.; CHADWICK, J. Principles of environmental toxicology. **CRC Press**, 1998.

SHIU, H. Y.; LEE, M.; CHIUEH, P. T. Water reclamation and sludge recycling scenarios for sustainable resource management in a wastewater treatment plant in Kinmen islands, Taiwan. *Journal of Cleaner Production*, v. 152, p. 369-378, 2017.

SMITH, K. M.; FOWLER, G. D.; PULLKET, S.; GRAHAM, N. D. Sewage sludge-based adsorbents: a review of their production, properties and use in water treatment applications. **Water research**, v. 43, n. 10, p. 2569-2594, 2009.

SOUZA, M. E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia ("). **Revista DAE**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984.

SOUSA, C. E. **Avaliação de sistemas biorremediadores em efluentes da lagoa facultativa da estação de tratamentos de esgotos em Mangabeira, João Pessoa-PB**. Dissertação Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, p.1-75, 2015.

STROTMANN, U.; REUSCHENBACH, P.; SCHWARZ, H.; PAGGA, U. Development and evaluation of an online CO₂ evolution test and a multicomponent biodegradation test system. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4621-4628, 2004.

SVENSSON, B. M.; MATHIASSEN, L.; MÅRTENSSON, L.; BERGSTRÖM, S. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. **Environmental monitoring and assessment**, v. 102, n. 1-3, p. 309-321, 2005

TOMEI, M. C.; BERTANZA, G.; CANATO, M.; HEIMERSSON, S.; LAERA, G.; SVANSTRÖM, M. Techno-economic and environmental assessment of upgrading alternatives for sludge stabilization in municipal wastewater treatment plants. **Journal of cleaner production**, v. 112, p. 3106-3115, 2016.

TUROVSKIY, I. S.; MATHAI, P. K. **Wastewater sludge processing**. John Wiley & Sons, 2006.

VAN LEEUWEN, C. J. Ecotoxicological effects. In: **Risk Assessment of Chemicals**. Springer, Dordrecht, p. 175-237, 1995.

WAQAS, M.; KHAN, S.; QING, H.; REID, B. J.; CHAO, C. The effects of sewage sludge and sewage sludge biochar on PAHs and potentially toxic element bioaccumulation in *Cucumis sativa* L. **Chemosphere**, v. 105, p. 53-61, 2014.

WATKINS, K. **Human Development Report 2006**. United Nations Development Programme. 2006.

WERTHER, J.; OGADA, T. Sewage sludge combustion. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 25, n. 1, p. 55-116, 1999.

ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; CONDELLI, N.; PARENTE, E. Metataxonomic and metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese manufacture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 14, p. 3898-3912, 2022.

7 APÊNDICES

Tabela Suplementar 1. Composição granulométrica do solo

Parameters	Composição Granulométrica (%)					Classe de Textura
	Grossura	Média	Fina	Lama	Argila	
Diâmetro (mm)	0,6 – 2,0	0,2 – 0,6	0,06 – 0,2	0,002 – 0,06	<0,002	
Retenção (%)	0,44	1,44	74,3	16,49	7,59	Arenoso
Incerteza (%)	0.00	0,03	6,70	6,90	0,49	

Fonte: Franco, 2021

Tabela Suplementar 2: Concentração de nutrientes e condutividade elétrica do solo.

Amostra	Micronutrientes (mg/kg)					Macronutrientes (mg/kg)			Electrical conductivity (dS/m)
	S	Na	Cu	Zn	B	K	Ca	Mg	
Solo	<0,255	131	23,52	24,87	19,98	308	857	377	0,623

Fonte: Franco, 2021

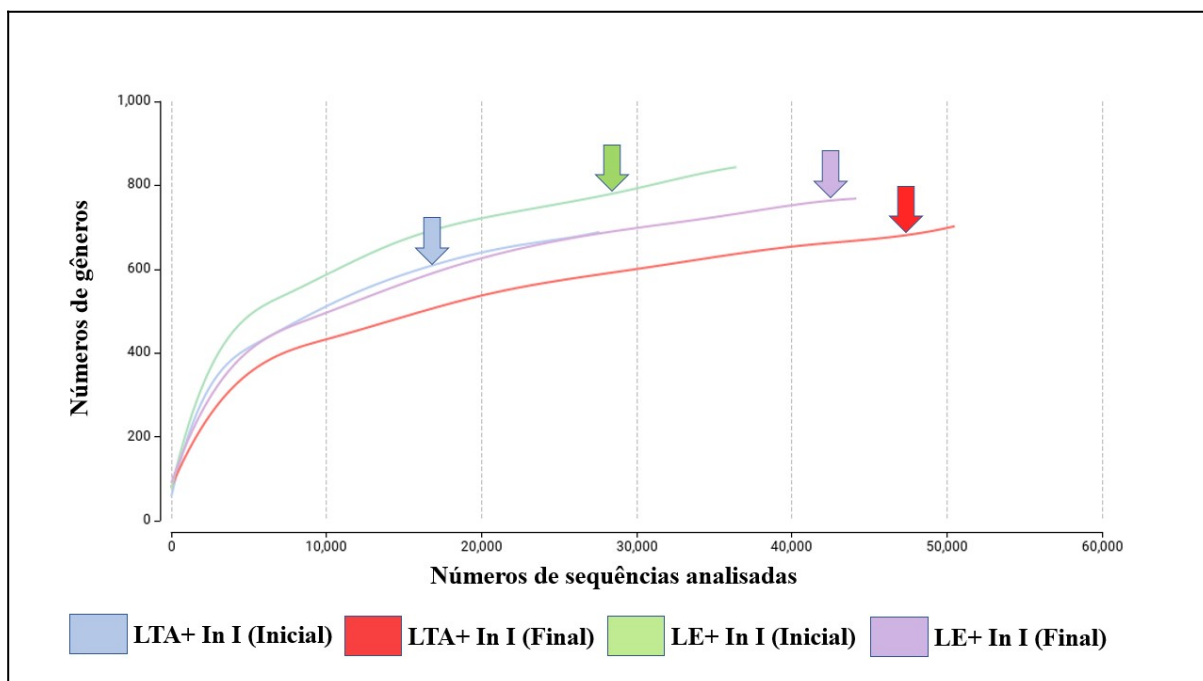


Figura S1. Curva de rarefação das sequências de bactérias encontradas durante a biodegradação dos LTA + In I (inicial e final) e LE + In I (inicial e final).

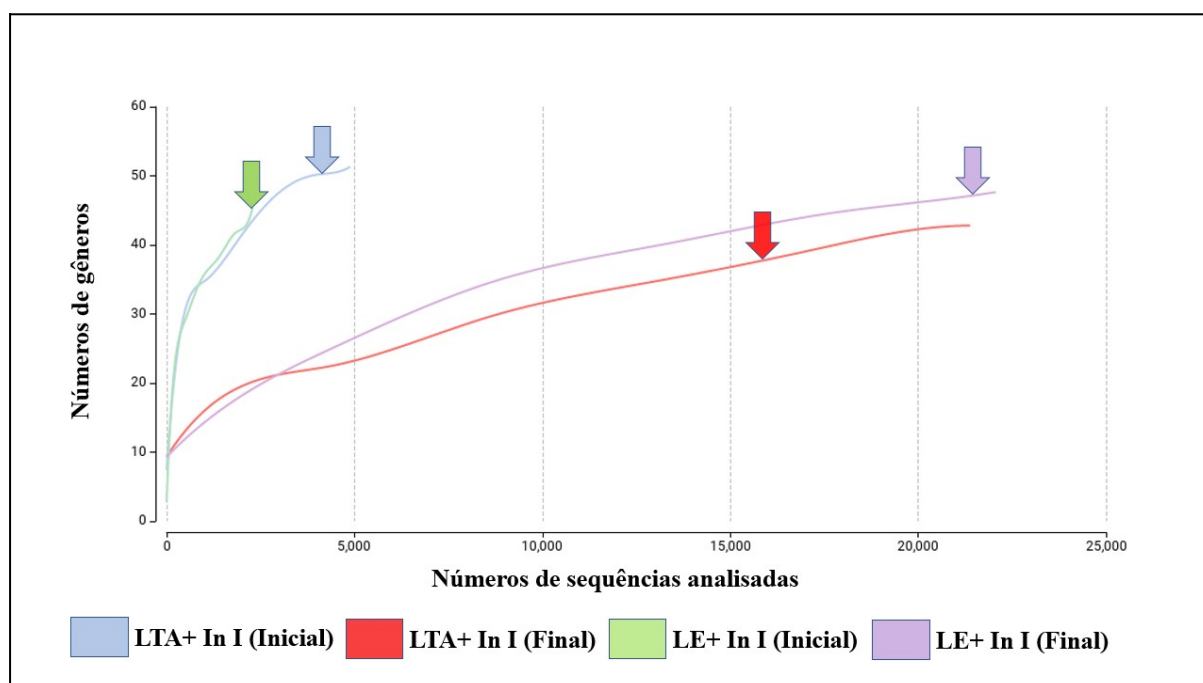


Figura S2. Curva de rarefação das sequências de fungos encontradas durante a biodegradação dos LTA + In I (inicial e final) e LE + In I (inicial e final).

Tabela suplementar 3: Gêneros de bactérias compartilhados e exclusivos entre os tratamentos LTA + In I e LE + In I em sua fase inicial e final na biodegradação. onde o (X) representa os número de organismos encontrados nas amostras e o (-) organismos ausentes nas amostras.

Gêneros Compartilhados e exclusivos	Gêneros	Tratamento LTA + In I		Tratamento LE + In I	
		Antes	Depois	Antes	Depois
	<i>Aminipila</i>	x	x	x	x
	<i>Paraconexibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Actinopolyspora</i>	x	x	x	x
	<i>Chloroflexus</i>	x	x	x	x
	<i>Rhodococcus</i>	x	x	x	x
	<i>Tuwongella</i>	x	x	x	x
	<i>Methylovirgula</i>	x	x	x	x
	<i>Paludibaculum</i>	x	x	x	x
	<i>Rhodoplanes</i>	x	x	x	x
	<i>Dermabacter</i>	x	x	x	x
	<i>Ilumatobacter</i>	x	x	x	x
	<i>Kribbella</i>	x	x	x	x
	<i>Acuticoccus</i>	x	x	x	x
	<i>Lysobacter</i>	x	x	x	x
	<i>Acidiphilium</i>	x	x	x	x
	<i>Luteolibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Nitrospirillum</i>	x	x	x	x
	<i>Pusillimonas</i>	x	x	x	x
	<i>Anaerostipes</i>	x	x	x	x
	<i>Pseudoclostridium</i>	x	x	x	x
	<i>Methyloceanibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Clostridium</i>	x	x	x	x
Gêneros compartilhados entre todos tratamentos	<i>Thermoactinomyces</i>	x	x	x	x
	<i>Lysinibacillus</i>	x	x	x	x
	<i>Stackebrandtia</i>	x	x	x	x
	<i>Mycolicibacterium</i>	x	x	x	x
	<i>Fluviicola</i>	x	x	x	x
	<i>Actinomadura</i>	x	x	x	x
	<i>Allochromatium</i>	x	x	x	x
	<i>Roseiflexus</i>	x	x	x	x
	<i>Ketobacter</i>	x	x	x	x
	<i>Oscillibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Roseimicrobium</i>	x	x	x	x
	<i>Blautia</i>	x	x	x	x
	<i>Ramlibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Aequoribacter</i>	x	x	x	x
	<i>Nonomuraea</i>	x	x	x	x
	<i>Pyxidicoccus</i>	x	x	x	x
	<i>Turicibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Myxococcus</i>	x	x	x	x
	<i>Kinneretia</i>	x	x	x	x
	<i>Nocardiopsis</i>	x	x	x	x
	<i>Propionibacterium</i>	x	x	x	x
	<i>Alloacidobacterium</i>	x	x	x	x
	<i>Diaphorobacter</i>	x	x	x	x
	<i>Robiginitalea</i>	x	x	x	x

<i>Marinicauda</i>	x	x	x	x
<i>Paenisporosarcina</i>	x	x	x	x
<i>Coriobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Cellulomonas</i>	x	x	x	x
<i>Microvirgula</i>	x	x	x	x
<i>Nordella</i>	x	x	x	x
<i>Xanthomonas</i>	x	x	x	x
<i>Sorangium</i>	x	x	x	x
<i>Roseomonas</i>	x	x	x	x
<i>Solibacillus</i>	x	x	x	x
<i>Pseudomonas</i>	x	x	x	x
<i>Geobacillus</i>	x	x	x	x
<i>Draconibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Koribacter</i>	x	x	x	x
<i>Lichenihabitans</i>	x	x	x	x
<i>Cytophaga</i>	x	x	x	x
<i>Pigmentiphaga</i>	x	x	x	x
<i>Enterococcus</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Nitrosocosmicus</i>	x	x	x	x
<i>Rickettsiella</i>	x	x	x	x
<i>Arachidicoccus</i>	x	x	x	x
<i>Natronosporangium</i>	x	x	x	x
<i>Halothermothrix</i>	x	x	x	x
<i>Yersinia</i>	x	x	x	x
<i>Sporomusa</i>	x	x	x	x
<i>Kaistia</i>	x	x	x	x
<i>Blastochloris</i>	x	x	x	x
<i>Gordonia</i>	x	x	x	x
<i>Chondromyces</i>	x	x	x	x
<i>Ktedonosporobacter</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Symbiobacter</i>	x	x	x	x
<i>Kaustia</i>	x	x	x	x
<i>Sutterella</i>	x	x	x	x
<i>Mycoplasma</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Ichthyocystis</i>	x	x	x	x
<i>Rickettsia</i>	x	x	x	x
<i>Luteimonas</i>	x	x	x	x
<i>Bifidobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Phototrophicus</i>	x	x	x	x
<i>Clostridioides</i>	x	x	x	x
<i>Nocardia</i>	x	x	x	x
<i>Telmatocola</i>	x	x	x	x
<i>Sphingomonas</i>	x	x	x	x
<i>Heyndrickxia</i>	x	x	x	x
<i>Actinomyces</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Amoebophilus</i>	x	x	x	x
<i>Acidihalobacter</i>	x	x	x	x
<i>Miltoncostaea</i>	x	x	x	x
<i>Terrihabitans</i>	x	x	x	x
<i>Nocardioides</i>	x	x	x	x
<i>Dechloromonas</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Nitrosacidococcus</i>	x	x	x	x

<i>Verrucomicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Neorhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Nanopelagicus</i>	x	x	x	x
<i>Tardiphaga</i>	x	x	x	x
<i>Methylocella</i>	x	x	x	x
<i>Klebsiella</i>	x	x	x	x
<i>Salaquimonas</i>	x	x	x	x
<i>Mucilaginibacter</i>	x	x	x	x
<i>Alkalihalobacillus</i>	x	x	x	x
<i>Yinghuangia</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Formimonas</i>	x	x	x	x
<i>Terricaulis</i>	x	x	x	x
<i>Pseudobacter</i>	x	x	x	x
<i>Thioclava</i>	x	x	x	x
<i>Rhizorhabdus</i>	x	x	x	x
<i>Sneathiella</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Viadribacter</i>	x	x	x	x
<i>Acidibrevibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Coxiella</i>	x	x	x	x
<i>Pedobacter</i>	x	x	x	x
<i>Burkholderia</i>	x	x	x	x
<i>Brachybacterium</i>	x	x	x	x
<i>Actinocatenispora</i>	x	x	x	x
<i>Labilithrix</i>	x	x	x	x
<i>Noviherbaspirillum</i>	x	x	x	x
<i>Filomicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Christensenella</i>	x	x	x	x
<i>Xanthobacter</i>	x	x	x	x
<i>Microvirga</i>	x	x	x	x
<i>Schaalia</i>	x	x	x	x
<i>Bacillus</i>	x	x	x	x
<i>Curtobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Massilia</i>	x	x	x	x
<i>Jiangella</i>	x	x	x	x
<i>Amycolatopsis</i>	x	x	x	x
<i>Erysipelothrix</i>	x	x	x	x
<i>Singulisphaera</i>	x	x	x	x
<i>Methylocystis</i>	x	x	x	x
<i>Sodalis</i>	x	x	x	x
<i>Nitrososphaera</i>	x	x	x	x
<i>Saccharomonospora</i>	x	x	x	x
<i>Dehalogenimonas</i>	x	x	x	x
<i>Sporosarcina</i>	x	x	x	x
<i>Nitrospira</i>	x	x	x	x
<i>Catellatospora</i>	x	x	x	x
<i>Edaphobacter</i>	x	x	x	x
<i>Rhodovastum</i>	x	x	x	x
<i>Corallococcus</i>	x	x	x	x
<i>Nitrosomonas</i>	x	x	x	x
<i>Anoxybacter</i>	x	x	x	x
<i>Cystobacter</i>	x	x	x	x
<i>Bacteroides</i>	x	x	x	x

<i>Hartmannibacter</i>	x	x	x	x
<i>Chelatococcus</i>	x	x	x	x
<i>Polymorphospora</i>	x	x	x	x
<i>Lacibacter</i>	x	x	x	x
<i>Dissulfurimicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Weizmannia</i>	x	x	x	x
<i>Sinorhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Vibrio</i>	x	x	x	x
<i>Methyloligella</i>	x	x	x	x
<i>Baekduia</i>	x	x	x	x
<i>Flaviumibacter</i>	x	x	x	x
<i>Sulfuriferula</i>	x	x	x	x
<i>Anoxybacillus</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Chromulinivorax</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus Kuenenia</i>	x	x	x	x
<i>Brevefilum</i>	x	x	x	x
<i>Caproicibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Streptococcus</i>	x	x	x	x
<i>Labrys</i>	x	x	x	x
<i>Sphingopyxis</i>	x	x	x	x
<i>Friedmanniella</i>	x	x	x	x
<i>Frankia</i>	x	x	x	x
<i>Niabella</i>	x	x	x	x
<i>Hoyosella</i>	x	x	x	x
<i>Mycobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Aurantiacibacter</i>	x	x	x	x
<i>Gemmatirosa</i>	x	x	x	x
<i>Lacrimispora</i>	x	x	x	x
<i>Streptosporangium</i>	x	x	x	x
<i>Raoultibacter</i>	x	x	x	x
<i>Rubrobacter</i>	x	x	x	x
<i>Nakamurella</i>	x	x	x	x
<i>Pikeienuella</i>	x	x	x	x
<i>Escherichia</i>	x	x	x	x
<i>Methylogaea</i>	x	x	x	x
<i>Chryseolinea</i>	x	x	x	x
<i>Citrobacter</i>	x	x	x	x
<i>Rhodomicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Actinokineospora</i>	x	x	x	x
<i>Aquihabitans</i>	x	x	x	x
<i>Bdellovibrio</i>	x	x	x	x
<i>Capnocytophaga</i>	x	x	x	x
<i>Salmonella</i>	x	x	x	x
<i>Geobacter</i>	x	x	x	x
<i>Lachnoclostridium</i>	x	x	x	x
<i>Erythrobacter</i>	x	x	x	x
<i>Sulfuriroseicoccus</i>	x	x	x	x
<i>Sedimentibacter</i>	x	x	x	x
<i>Caballeronia</i>	x	x	x	x
<i>Polycladomyces</i>	x	x	x	x
<i>Methylibium</i>	x	x	x	x
<i>Desulfuromonas</i>	x	x	x	x

<i>Rhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Aquirhabdus</i>	x	x	x	x
<i>Denitrobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Pseudopedobacter</i>	x	x	x	x
<i>Trueperella</i>	x	x	x	x
<i>Desulfurivibrio</i>	x	x	x	x
<i>Devosia</i>	x	x	x	x
<i>Ureibacillus</i>	x	x	x	x
<i>Niastella</i>	x	x	x	x
<i>Dehalococcoides</i>	x	x	x	x
<i>Stella</i>	x	x	x	x
<i>Alicyclobacillus</i>	x	x	x	x
<i>Archangium</i>	x	x	x	x
<i>Georhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Basilea</i>	x	x	x	x
<i>Anaerolinea</i>	x	x	x	x
<i>Sphaerotilus</i>	x	x	x	x
<i>Gottfriedia</i>	x	x	x	x
<i>Brevundimonas</i>	x	x	x	x
<i>Monoglobus</i>	x	x	x	x
<i>Egicoccus</i>	x	x	x	x
<i>Ralstonia</i>	x	x	x	x
<i>Iamia</i>	x	x	x	x
<i>Marmoricola</i>	x	x	x	x
<i>Ornithinimicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Calothrix</i>	x	x	x	x
<i>Sphingobium</i>	x	x	x	x
<i>Adhaeribacter</i>	x	x	x	x
<i>Brevibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Bosea_<a-proteobacteria></i>	x	x	x	x
<i>Ferrigenium</i>	x	x	x	x
<i>Granulibacter</i>	x	x	x	x
<i>Caulobacter</i>	x	x	x	x
<i>Pseudonocardia</i>	x	x	x	x
<i>Niallia</i>	x	x	x	x
<i>Humisphaera</i>	x	x	x	x
<i>Acidovorax</i>	x	x	x	x
<i>Tetrasphaera</i>	x	x	x	x
<i>Actinomarinicola</i>	x	x	x	x
<i>Aquisphaera</i>	x	x	x	x
<i>Thauera</i>	x	x	x	x
<i>Priestia</i>	x	x	x	x
<i>Beijerinckia</i>	x	x	x	x
<i>Sandaracinus</i>	x	x	x	x
<i>Shewanella</i>	x	x	x	x
<i>Pseudorhodoplanes</i>	x	x	x	x
<i>Leptolyngbya</i>	x	x	x	x
<i>Ruminococcus</i>	x	x	x	x
<i>Shinella</i>	x	x	x	x
<i>Petrimonas</i>	x	x	x	x
<i>Planctomyces</i>	x	x	x	x
<i>Paraburkholderia</i>	x	x	x	x

<i>Legionella</i>	x	x	x	x
<i>Brucella</i>	x	x	x	x
<i>Polyangium</i>	x	x	x	x
<i>Chitinolyticbacter</i>	x	x	x	x
<i>Nitratiruptor</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Hodgkinia</i>	x	x	x	x
<i>Acetivibrio</i>	x	x	x	x
<i>Afipia</i>	x	x	x	x
<i>Haematospirillum</i>	x	x	x	x
<i>Polaribacter</i>	x	x	x	x
<i>Saccharopolyspora</i>	x	x	x	x
<i>Ruminiclostridium</i>	x	x	x	x
<i>Corynebacterium</i>	x	x	x	x
<i>Vulgatibacter</i>	x	x	x	x
<i>Acidotherrmus</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Nanosynbacter</i>	x	x	x	x
<i>Microbacterium</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Sulfidibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Hippea</i>	x	x	x	x
<i>Paroceanicella</i>	x	x	x	x
<i>Anaerocolumna</i>	x	x	x	x
<i>Syntrophobacter</i>	x	x	x	x
<i>Caldichromatium</i>	x	x	x	x
<i>Agrobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Plantactinospora</i>	x	x	x	x
<i>Usitatibacter</i>	x	x	x	x
<i>Comamonas</i>	x	x	x	x
<i>Pelosinus</i>	x	x	x	x
<i>Coprococcus</i>	x	x	x	x
<i>Synechococcus</i>	x	x	x	x
<i>Bradyrhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Spirosoma</i>	x	x	x	x
<i>Mageeibacillus</i>	x	x	x	x
<i>Flavobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Novosphingobium</i>	x	x	x	x
<i>Pseudolabrys</i>	x	x	x	x
<i>Tepidimonas</i>	x	x	x	x
<i>Morganella_ <enterobacteria></i>	x	x	x	x
<i>Skermania</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Neoehrlichia</i>	x	x	x	x
<i>Mucisphaera</i>	x	x	x	x
<i>Gemmatimonas</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Phycorickettsia</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Planktophila</i>	x	x	x	x
<i>Aquicella</i>	x	x	x	x
<i>Elioraea</i>	x	x	x	x
<i>Azospira</i>	x	x	x	x
<i>Acidithiobacillus</i>	x	x	x	x
<i>Croceimicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Hirschia</i>	x	x	x	x
<i>Cloacibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Microlunatus</i>	x	x	x	x

<i>Candidatus_Proteochlamydia</i>	x	x	x	x
<i>Paraflavitalea</i>	x	x	x	x
<i>Segniliparus</i>	x	x	x	x
<i>Pelagibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Acidisarcina</i>	x	x	x	x
<i>Blattabacterium</i>	x	x	x	x
<i>Frateuria</i>	x	x	x	x
<i>Metabacillus</i>	x	x	x	x
<i>Dactylosporangium</i>	x	x	x	x
<i>Limnobacter</i>	x	x	x	x
<i>Sphaerobacter</i>	x	x	x	x
<i>Panacibacter</i>	x	x	x	x
<i>Acinetobacter</i>	x	x	x	x
<i>Thermoclostridium</i>	x	x	x	x
<i>Ferruginibacter</i>	x	x	x	x
<i>Paracoccus</i>	x	x	x	x
<i>Jatrophihabitans</i>	x	x	x	x
<i>Hathewayia</i>	x	x	x	x
<i>Thiocapsa</i>	x	x	x	x
<i>Thermobaculum</i>	x	x	x	x
<i>Ottowia</i>	x	x	x	x
<i>Symbiobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Steroidobacter</i>	x	x	x	x
<i>Niveibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Cupriavidus</i>	x	x	x	x
<i>Mycobacteroides</i>	x	x	x	x
<i>Luteitalea</i>	x	x	x	x
<i>Arthrobacter</i>	x	x	x	x
<i>Azospirillum</i>	x	x	x	x
<i>Rhodopseudomonas</i>	x	x	x	x
<i>Thermobispora</i>	x	x	x	x
<i>Leucobacter</i>	x	x	x	x
<i>Tsukamurella</i>	x	x	x	x
<i>Paenibacillus</i>	x	x	x	x
<i>Streptomyces</i>	x	x	x	x
<i>Gemmata</i>	x	x	x	x
<i>Kroppenstedtia</i>	x	x	x	x
<i>Limnoglobus</i>	x	x	x	x
<i>Anaeromyxobacter</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Xiphinematobacter</i>	x	x	x	x
<i>Azorhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Moranella</i>	x	x	x	x
<i>Bordetella</i>	x	x	x	x
<i>Paeniclostridium</i>	x	x	x	x
<i>Magnetospirillum</i>	x	x	x	x
<i>Scytonema</i>	x	x	x	x
<i>Alteracholeplasma</i>	x	x	x	x
<i>Syntrophotalea</i>	x	x	x	x
<i>Candidatus_Saccharimonas</i>	x	x	x	x
<i>Flavisolibacter</i>	x	x	x	x
<i>Syntrophothermus</i>	x	x	x	x
<i>Weissella</i>	x	x	x	x

<i>Mogibacterium</i>	x	x	x	x
<i>Phenylobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Pajaroellobacter</i>	x	x	x	x
<i>Hypericibacter</i>	x	x	x	x
<i>Hyphomicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Pediococcus</i>	x	x	x	x
<i>Paraclostridium</i>	x	x	x	x
<i>Phreatobacter</i>	x	x	x	x
<i>Thermomicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Chitinophaga</i>	x	x	x	x
<i>Apibacter</i>	x	x	x	x
<i>Micropruina</i>	x	x	x	x
<i>Haliangium</i>	x	x	x	x
<i>Hydrogenophaga</i>	x	x	x	x
<i>Parolsenella</i>	x	x	x	x
<i>Evansella</i>	x	x	x	x
<i>Micromonospora</i>	x	x	x	x
<i>Desulfomonile</i>	x	x	x	x
<i>Staphylococcus</i>	x	x	x	x
<i>Euzebya</i>	x	x	x	x
<i>Mesorhizobium</i>	x	x	x	x
<i>Pelolinea</i>	x	x	x	x
<i>Tichowtungia</i>	x	x	x	x
<i>Pseudoxanthomonas</i>	x	x	x	x
<i>Phoenicibacter</i>	x	x	x	x
<i>Bartonella</i>	x	x	x	x
<i>Actinopolymorpha</i>	x	x	x	x
<i>Duganella</i>	x	x	x	x
<i>Tumebacillus</i>	x	x	x	x
<i>Rhizobacter</i>	x	x	x	x
<i>Desulfobacula</i>	x	x	x	x
<i>Skermanella</i>	x	x	x	x
<i>Tropheryma</i>	x	x	x	x
<i>Conexibacter</i>	x	x	x	x
<i>Aeromicrobium</i>	x	x	x	x
<i>Aquaspirillum</i>	x	x	x	x
<i>Salinispora</i>	x	x	x	x
<i>Methylobacterium</i>	x	x	x	x
<i>Anaplasma</i>	x	x	x	x
<i>Thermomonospora</i>	x	x	x	x
<i>Phycococcus</i>	x	x	x	x
<i>Defluviicoccus</i>	x	x	x	x
<i>Fictibacillus</i>	x	x	x	x
<i>Melaminivora</i>	x	x	x	x
<i>Caldilinea</i>	x	x	x	x
<i>Aquisediminimonas</i>	x	x	x	x
<i>Peribacillus</i>	x	x	x	x
<i>Haliscomenobacter</i>	x	x	x	x
<i>Desulfosudis</i>	x	x	x	x
<i>Methylosinus</i>	x	x	x	x
<i>Variovorax</i>	x	x	x	x
<i>Sulfuritortus</i>	x	x	x	x

	<i>Methylomusa</i>	x	x	x	x
	<i>Liberibacter</i>	x	x	x	x
	<i>Candidatus_Reidiella</i>	x	x	x	x
	<i>Paludisphaera</i>	x	x	x	x
	<i>Granulicella</i>	x	x	x	x
	<i>Carboxydocella</i>	x	x	x	x
	<i>Xylanimonas</i>	x	x	x	x
	<i>Nitrobacter</i>	x	x	x	x
	<i>Nitrospira</i>	x	x	x	x
	<i>Cohnella</i>	x	x	x	x
	<i>Companilactobacillus</i>	x	x	x	x
	<i>Desulfovibrio</i>	x	x	x	x
	<i>Ancylobacter</i>	x	x	x	x
	<i>Alkalilimnicola</i>	x	x	-	-
	<i>Methylophilus</i>	x	x	-	-
	<i>Sediminicoccus</i>	x	x	-	-
	<i>Sulfurivermis</i>	x	x	-	-
	<i>Gelria</i>	x	x	-	-
	<i>Aromatoleum</i>	x	x	-	-
	<i>Lactococcus</i>	x	x	-	-
	<i>Methylotenera</i>	x	x	-	-
	<i>Chlamydia</i>	x	x	-	-
	<i>Halobacteroides</i>	x	x	-	-
	<i>Aerococcus</i>	x	x	-	-
	<i>Edwardsiella</i> <enterobacteria>	x	x	-	-
	<i>Rheinheimera</i>	x	x	-	-
	<i>Curvibacter</i>	x	x	-	-
	<i>Candidatus_Nitrotoga</i>	x	x	-	-
	<i>Candidatus_Fonsibacter</i>	x	x	-	-
	<i>Levilactobacillus</i>	x	x	-	-
	<i>Rhodoluna</i>	x	x	-	-
	<i>Oxynema</i>	x	x	-	-
	<i>Laceyella</i>	x	x	-	-
	<i>Limnohabitans</i>	x	x	-	-
	<i>Gracilibacillus</i>	x	x	-	-
	<i>Fluviibacter</i>	x	x	-	-
	<i>Fuscovulum</i>	x	x	-	-
	<i>Polynucleobacter</i>	x	x	-	-
	<i>Sulfuritalea</i>	x	x	-	-
	<i>Janibacter</i>	-	-	x	x
	<i>Hankyongella</i>	-	-	x	x
	<i>Actinotignum</i>	-	-	x	x
	<i>Cereibacter</i>	-	-	x	x
	<i>Heliomicrobium</i>	-	-	x	x
	<i>Citricoccus</i>	-	-	x	x
	<i>Aquibium</i>	-	-	x	x
	<i>Slackia</i>	-	-	x	x
	<i>Staphylospora</i>	-	-	x	x
	<i>Fructilactobacillus</i>	-	-	x	x
	<i>Sinomonas</i>	-	-	x	x
	<i>Trichlorobacter</i>	-	-	x	x
	<i>Leeuwenhoekiella</i>	-	-	x	x
Gêneros compartilhados entres os tratamentos LTA + In I (Inicial) e LTA + In I (Final)					
Gêneros compartilhados entres os tratamentos LE + In I (Inicial) e LE + In I (Inicial)					

<i>Cardiobacterium</i>	-	-	X	X
<i>Thiolapillus</i>	-	-	X	X
<i>Ezakiella</i>	-	-	X	X
<i>Arcticibacterium</i>	-	-	X	X
<i>Megasphaera</i>	-	-	X	X
<i>Changpingibacter</i>	-	-	X	X
<i>Desulfohalobium</i>	-	-	X	X
<i>Methanosarcina</i>	-	-	X	X
<i>Lapidilactobacillus</i>	-	-	X	X
<i>Lachnospira</i>	-	-	X	X
<i>Enterocloster</i>	-	-	X	X
<i>Candidatus_Rhabdochlamydia</i>	-	-	X	X
<i>Thermodesulfobium</i>	-	-	X	X
<i>Ruegeria</i>	-	-	X	X
<i>Anatolimnocola</i>	-	-	X	X
<i>Isosphaera</i>	-	-	X	X
<i>Thiomicrothrix</i>	-	-	X	X
<i>Serpentinicella</i>	-	-	X	X
<i>Gimesia</i>	-	-	X	X
<i>Fimbriimonas</i>	-	-	X	X
<i>Brochothrix</i>	-	-	X	X
<i>Tenuifilum</i>	-	-	X	X
<i>Oceanisphaera</i>	-	-	X	X
<i>Aurantimonas</i>	-	-	X	X
<i>Fulvivirga</i>	-	-	X	X
<i>Melioribacter</i>	-	-	X	X
<i>Methanobrevibacter</i>	-	-	X	X
<i>Pulveribacter</i>	-	-	X	X
<i>Tistrella</i>	-	-	X	X
<i>Mycoavidus</i>	-	-	X	X
<i>Thalassospira</i>	-	-	X	X
<i>Lacipirellula</i>	-	-	X	X
<i>Pontimonas</i>	-	-	X	X
<i>Desulfomicrobium</i>	-	-	X	X
<i>Sodaliphilus</i>	-	-	X	X
<i>Acutalibacter</i>	-	-	X	X
<i>Neisseria</i>	-	-	X	X
<i>Aeribacillus</i>	-	-	X	X
<i>Thermochromatium</i>	-	-	X	X
<i>Serinicoccus</i>	-	-	X	X
<i>Sediminicola</i>	-	-	X	X
<i>Wenzhouxiangella</i>	-	-	X	X
<i>Thermoanaerobacter</i>	-	-	X	X
<i>Sphingobacterium</i>	-	-	X	X
<i>Thermanaeromonas</i>	-	-	X	X
<i>Brevilactibacter</i>	-	-	X	X
<i>Guyarkeria</i>	X	-	-	-
<i>Mycoplasmopsis</i>	X	-	-	-
<i>Methylobacillus</i>	X	-	-	-
<i>Zhouia</i>	X	-	-	-
<i>Paucilactobacillus</i>	X	-	-	-
<i>Pannonibacter</i>	X	-	-	-

Gêneros exclusivos do
tratamento LTA+ In I
(Inicial)

<i>Jeotgalicoccus</i>	x	-	-	-
<i>Pasteurella</i>	x	-	-	-
<i>Opitutus</i>	x	-	-	-
<i>Galbibacter</i>	x	-	-	-
<i>Zophobihabitans</i>	x	-	-	-
<i>Croceibacter</i>	x	-	-	-
<i>Anaerotignum</i>	x	-	-	-
<i>Paracholeplasma</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Nesciobacter</i>	x	-	-	-
<i>Thermaerobacter</i>	x	-	-	-
<i>Marinomonas</i>	x	-	-	-
<i>Chlorobium</i>	x	-	-	-
<i>Parasphingopyxis</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Nitrosotalea</i>	x	-	-	-
<i>Tissierella</i>	x	-	-	-
<i>Pyramidobacter</i>	x	-	-	-
<i>Ferrovibrio</i>	x	-	-	-
<i>Alkalibacter</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Nitrosocaldus</i>	x	-	-	-
<i>Methylovorus</i>	x	-	-	-
<i>Zhaonella</i>	x	-	-	-
<i>Leptospira</i>	x	-	-	-
<i>Leuconostoc</i>	x	-	-	-
<i>Aliarcobacter</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Syntrophocurvum</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Cytomitobacter</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Ruthia</i>	x	-	-	-
<i>Lederbergia</i>	x	-	-	-
<i>Planktothrix</i>	x	-	-	-
<i>Cryptobacterium</i>	x	-	-	-
<i>Pseudothermotoga</i>	x	-	-	-
<i>Caldanaerobacter</i>	x	-	-	-
<i>Koinonema</i>	x	-	-	-
<i>Candidatus_Annandia</i>	x	-	-	-
<i>Oscillatoria</i>	x	-	-	-
<i>Anabaena</i>	x	-	-	-
<i>Sediminispirochaeta</i>	x	-	-	-
<i>Leptothrix_proteobacteria</i>	x	-	-	-
<i>Methanocella</i>	x	-	-	-
<i>Gracilinema</i>	x	-	-	-
<i>Delftia</i>	x	-	-	-
<i>Ferribacterium</i>	x	-	-	-
<i>Denitratisoma</i>	-	x	-	-
<i>Elizabethkingia</i>	-	x	-	-
<i>Mammaliicoccus</i>	-	x	-	-
<i>Xenorhabdus</i>	-	x	-	-
<i>Mixta</i>	-	x	-	-
<i>Thermobacillus</i>	-	x	-	-
<i>Cnuibacter</i>	-	x	-	-
<i>Taylorella</i>	-	x	-	-
<i>Hydrogenimonas</i>	-	x	-	-
<i>Thermus</i>	-	x	-	-

Gêneros exclusivos do
tratamento LTA+ In I
(Final)

	<i>Desulforapulum</i>	-	x	-	-
	<i>Aquimarina</i>	-	x	-	-
	<i>Rathayibacter</i>	-	x	-	-
	<i>Babesia</i>	-	x	-	-
	<i>Desulfurispirillum</i>	-	x	-	-
	<i>Candidatus_Deianiraea</i>	-	x	-	-
	<i>Rubinisphaera</i>	-	x	-	-
	<i>Ectothiorhodosinus</i>	-	x	-	-
	<i>Halomonas</i>	-	x	-	-
	<i>Rhodophyticola</i>	-	x	-	-
	<i>Oricola</i>	-	x	-	-
	<i>Asticcacaulis</i>	-	x	-	-
	<i>Thermotoga</i>	-	x	-	-
	<i>Devriesea</i>	-	x	-	-
	<i>Coraliomargarita</i>	-	x	-	-
	<i>Paralysiella</i>	-	x	-	-
	<i>Neomicrococcus</i>	-	x	-	-
	<i>Hoeflea</i>	-	x	-	-
	<i>Anaerobutyricum</i>	-	x	-	-
	<i>Lawsonella</i>	-	x	-	-
	<i>Halalkalibacterium</i>	-	x	-	-
	<i>Caenibius</i>	-	x	-	-
	<i>Mesomycoplasma</i>	-	x	-	-
	<i>Pseudohongiella</i>	-	x	-	-
	<i>Moritella</i>	-	x	-	-
	<i>Nitrosophilus</i>	-	x	-	-
	<i>Mesoflavibacter</i>	-	x	-	-
	<i>Anaerohalosphaera</i>	-	x	-	-
	<i>Luteipulveratus</i>	-	x	-	-
	<i>Isoptricola</i>	-	x	-	-
	<i>Roseococcus</i>	-	x	-	-
	<i>Caldalkalibacillus</i>	-	x	-	-
	<i>Larkinella</i>	-	x	-	-
	<i>Sulfitobacter</i>	-	x	-	-
	<i>Beggiatoa</i>	-	x	-	-
	<i>Methylophaga</i>	-	x	-	-
	<i>Actinobaculum</i>	-	x	-	-
	<i>Pontibacillus</i>	-	x	-	-
	<i>Bioaibacter</i>	-	-	x	-
	<i>Candidatus_Methylospira</i>	-	-	x	-
	<i>Oceanidesulfovibrio</i>	-	-	x	-
	<i>Chromobacterium</i>	-	-	x	-
	<i>Methylomicrobium</i>	-	-	x	-
	<i>Dialister</i>	-	-	x	-
	<i>Entomobacter</i>	-	-	x	-
	<i>Desulfarculus</i>	-	-	x	-
	<i>Candidatus_Contubernalis</i>	-	-	x	-
	<i>Moorena</i>	-	-	x	-
	<i>Ammonifex</i>	-	-	x	-
	<i>Gudongella</i>	-	-	x	-
	<i>Sulfuricurvum</i>	-	-	x	-
	<i>Faecalibacterium</i>	-	-	x	-
Gêneros exclusivos do tratamento LE+ In I (Inicial)					

<i>Mobiluncus</i>	-	-	X	-
<i>Loigolactobacillus</i>	-	-	X	-
<i>Simiaoa</i>	-	-	X	-
<i>Methylovulum</i>	-	-	X	-
<i>Psychromonas</i>	-	-	X	-
<i>Aminobacterium</i>	-	-	X	-
<i>Dehalobacterium</i>	-	-	X	-
<i>Rhodovulum</i>	-	-	X	-
<i>Tannerella</i>	-	-	X	-
<i>Lignipirellula</i>	-	-	X	-
<i>Rugosibacter</i>	-	-	X	-
<i>Desulfocapsa</i>	-	-	X	-
<i>Caldisericum</i>	-	-	X	-
<i>Nitrosococcus</i>	-	-	X	-
<i>Methylococcus</i>	-	-	X	-
<i>Immundisolibacter</i>	-	-	X	-
<i>Candidatus_Arthromitus</i>	-	-	X	-
<i>Candidatus_Methylopumilus</i>	-	-	X	-
<i>Flintibacter</i>	-	-	X	-
<i>Simidua</i>	-	-	X	-
<i>Methanothrix</i>	-	-	X	-
<i>Casimicrobium</i>	-	-	X	-
<i>Methanosphaerula</i>	-	-	X	-
<i>Tepidibacter</i>	-	-	X	-
<i>Marixanthomonas</i>	-	-	X	-
<i>Gottschalkia</i>	-	-	X	-
<i>Desulfoscipio</i>	-	-	X	-
<i>Effusibacillus</i>	-	-	X	-
<i>Candidatus_Cloacimonas</i>	-	-	X	-
<i>Coprothermobacter</i>	-	-	X	-
<i>Muricauda</i>	-	-	X	-
<i>Caldithrix</i>	-	-	X	-
<i>Qingshengfaniella</i>	-	-	X	-
<i>Candidatus_Desulfofervidus</i>	-	-	X	-
<i>Salisediminibacterium</i>	-	-	X	-
<i>Turneriella</i>	-	-	X	-
<i>Thiohalobacter</i>	-	-	X	-
<i>Orientia</i>	-	-	X	-
<i>Eikenella</i>	-	-	X	-
<i>Thiocystis</i>	-	-	X	-
<i>Octadecabacter</i>	-	-	X	-
<i>Lautropia</i>	-	-	X	-
<i>Apilactobacillus</i>	-	-	X	-
<i>Kiritimatiella</i>	-	-	X	-
<i>Ciceribacter</i>	-	-	X	-
<i>Fervidobacterium</i>	-	-	X	-
<i>Methylacidiphilum</i>	-	-	X	-
<i>Hahella</i>	-	-	X	-
<i>Candidatus_Endolissoclinum</i>	-	-	X	-
<i>Mycolicibacillus</i>	-	-	X	-
<i>Limosilactobacillus</i>	-	-	X	-
<i>Saliniradius</i>	-	-	X	-

	<i>Keratinibaculum</i>	-	-	X	-
	<i>Microcystis</i>	-	-	X	-
	<i>Halothiobacillus</i>	-	-	X	-
	<i>Aquisalinus</i>	-	-	X	-
	<i>Sulfuricella</i>	-	-	X	-
	<i>Amniculibacterium</i>	-	-	X	-
	<i>Egibacter</i>	-	-	X	-
	<i>Yangia</i>	-	-	X	-
	<i>Allobranchiibius</i>	-	-	X	-
	<i>Akkermansia</i>	-	-	X	-
	<i>Candidatus_Sneabacter</i>	-	-	X	-
	<i>Dichelobacter</i>	-	-	X	-
	<i>Neorickettsia</i>	-	-	X	-
	<i>Methylomagnum</i>	-	-	X	-
	<i>Chloroherpeton</i>	-	-	X	-
	<i>Candidatus_Fokinia</i>	-	-	X	-
	<i>Candidatus_Endoriftia</i>	-	-	X	-
	<i>Terasakiella</i>	-	-	X	-
	<i>Mesoplasma</i>	-	-	X	-
	<i>Woeseia</i>	-	-	X	-
	<i>Fibrobacter</i>	-	-	X	-
	<i>Arachnia</i>	-	-	X	-
	<i>Thermophilibacter</i>	-	-	X	-
	<i>Thiopseudomonas</i>	-	-	X	-
	<i>Sellimonas</i>	-	-	X	-
	<i>Halorhodospira</i>	-	-	X	-
	<i>Streptomonospora</i>	-	-	X	-
	<i>Stanieria</i>	-	-	X	-
	<i>Pseudosulfitobacter</i>	-	-	X	-
	<i>Occultella</i>	-	-	X	-
	<i>Austwickia</i>	-	-	-	X
	<i>Paralcaligenes</i>	-	-	-	X
	<i>Maricaulis</i>	-	-	-	X
	<i>Faecalicatena</i>	-	-	-	X
	<i>Rothia_<high_G+C_Gram-positive_bacteria></i>	-	-	-	X
	<i>Desulfomarina</i>	-	-	-	X
	<i>Winogradskyella</i>	-	-	-	X
	<i>Candidatus_Gullanella</i>	-	-	-	X
	<i>Aerosticca</i>	-	-	-	X
	<i>Urechidicola</i>	-	-	-	X
	<i>Antarcticibacterium</i>	-	-	-	X
	<i>Muriicola</i>	-	-	-	X
	<i>Mycetohabitans</i>	-	-	-	X
	<i>Halopseudomonas</i>	-	-	-	X
	<i>Candidatus_Desulforudis</i>	-	-	-	X
	<i>Pseudovibrio</i>	-	-	-	X
	<i>Limnospira</i>	-	-	-	X
	<i>Leclercia</i>	-	-	-	X
	<i>Peptoniphilus</i>	-	-	-	X
	<i>Castellaniella</i>	-	-	-	X
	<i>Actinoalloteichus</i>	-	-	-	X

Gêneros exclusivos do
tratamento LE+ In I (Final)

<i>Sterolibacterium</i>	-	-	-	X
<i>Raoultella</i>	-	-	-	X
<i>Paeniglutamicibacter</i>	-	-	-	X
<i>Barnesiella</i>	-	-	-	X
<i>Desulfoluna</i>	-	-	-	X
<i>Glaciimonas</i>	-	-	-	X
<i>Fusobacterium</i>	-	-	-	X
<i>Pukyongiella</i>	-	-	-	X
<i>Sedimentisphaera</i>	-	-	-	X
<i>Pelistega</i>	-	-	-	X
<i>Qiania</i>	-	-	-	X
<i>Parasphingorhabdus</i>	-	-	-	X
<i>Lelliottia</i>	-	-	-	X
<i>Shigella</i>	-	-	-	X
<i>Candidatus_Uabimicrobium</i>	-	-	-	X
<i>Lentzea</i>	-	-	-	X
<i>Wigglesworthia</i>	-	-	-	X
<i>Listeria</i>	-	-	-	X
<i>Hydrogenibacillus</i>	-	-	-	X
<i>Glutamicibacter</i>	-	-	-	X
<i>Salimicrobium</i>	-	-	-	X
<i>Lacunisphaera</i>	-	-	-	X
<i>Pontibrevibacter</i>	-	-	-	X
<i>Teredinibacter</i>	-	-	-	X
<i>Yokenella</i>	-	-	-	X
<i>Candidatus_Profftia</i>	-	-	-	X
<i>Congregibacter</i>	-	-	-	X
<i>Photorhabdus</i>	-	-	-	X
<i>Ehrlichia</i>	-	-	-	X
<i>Phascolarctobacterium</i>	-	-	-	X
<i>Leisingera</i>	-	-	-	X
<i>Kaistella</i>	-	-	-	X
<i>Acidaminococcus</i>	-	-	-	X
<i>Commensalibacter</i>	-	-	-	X
<i>Iocasia</i>	-	-	-	X
<i>Alcaligenes</i>	-	-	-	X
<i>Butyricimonas</i>	-	-	-	X
<i>Methanomethylovorans</i>	-	-	-	X
<i>Thermoleptolyngbya</i>	-	-	-	X
<i>Thalassolituus</i>	-	-	-	X
<i>Haemophilus</i>	-	-	-	X
<i>Seonamhaeicola</i>	-	-	-	X
<i>Lactiplantibacillus</i>	-	-	-	X
<i>Geodermatophilus</i>	-	-	-	X
<i>Phyllobacterium</i>	-	-	-	X
<i>Fuerstiella</i>	-	-	-	X
<i>Salinivirga</i>	-	-	-	X
<i>Paraprevotella</i>	-	-	-	X
<i>Phocaeicola</i>	-	-	-	X
<i>Actibacterium</i>	-	-	-	X
<i>Berryella</i>	-	-	-	X
<i>Propioniciclava</i>	-	-	-	X

<i>Salicibacter</i>	-	-	-	X
<i>Cylindrospermopsis</i>	-	-	-	X
<i>Limihaloglobus</i>	-	-	-	X
<i>Candidatus_Kinetoplastibacterium</i>	-	-	-	X
<i>Magnetococcus</i>	-	-	-	X
<i>Sulfurimonas</i>	-	-	-	X
<i>Aureibaculum</i>	-	-	-	X
<i>Vitreoscilla</i>	-	-	-	X
<i>Providencia</i>	-	-	-	X
<i>Luteithermobacter</i>	-	-	-	X
<i>Bythopirellula</i>	-	-	-	X

Tabela Suplementar 4: Gêneros de fungos compartilhados e exclusivos entre os tratamentos LTA + In I e LE + In I em sua fase inicial e final na biodegradação, onde o (X) representa os número de organismos encontrados nas amostras e o (-) organismos ausentes nas amostras.

Gêneros Compartilhados e exclusivos	Gêneros	Tratamento LTA + In I		Tratamento LE + In I	
		Antes	Depois	Antes	Depois
Fungos compartilhados em todos os tratamentos	<i>Pochonia</i>	X	X	X	X
	<i>Zygosaccharomyces</i>	X	X	X	X
	<i>Thermothelomyces</i>	X	X	X	X
	<i>Marasmius</i>	X	X	X	X
	<i>Colletotrichum</i>	X	X	X	X
	<i>Purpureocillium</i>	X	X	X	X
	<i>Pichia</i>	X	X	X	X
	<i>Eremothecium</i>	X	X	X	X
	<i>Cryptococcus</i>	X	X	X	X
	<i>Saccharomycodes</i>	X	X	X	X
	<i>Pyricularia</i>	X	X	X	X
	<i>Candida</i>	X	X	X	X
	<i>Sugiyamaella</i>	X	X	X	X
	<i>Penicillium</i>	X	X	X	X
	<i>Rhizoctonia</i>	X	X	X	X
	<i>Nakaseomyces</i>	X	X	X	X
	<i>Tetrapisispora</i>	X	X	X	X
<i>Fusarium</i>	X	X	X	X	
<i>Aspergillus</i>	X	X	X	X	
Fungos compartilhados entre os tratamentos LTA + In (Inicial e final)	<i>Psilocybe</i>	X	X	-	-
	<i>Schizosaccharomyces Ogataea</i>	X	X	-	-
Fungos compartilhados entre os tratamentos LE + In (Inicial e final)	<i>Clostridium</i>	-	-	X	X
Fungo exclusivo de LTA+ In I (Inicial)	<i>Thermothielavioides</i>	X	-	-	-
Fungo exclusivo de LTA+ In I (final)	<i>Drechmeria</i>	-	X	-	-
Fungo exclusivo de LE+ In I (Inicial)	<i>Brettanomyces</i>	-	-	X	-
	<i>Naumovozyma</i>	-	-	X	-
Fungo exclusivo de LE+ In I (final)	<i>Puccinia</i>	-	-	-	X
	<i>Ustilaginoidea</i>	-	-	-	X
	<i>Torulaspora</i>	-	-	-	X