

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
E MONITORAMENTO AMBIENTAL

Letícia Portugal do Nascimento

**ATIVIDADE BIOFLOCULANTE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PAINÉIS
FOTOVOLTAICOS E APLICAÇÃO NO CONDICIONAMENTO DO LODO DE
ESGOTO**

Sorocaba – SP

2023

LETÍCIA PORTUGAL DO NASCIMENTO

**ATIVIDADE BIOFLOCULANTE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PAINÉIS
FOTOVOLTAICOS E APLICAÇÃO NO CONDICIONAMENTO DO LODO DE
ESGOTO**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda Cristina
Silveira Duarte

Sorocaba

2023

Portugal do Nascimento, Letícia

Atividade biofloculante de bactérias isoladas de painéis fotovoltaicos e aplicação no condicionamento do lodo de esgoto / Letícia Portugal do Nascimento -- 2023.
80f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte
Banca Examinadora: Iolanda Cristina Silveira Duarte,
Cleoni dos Santos Carvalho, Karina Querne de Carvalho
Passig
Bibliografia

1. Biofloculantes. 2. Tratamento de esgoto sanitário. 3. Bactérias extremófilas. I. Portugal do Nascimento, Letícia. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

AGRADECIMENTOS

À professora Iolanda Cristina Silveira Duarte pela orientação, paciência, ensinamentos e otimismo inabalável;

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo que permitiu a realização desta pesquisa;

Às professoras Karina Querne de Carvalho e Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa pelas contribuições acerca deste trabalho;

À equipe do Laboratório de Biomarcadores (LaBioM) da UFSCar Sorocaba pela ajuda com as análises de proteínas;

À equipe do Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) da UNESP Sorocaba pelo auxílio com as análises de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);

À técnica Izabel Carolina Vargas, do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) da UFSCar – So, por todo o suporte ao longo desta pesquisa;

À Mariana Amaral Azevedo pela amizade e aprendizados compartilhados;

À professora Luísa Helena dos Santos Oliveira, que me incentivou antes mesmo de eu acreditar ser possível;

À Isadora Barbieri Stuchi por ter me ajudado a concluir esta jornada;

Aos amigos Caio, Luís e Rayane por serem o meu lugar para onde voltar;

Ao meu pai, pelo companheirismo e confiança depositados em mim;

À Natália Magalhães Trajano, pois sem você eu não teria chegado tão longe;

Meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

O desaguamento do lodo de esgoto é importante etapa do tratamento de efluentes, mas é dificultada devido à presença de partículas suspensas no meio e pela retenção de água em substâncias poliméricas extracelulares. O uso de aditivos durante o condicionamento do lodo é estratégia utilizada para promover a desestabilização e agregação das partículas, favorecendo a remoção do excesso de água. Biofloculantes sintetizados por bactérias podem ser alternativas aos aditivos comerciais por serem biodegradáveis e não-tóxicos. O presente estudo teve como objetivo analisar o potencial das bactérias *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila*, *Kocuria* sp. e *Psychrobacter* sp., previamente isoladas de painéis fotovoltaicos, na produção de biofloculantes. As quatro espécies bacterianas avaliadas apresentaram atividade floculante quando aplicadas à suspensão caulim, mas a espécie *Psychrobacter* sp. foi selecionada para testes mais detalhados devido ao elevado desempenho do biofloculante, com baixas variações ao longo do tempo. A molécula produzida pela *Psychrobacter* sp. foi caracterizada quanto ao conteúdo de polissacarídeos (24,64%), lipídios (18,10%) e proteínas (10,23%). A análise de grupos funcionais evidenciou a presença de aminas, hidroxilas e carboxilas, aos quais foram atribuídos a capacidade floculante da molécula. O biofloculantes se mostrou efetivo no condicionamento de amostras de lodo de esgoto aeróbio, proveniente de tanque de aeração, e de lodo de esgoto anaeróbio, proveniente de reator de fluxo ascendente. As eficiências de floculação atingidas foram de 92,96% no lodo aeróbio e 71,53% no lodo anaeróbio. O biofloculante também apresentou desempenho similar ao de polímero catiônico utilizado comercialmente no tratamento de lodo de esgoto. Dessa forma, a macromolécula pode ser uma alternativa aos aditivos sintéticos e inorgânicos aplicados no tratamento de efluentes, porém estudos econômicos e fontes alternativas de substrato precisam ser determinadas.

Palavras-chave: Biofloculantes. Tratamento de esgoto sanitário. Bactérias extremófilas.

ABSTRACT

The dewatering process of sewage sludge is a fundamental part of wastewater treatment. However, it is negatively affected due to the amount of suspended solid particles and water content retained by extracellular polymeric substances. The usage of additives during sewage sludge conditioning is an approach to promote the destabilization of the colloidal system and the aggregation of particles, enhancing water removal. Biofloculants synthesized by bacteria may be a promising substitute for commercial flocculants because of their non-toxicity and biodegradability. This current research investigated the production of biosurfactants by *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila*, *Kocuria* sp., and *Psychrobacter* sp., previously isolated from solar panels, and their flocculant activity when applied to sewage sludge conditioning process. Since extremophiles are evolutionarily adapted to survive under harsh conditions, they may be a valuable source of biotechnological relevant byproducts such as biofloculants. All bacteria assessed in the current work presented flocculant ability when applied to kaolin suspension, but *Psychrobacter* sp. was selected for further analysis because of its high stability and efficiency. The biofloculant was characterized as being mainly composed of sugars (24.64%), lipids (18.10%), and proteins (10.23%). The FTIR spectrum revealed the presence of amine, hydroxyl, and carboxyl functional groups, which are responsible for the flocculant properties of the molecule. The biofloculant was applied in the conditioning process of aerobic sludge samples, collected from an aeration tank, and anaerobic sludge samples, collected from an Upflow Anaerobic Sludge Blanket, reaching 92.96% and 71.53% of flocculation efficiency, respectively. Furthermore, the biofloculant was as effective as a commercial cationic polymer commonly used during wastewater treatment. Hence, this molecule may be a promising substitute for commercial additives in wastewater treatment. However, further economic analyses are needed, especially regarding alternative carbon sources.

Keywords: Biofloculants. Wastewater treatment. Extremophiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Camadas de substâncias poliméricas extracelulares ao redor de partícula no lodo....	17
Figura 2 – Tipos de coagulantes e floculantes utilizados no tratamento de esgoto.....	21
Figura 3 – Fluxograma simplificado do percurso experimental adotado.....	31
Figura 4 – Comparativo de atividade floculante de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Serratia nematodiphila</i> , <i>Kocuria</i> sp. e <i>Psychrobacter</i> sp. em função do tempo de incubação.....	39
Figura 5 – Comparativo de atividades floculantes de <i>Psychrobacter</i> sp. em função dos diferentes tratamentos adotados.....	42
Figura 6 – Gráfico de Pareto sobre os efeitos do pH inicial do meio, da temperatura de incubação e do tamanho do inóculo sobre resposta de atividade floculante do biofloculante sintetizado por <i>Psychrobacter</i> sp.....	43
Figura 7 – Resultados dos experimentos definidos no Delineamento Composto Central Rotacional: gráfico de superfície de resposta e gráfico de condições de contorno.....	44
Figura 8 – Gráficos de otimização de resposta para pH inicial do meio, temperatura de incubação e tamanho do inóculo.....	45
Figura 9 – Biofloculante sintetizado por <i>Psychrobacter</i> sp. a partir das condições otimizadas de cultivo.....	46
Figura 10 – Análise química do biofloculante sintetizado por <i>Psychrobacter</i> sp.....	49
Figura 11 – Imagem do biofloculante sintetizado por <i>Psychrobacter</i> sp. obtida a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50
Figura 12 – Espectro infravermelho do biofloculante sintetizado por <i>Psychrobacter</i> sp.....	51
Figura 13 – Comparativo de sólidos sedimentáveis em amostra de lodo anaeróbio e lodo aeróbio.....	53
Figura 14 – Sólidos retidos de lodo aeróbio e lodo anaeróbio após testes de desaguamento em Funil de Büchner.....	54
Figura 15 – Ensaio de floculação e comparativo de biofloculante e coagulante comercial na formação de flocos no lodo de esgoto.....	58
Figura 16 – Formação de agregados de partículas quando da aplicação do biofloculante em suspensão caulim.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quadro de ensaios determinados a partir de Delineamento Composto Central Rotacional: valores codificados e decodificados.....	34
Tabela 2 – Validação das condições de otimização: resultados de atividades flocculantes utilizando diferentes concentrações do bioflocculante.....	46
Tabela 3 – Caracterização química do bioflocculante produzido por <i>Psychrobacter</i> sp. dado em miligramas da fração caracterizada por grama de bioflocculante.....	48
Tabela 4 – Caracterização inicial de amostras de lodo aeróbio e lodo anaeróbio.....	52
Tabela 5 – Comparativo de atividade flocculante em lodo aeróbio e lodo anaeróbio utilizando flocculante comercial (CPAM), bioflocculante e bioflocculante com CaCl ₂	56
Tabela 6 – Eficiência de flocculantes e coagulantes comerciais na redução da turbidez de diferentes tipos de amostras.....	57
Tabela 7 – Microrganismos produtores de bioflocculantes e eficiência quanto a redução da turbidez quando aplicados ao tratamento de diferentes efluentes.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1	Lodo de esgoto: características e os desafios sobre os sistemas de tratamento de efluentes.....	15
3.2	Processos de coagulação e floculação no condicionamento do lodo de esgoto.....	19
3.3	Biofloculantes: síntese e aplicações.....	22
3.4	Isolamento de microrganismos de interesse biotecnológico.....	24
3.4.1	Influência das condições de cultivo sobre a síntese de biofloculantes.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Isolamento e identificação de microrganismos.....	31
4.2	Condições de cultivo e preparo do inóculo.....	32
4.3	Determinação da atividade floculante.....	33
4.4	Influência das condições de cultivo sobre a atividade floculante.....	33
4.5	Validação das condições de otimização	35
4.6	Extração e rendimento do biofloculante.....	35
4.7	Caracterização do biofloculante.....	35
4.8	Análises no lodo de esgoto.....	36
4.8.1	Coleta e caracterização do lodo de esgoto.....	36
4.8.2	Ensaio de floculação no lodo de esgoto.....	37
4.9	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Determinação da atividade floculante.....	39
5.2	Relação entre condições de cultivo e a atividade Floculante.....	41
5.3	Validação das condições de otimização.....	45
5.4	Caracterização do biofloculante.....	47
5.5	Ensaio no lodo de esgoto.....	52
5.5.1	Caracterização do lodo de esgoto.....	52
5.5.2	Ensaio de floculação no lodo de esgoto.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	Apêndice A.....	78
	Apêndice B.....	79
	Apêndice C.....	80
	Apêndice D.....	81

1 INTRODUÇÃO

Parte do conjunto de serviços, infraestruturas e instalações operacionais que compreendem o saneamento básico, o tratamento de efluentes tem como objetivo a transformação das fases líquida e sólida dos esgotos, de forma que seus parâmetros físico-químicos estejam adequados, conforme previsto na legislação, para possibilitar seu aproveitamento ou disposição final sem causar impactos nocivos ao ambiente (GHERNAOUT *et al.*, 2019). A gestão do lodo de esgotos, resíduo do tratamento de efluentes e cuja geração tende a aumentar de acordo com os processos de urbanização e crescimento populacional (ZHANG *et al.*, 2022), caracteriza-se como desafio global, podendo atingir mais de 50% de todos os custos operacionais de uma Estação de Tratamento de Esgotos (APPELS *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2019).

Ainda que a origem da água residuária tenha influência sobre as propriedades do lodo, este resíduo pode ser compreendido como uma mistura de água, matéria orgânica, microrganismos e contaminantes inorgânicos e orgânicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais potencialmente tóxicos (KACPRZAK *et al.*, 2017). O volume, conteúdo de água e presença de contaminantes no lodo são os principais obstáculos acerca do seu manejo, já que aumentam os custos de transporte e restringem as possibilidades de destinação (ANJUM *et al.*, 2016; GHERGHEL *et al.*, 2019; GENG *et al.*, 2020). Dessa forma, a remoção de água é etapa essencial para redução de custos relacionados ao gerenciamento do lodo, ampliando as possibilidades de aproveitamento do resíduo tratado e diminuindo os riscos potenciais quanto a sua disposição final (WONG *et al.*, 2016).

O desaguamento mecânico do lodo é um dos métodos mais adotados para viabilizar a remoção do conteúdo de água no resíduo, mas apresenta limitações, pois pode resultar em lodo com até 80% de umidade (KURADE *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2018). A fim de aumentar a eficiência do desaguamento, o resíduo pode ser submetido à etapa prévia de condicionamento, que visa a alteração de suas propriedades físico-químicas, favorecendo a remoção de água. Os processos de coagulação e floculação se destacam entre os diferentes métodos de condicionamento e consistem no uso de aditivos que atuam na desestabilização e aglutinação de partículas finas e coloidais em flocos, facilitando a separação entre os sólidos suspensos e a água (MOWLA *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2018).

Comercialmente, o uso de coagulantes e floculantes sintéticos ou inorgânicos no tratamento de efluentes é prática comum devido à sua eficiência, disponibilidade e baixo custo (SURESH *et al.*, 2018). Contudo, a aplicação destes compostos não está livre de impactos

ambientais e à saúde, dado que podem se caracterizar como fontes de poluição secundária (BEZAWADA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2016) e estão associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (EXLEY, 2017; MIRZA *et al.*, 2017). Em razão dos riscos potenciais do emprego destes aditivos e da crescente busca por alternativas de baixo impacto ambiental, os biofloculantes têm ganhado destaque como possíveis alternativas (MU *et al.*, 2019).

Biofloculantes são um dos diferentes metabólitos sintetizados por microrganismos em razão de vantagens adaptativas adquiridas por esses indivíduos (PANDE e KOST, 2017; FOUILLAUD e DUFOSSÉ, 2022). Além de estar associada a aspectos genéticos, a produção dessas macromoléculas também é condicionada pelas condições ambientais. Dessa forma, estas macromoléculas desempenham funções fundamentais na garantia da sobrevivência dos organismos, auxiliando por exemplo, na comunicação celular, proteção contra substâncias nocivas presentes no meio e favorecendo a obtenção de nutrientes (SANTOS *et al.*, 2018).

Devido ao seu caráter não tóxico e biodegradável, os biofloculantes se tornaram macromoléculas de grande interesse biotecnológico e seu uso passou a ser investigado visando a aplicação tanto no tratamento de água, quanto no de efluentes gerados a partir de diferentes atividades. A busca por artigos científicos utilizando o termo “*Biofloculant*” na base de dados *Scopus*, por exemplo, evidencia a evolução na produção científica acerca do tema nas últimas décadas (Apêndice A). Nesse sentido, o primeiro artigo científico sobre o tema foi publicado em 1984, mas foi só a partir da década de 90 que a produção científica sobre biofloculantes passou a ser mais expressiva, com uma média de 3,2 artigos publicados por ano. A partir de 2010, é observado um aumento no número de publicações, atingindo um pico de 57 artigos em 2015. De 2020 até 2022, foram encontrados 137 artigos com foco nestas biomoléculas.

Apesar do aumento das publicações acerca dos biofloculantes, os elevados custos de produção dificultam sua ampla utilização e competitividades frente aos aditivos comerciais (SALEEM e BACHMANN *et al.*, 2018; KURNIAWAN *et al.*, 2022). Esse aspecto impulsiona a busca pela otimização de parâmetros operacionais do cultivo de microrganismos e por indivíduos capazes de secretar macromoléculas mais eficientes a partir de substratos de baixo custo (DRAKONTIS e AMIN, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021). Nesse sentido, o isolamento de extremófilos é uma das possíveis estratégias implementadas.

Extremófilos são indivíduos capazes de sobreviver e se reproduzir sob condições ambientais que são limitantes à maioria dos organismos. Devido às características dos meios que colonizam, esses indivíduos desenvolveram mecanismos e estratégias de adaptação que os tornaram fontes de compostos bioativos altamente estáveis e com propriedades únicas (SCHULTZ e ROSADO, 2019; SAYED *et al.*, 2020), permitindo sua aplicação em diferentes

atividades. Nos últimos anos, a investigação acerca de extremófilos isolados a partir dos mais diferentes ambientes foi responsável pela identificação de novas espécies e no estabelecimento de novos bioprocessos (BABU *et al.*, 2015; YAÑEZ-YAZLLE *et al.*, 2021).

É neste contexto que, visando o potencial biotecnológico de microrganismos originários de ambientes extremos, Moura *et al.*, (2021) isolaram quinze espécies bacterianas a partir de painéis fotovoltaicos, meio caracterizado pela escassez hídrica, altas temperaturas e exposição à radiação, instalados nos municípios de Sorocaba e Itatiba. As bactérias foram cultivadas, identificadas e adicionadas à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de São Carlos (LMA – UFSCar). O presente estudo se insere nesta mesma perspectiva à medida em que se propõe a investigar o potencial de quatro das espécies isoladas, *Kocuria* sp., *Psychrobacter* sp., *Sphingomonas paucimobilis* e *Serratia nematodiphila*, na síntese de biofloculantes a serem aplicados no condicionamento do lodo de esgoto.

A seleção das espécies investigadas neste estudo é motivada pela escassez de produção científica recente acerca da síntese de biofloculantes por essas bactérias, ainda que já tenham sido investigados acerca de outras aplicações. A busca por artigos de pesquisa publicados no período entre 2013 e 2023 nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus* e *Science Direct* em abril de 2023, utilizando as palavras-chave (“*Kocuria*” AND “*Bioflocculant*”), (“*Sphingomonas paucimobilis*” AND “*Bioflocculant*”), (“*Serratia nematodiphila*” AND “*Bioflocculant*”), e (“*Psychrobacter*” AND “*Bioflocculant*”), possibilitou a seleção de apenas 4 artigos que se propuseram a analisar a atividade floculante de espécies de *Kocuria* e *Psychrobacter* (CHOUCHANE *et al.*, 2019; MU *et al.*, 2019; HASSAN *et al.*, 2021; FENG *et al.*, 2023); Para *Sphingomonas paucimobilis* e *Serratia nematodiphila*, não foram encontrados trabalhos similares publicados no período de análise. Esses resultados evidenciam o ineditismo e o potencial de inovação desta proposta.

Dessa forma, em vista do aumento na geração de resíduos provenientes do tratamento de efluentes, dos riscos e limitações associados aos aditivos comercialmente utilizados no tratamento do lodo de esgotos e da crescente demanda por tecnologias eficientes e mais ambientalmente adequadas, o presente estudo se propõe a avaliar o potencial de bactérias isoladas de painéis fotovoltaicos na produção de biofloculantes visando sua utilização no condicionamento do lodo de esgotos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial de bactérias isoladas de painéis fotovoltaicos na produção de biofloculantes.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar e selecionar o biofloculante de maior eficiência em termos de floculação.
- Investigar a influência das condições de cultivo sobre a capacidade de floculação do biofloculante selecionado.
- Caracterizar o biofloculante selecionado em termos de proteínas, lipídios e carboidratos.
- Avaliar a eficiência de floculação do biofloculante selecionado quando aplicado às amostras de lodo de esgotos sanitários e;
- Comparar a eficiência de floculação do biofloculante selecionado com a de um floculante comercial quanto aplicados ao lodo de esgoto.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Lodo de esgoto: características e os desafios sobre os sistemas de tratamento de efluentes

O lodo de esgoto é um resíduo gerado ao longo de diferentes fases do tratamento de efluentes e pode ser compreendido como uma mistura de água, matéria orgânica, microrganismos e contaminantes orgânicos e inorgânicos (KACPRZAK *et al.*, 2017). Apesar de sua composição poder tornar o lodo uma importante fonte de poluição secundária (LU *et al.*, 2018), o resíduo devidamente tratado pode ser aproveitado como biossólido na agricultura devido ao seu teor de macronutrientes (CAI *et al.*, 2021). Nesse contexto, a adoção de tratamentos eficientes é necessária para possibilitar a utilização do lodo ou permitir sua disposição final sem causar impactos nocivos ao ambiente e à saúde.

O gerenciamento e a disposição do lodo são desafios enfrentados em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Os processos de industrialização e urbanização impulsionam a geração de maiores volumes de esgoto, e conseqüentemente, implicam em maiores quantidades de lodo a serem tratadas (WU *et al.*, 2020). Para além do volume crescente e em excesso, o conteúdo de água, que pode chegar a 99% de todo o resíduo (WONG *et al.*, 2016), é característica crítica para as etapas de tratamento e manejo. Dessa forma, a diminuição do conteúdo de água se faz essencial para redução de custos operacionais e de transporte (MOWLA *et al.*, 2013). Após removida a água, o lodo adquire características de um resíduo sólido ou semissólido, comumente chamado de torta de lodo (ZAVALA *et al.*, 2016).

O desaguamento, nome dado ao processo de remoção de água do lodo, pode ser feito a partir de diferentes métodos, incluindo o uso de sistemas mecanizados, como filtros-prensa, prensas desaguadoras, filtração à vácuo e centrífugas; e sistemas naturais, como lagoas de lodo e leitos de secagem (SINCERO e SINCERO, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2015). No entanto, a aplicação direta do lodo ao desaguamento mecanizado apresenta baixa eficiência, de forma que ao final do processo, o resíduo ainda pode conter entre 80% e 98% de umidade (WEI *et al.*, 2018).

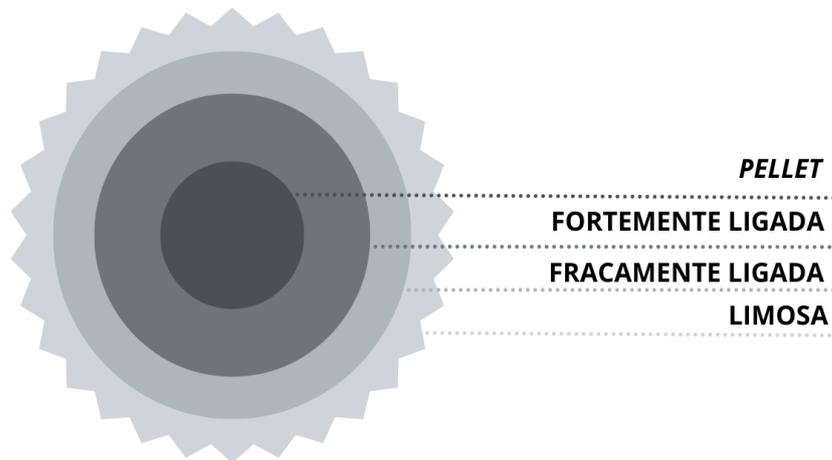
No lodo, a presença de água pode ser estratificada de acordo com a dificuldade de remoção. A fração denominada água livre representa cerca de 70% do total de água no resíduo e não se encontra ligada às partículas, facilitando sua separação da fase sólida (WEI *et al.*, 2018). A fração retida no interior dos flocos só pode ser removida a partir de seu rompimento e é chamada água intersticial. A água superficial é a encontrada aderida à superfície das

partículas e a água de hidratação é a fração caracterizada por estar fortemente ligada às partículas. As frações de águas intersticial, superficial e de hidratação formam juntas o conteúdo de água ligada, que implica em maior dificuldade de remoção, pois sua separação da fase sólida demanda grandes quantidades de energia (MOWLA *et al.*, 2013). Embora a quantidade de água possível de ser removida tenha relação com o mecanismo de desaguamento adotado (WU *et al.*, 2020), as dificuldades de desaguamento são principalmente atribuídas à concentração de substâncias poliméricas extracelulares (SPE).

As SPE são macromoléculas orgânicas de elevada massa molecular, compostas principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas. Essas moléculas são secretadas por animais, plantas, fungos, bactérias e algas (SALEEM e BACHMANN, 2018; ANG e MOHAMMAD, 2020) como medida de proteção às condições adversas do meio e podem ser encontradas tanto no interior das células, quanto na superfície celular (WINGENDER *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2018). No lodo, as SPE também são aspecto-chave para manutenção da integridade funcional e estrutural dos flocos (NIU *et al.*, 2013) que são agregados de microrganismos e partículas coloidais orgânicas e/ou inorgânicas aderidas a estas substâncias (WILÉN *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2020).

A presença das SPE na formação dos flocos também pode ser compreendida a partir de sua divisão em diferentes camadas (Figura 1). A camada limosa é mais externa e solúvel, se mantendo disponível no sobrenadante após a sedimentação do lodo. Em seguida, a camada fracamente ligada forma uma cobertura dispersa e pouco aderida aos flocos, apresentando limites menos definidos e podendo ser extraída por processo de centrifugação leve. Em contraste, a camada mais interna é fortemente ligada à superfície das partículas, apresentando formato bem definido e só pode ser extraída a partir de intensa centrifugação. Às células residuais obtidas após a extração das camadas de SPE é dado o nome de *pellet* (WANG *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2015).

Figura 1 – Camadas de substâncias poliméricas extracelulares ao redor de partícula no lodo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao redor das partículas, as camadas fortemente e fracamente ligadas formam uma dupla camada que se caracteriza como uma matriz dinâmica, altamente hidratada, carregada negativamente e similar a um gel, sendo capaz de se unir às moléculas de água por meio de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas (FLEMMING e WINGENDER, 2001; NEYENS *et al.*, 2004). Na superfície das partículas, essa matriz retém água e impede a saída da água ligada ao interior dos flocos. Ainda, considerando a carga superficial dessas substâncias, quanto maior sua concentração no meio, maiores serão os efeitos das forças repulsivas entre as células, dificultando a formação de flocos e, conseqüentemente, a sedimentação dos sólidos (MOWLA *et al.*, 2013).

A concentração das SPE está diretamente associada ao tamanho e a distribuição das partículas e suas cargas superficiais. O excesso de sólidos finos e partículas coloidais suspensas no esgoto é que configura o maior obstáculo para o desaguamento. Durante a remoção mecânica de água, partículas de menores dimensões podem obstruir tanto os poros dos filtros quanto do próprio lodo, aumentando a resistência à filtração e diminuindo a permeabilidade (WU *et al.*, 2020). Assim, a aglutinação dessas partículas em flocos é necessária para formação da torta de lodo. Ainda, o tamanho reduzido das partículas implica em maior disponibilidade de área superficial na qual as moléculas de água podem estar adsorvidas (ZHANG *et al.*, 2022).

As propriedades dos flocos que irão condicionar as características da torta do lodo e a eficiência do processo de remoção de água (WEI *et al.*, 2018), à medida em que a formação de maiores flocos favorece a separação entre as fases sólida e líquida e diminui problemas associados à obstrução dos meios filtrantes, auxiliando na formação de tortas mais permeáveis e de estruturas mais abertas (HOGG, 2005; QI *et al.*, 2011). A repulsividade mútua entre as

partículas suspensas no lodo devido às suas cargas superficiais, no entanto, impede a formação dos flocos de maneira espontânea.

Apesar de terem sido elucidados aspectos estruturais das SPE que contribuem para a retenção de água nas partículas do lodo, a influência que suas frações e substâncias nelas presentes desempenham sobre o desaguamento ainda é controversa e passou a ser o foco da pesquisa nas últimas décadas (ZHANG *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). A concentração total de SPE, por exemplo, já foi reportada como fator que dificulta o desaguamento do lodo de esgoto pela maior retenção de água (MURUGESAN *et al.*, 2016). No entanto, a maior concentração de frações específicas foi associada à melhoria do desaguamento em diferentes tipos de lodo (HOUGHTON *et al.*, 2001). Esse fenômeno ocorre, pois o aumento na concentração do conteúdo de SPE até dado limite diminui a sensibilidade dos flocos ao cisalhamento, resultando em menor grau de dispersão das partículas no lodo. Por outro lado, quando em excesso, essas moléculas promovem uma maior retenção de água (WU *et al.*, 2020).

Além de abordar o papel do conteúdo total das SPE sobre o desaguamento, a literatura concentra diferentes análises sobre a relação entre as frações e componentes das SPE e a capacidade de remoção de água. Por exemplo, nos estudos conduzidos por To *et al.*, (2020), a redução no conteúdo total da camada fortemente ligada foi apontada como fator decisivo para o aumento da capacidade de desaguamento, pois essa fração foi a que mais contribuiu para o processo de gelificação e imobilização a água a redor dos flocos. Ainda nessa camada, Li *et al.*, (2021) verificaram que a diminuição do conteúdo de proteínas foi mais relevante para o processo de desaguamento do que o conteúdo de polissacarídeos, dado que o primeiro apresentou maior capacidade de retenção da água.

Por outro lado, a degradação do conteúdo de SPE na camada fracamente ligada também já foi associada a melhorias no desaguamento. Ao analisarem o conteúdo de água na torta de lodo após fase de desaguamento, Yu *et al.*, (2017) verificaram que o teor residual de água foi significativamente relacionado ao conteúdo desta fração. Os autores ainda destacam que a estrutura porosa e dispersa da camada fracamente ligada favorece sua capacidade de retenção de água. Apesar das diferentes conclusões acerca do papel das SPE sobre o desaguamento, a influência destas moléculas sobre a retenção da água no lodo é amplamente aceita (WU *et al.*, 2020).

Considerando os aspectos associados às dificuldades de desaguamento do lodo, o resíduo não raro é submetido ao pré-tratamento em etapa denominada condicionamento, em que processos de natureza física e/ou química são utilizados com o objetivo de alterar propriedades do lodo, favorecendo a remoção de água. Essas alterações ocorrem, em geral, pela

atuação sobre a capacidade de sedimentação das partículas, redução da compressibilidade dos sólidos e favorecimento da ruptura das camadas das SPE que envolvem os flocos (MOWLA *et al.*, 2013; PRAHARAJ *et al.*, 2022).

Os processos de coagulação e floculação se destacam entre os métodos de condicionamento devido sua eficiência, simplicidade operacional e baixos custos (ALMUBADDAL *et al.*, 2009; AGUNBIADÉ *et al.*, 2018), e têm sido empregados com sucesso na redução da turbidez, matéria orgânica e de outros poluentes orgânicos e inorgânicos solúveis presentes no lodo (TEH *et al.*, 2016; NAYERI e MOUSAVI, 2022).

3.2. Processos de coagulação e floculação no condicionamento do lodo de esgoto

Os processos de coagulação-floculação, comumente implementados nos estágios iniciais do tratamento de esgoto, são importantes etapas nas ETEs, à medida em que a presença de partículas coloidais e sólidos finos no esgoto limita a eficiência das fases subsequentes do tratamento. Devido às pequenas dimensões dessas partículas, as forças atrativas entre elas são menos significativas do que as forças repulsivas geradas por suas cargas superficiais (SINCERO e SINCERO, 2002). Essa condição configura um cenário de estabilidade no qual as partículas repelem umas às outras, fazendo com que se mantenham suspensas e dispersas no meio (TEH *et al.*, 2016).

É neste contexto que são empregados, de forma conjunta ou sequencial, os agentes coagulantes e floculantes. Enquanto os coagulantes atuam na desestabilização das partículas coloidais pela neutralização de suas cargas superficiais, reduzindo as forças repulsivas que predominam no sistema, os floculantes favorecem o contato e a formação de ligações entre as partículas já desestabilizadas (GREGORY, 2006; RENAULT *et al.*, 2009; TETTEH e RATHILAL, 2020; FARD *et al.*, 2021; KURNIAWAN *et al.*, 2022), permitindo a formação de flocos mais facilmente sedimentáveis.

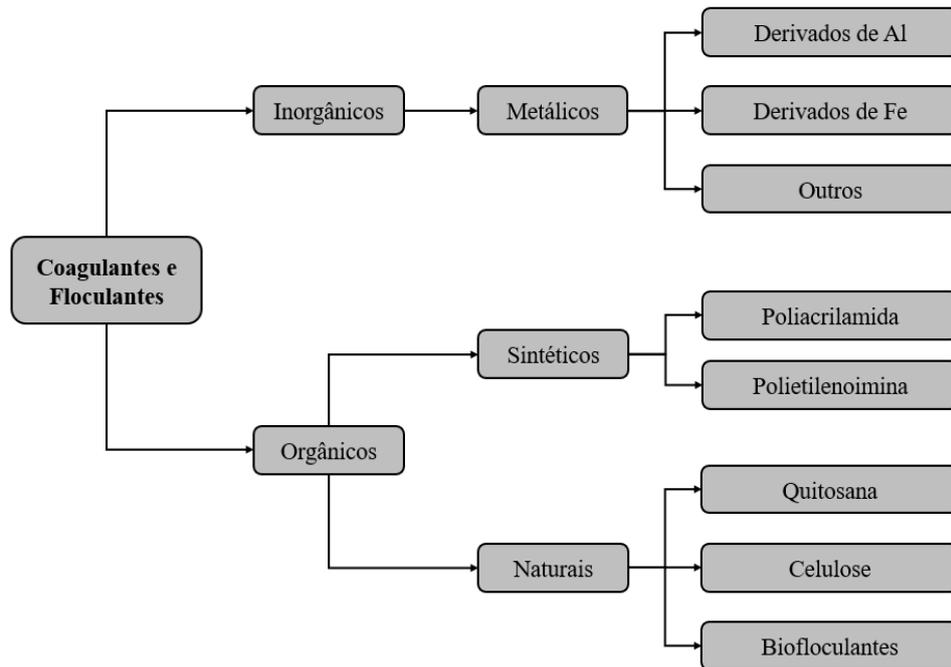
Nos esgotos sanitários, a carga superficial dos coloides, também chamada de carga primária, tem caráter geralmente negativo devido à influência do pH do meio sobre a dissociação dos grupos funcionais polares que se encontram na superfície das partículas, como aminas, hidroxilas e carboxilas (TEH *et al.*, 2016; KURNIAWAN *et al.*, 2022). A aplicação de aditivos com cargas contrárias às cargas primárias é o fator condicionante da desestabilização do sistema (SINCERO e SINCERO, 2002). Esse processo pode acontecer por meio de quatro mecanismos distintos: compressão da dupla camada, adsorção e neutralização de cargas,

varredura ou adsorção e formação de ligações entre partículas (BARTIKO e JULIO, 2015; AMRAN *et al.*, 2018).

Todavia, a desestabilização do sistema consiste apenas em uma fase intermediária do processo de coagulação-floculação, não resultando automaticamente na formação de flocos (SINCERO e SINCERO, 2002). Para tal, é necessário que o agente floculante seja efetivamente disperso no meio e sobre as partículas desestabilizadas (HYRYCZ *et al.*, 2022). O floculante se conecta às partículas, por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou pela formação de ligações de hidrogênio (BOLTO e GREGORY, 2007; TEH *et al.*, 2016), promovendo não só a dessorção das moléculas de água previamente aderidas à superfície do coloide, mas também auxiliando na aproximação e aglomeração das partículas (AMRAN, 2018; TETTEH e RATHILAL, 2020).

Por apresentarem diferentes características estruturais, grupos funcionais, propriedades iônicas, massas moleculares e mecanismos de ação (WEI *et al.*, 2018), os aditivos utilizados como coagulantes e floculantes podem ser categorizados de diferentes formas. Uma das possíveis classificações é acerca de sua natureza orgânica ou inorgânica (KURNIAWAN *et al.*, 2020) (Figura 2). Os inorgânicos compreendem os coagulantes de base metálica e solúveis em água, como sulfato de alumínio, sulfato ferroso e cloreto de ferro, e os orgânicos englobam os floculantes poliméricos, que podem ser subdivididos entre sintéticos, como polietilenoimina e derivados de poliacrilamida, e naturais, incluindo aqueles sintetizados por animais, plantas e microrganismos (GREGORY, 2006; LIU *et al.*, 2016; AGUNBIADE *et al.*, 2018).

Figura 2 – Tipos de coagulantes e floculantes utilizados no tratamento de esgoto.



Fonte: Elaborada pela autora.

A eficiência da coagulação e da floculação depende de múltiplos parâmetros (FARD *et al.*, 2021), tais como a velocidade agitação que possibilita a dispersão do floculante e seu contato com as partículas, e o tempo de tratamento, que condicionam a formação dos flocos. Quando em excesso, esses parâmetros podem resultar no rompimento dos aglomerados e consequentemente, na diminuição na taxa de sedimentação, mas quando insuficientes, podem aumentar o tempo necessário para formação dos flocos (KURNIAWAN *et al.*, 2020). A não otimização da concentração do aditivo a ser utilizada durante o tratamento pode resultar em mecanismos de aglutinação ineficientes, na reversão do estado de desestabilização do sistema ou até mesmo aumentar a viscosidade do lodo, deteriorando as condições de desaguamento (WEI *et al.*, 2018).

A performance dos aditivos também é afetada pelo pH do sistema devido à influência exercida sobre a alteração das cargas superficiais das partículas, dificultando sua neutralização (ZHU *et al.*, 2016). Ainda, a temperatura é fator decisivo, pois influencia na taxa de flocos formados, bem como sua estabilidade e tamanho, além de condicionar os processos de reestruturação em casos de rompimento (FITZPATRICK *et al.*, 2004). Apesar de dependerem de diferentes fatores, a efetividade, alta disponibilidade e os baixos custos dos aditivos sintéticos e inorgânicos impulsionam sua comercialização e aplicação.

Contudo, o uso dos coagulantes e floculantes comerciais não está dissociado de potenciais impactos ao ambiente e à saúde. Além de resultar na geração de grandes quantidades

de lodo tóxico (DOTTO *et al.*, 2019), demandando etapas adicionais de tratamento e reduzindo possibilidades de aproveitamento e disposição final do resíduo (IMRON *et al.*, 2020), o uso de sais inorgânicos pode aumentar a concentração de íons metálicos na água tratada, implicando riscos decorrentes de seu consumo (RENAULT *et al.*, 2009). Nesse contexto, o caráter neurotóxico do alumínio é frequentemente ressaltado, em especial com relação à intoxicação crônica pelo consumo prolongado de água contaminada com o metal, prática que foi associada ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (TOMLJENOVIC, 2011; EXLEY, 2017; MIRZA *et al.*, 2017).

Outros impactos negativos acerca dos aditivos empregados no tratamento de água e efluentes dizem respeito aos derivados de poliacrilamida, que compreendem extenso grupo de floclulantes comercialmente em uso. A decomposição de poliacrilamida, por exemplo, é tida como processo nocivo ao ambiente, pois libera monômeros tóxicos e de difícil biodegradabilidade, considerados carcinogênicos e potencialmente danosos ao sistema nervoso (ZHU *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2020; XIA *et al.*, 2022).

Dessa forma, tendo em vista os riscos ambientais e em termos de saúde pública associados aos aditivos sintéticos e metálicos (XIA *et al.*, 2022), os custos adicionais decorrentes de seu uso devido a maior geração de resíduos tóxicos que carecem de tratamento (ZAVALA *et al.*, 2016) e o aumento da demanda por tecnologias mais ambientalmente adequadas (FARD *et al.*, 2021), os floclulantes e coagulantes de origem biológica têm ganhado destaque como possíveis alternativas dado seu caráter biodegradável, não tóxico e pela não geração de subprodutos tóxicos, possibilitando o aproveitamento do resíduo em outras atividades (LIU *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2016; KURNIAWAN *et al.*, 2020).

3.3. Biofloclulantes: síntese e aplicações

Microrganismos secretam substâncias na forma de metabólitos primários e secundários (SEYEDSAYAMDOST, 2019). Enquanto os metabólitos primários são sintetizados ininterruptamente, pois estão associados a processos essenciais, como crescimento e reprodução, os metabólitos secundários estão relacionados a vantagens adaptativas adquiridas pelos indivíduos (PANDE e KOST, 2017; FOUILLAUD e DUFOSSÉ, 2022). Além dos aspectos genéticos, a síntese de metabólitos secundários é influenciada também por características ambientais. Nesse sentido, os metabólitos podem ser produzidos em diferentes contextos, como em resposta a aspectos nocivos do meio ou para auxiliar na prevenção da perda

de água, favorecer a comunicação celular e facilitar a obtenção de nutrientes (LIU *et al.*, 2003; VAN HAMME *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2018).

Em razão de sua diversidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade, os metabólitos secundários se tornaram foco de pesquisa nas últimas décadas (AYANGBENRO *et al.*, 2019). Como resultado, muitos já foram identificados como tendo propriedades que possibilitam seus usos como antibióticos, pigmentos, toxinas e/ou inibidores enzimáticos (FOUILLAUD e DUFOSSÉ, 2022), com potencial de aplicabilidade em diferentes atividades e setores. No tratamento de águas residuárias, um dos metabólitos secundários de destaque são os biofloculantes, polímeros extracelulares liberados durante processos de lise celular ou secretados diretamente por diferentes organismos, incluindo algas, fungos, leveduras e bactérias (AGUNBIADE *et al.*, 2022; ALIAS *et al.*, 2022).

Ainda que na literatura a síntese de biofloculantes seja principalmente associada ao crescimento celular, ocorrendo em fases distintas de acordo com o microrganismo produtor, existem exceções como a síntese independente da fase do crescimento (MORE *et al.*, 2014). Por exemplo, os biofloculantes produzidos por *Serratia ficaria* (GONG *et al.*, 2008), *Bacillus* spp. (GOUVEIA *et al.*, 2019) e *Pseudomonas* sp. (FENG *et al.*, 2022) apresentaram picos de floculação nas fases iniciais do crescimento estacionário, permitindo afirmar que essas moléculas foram originadas por biossíntese e não por processos de autólise ou pela redução da atividade enzimática. No entanto, a taxa de floculação do metabólito sintetizado por *Chryseobacterium daeguense* (LIU *et al.*, 2010) só apresentou elevada eficiência durante a fase de morte celular, indicando a não relação entre crescimento e eficiência do processo.

A neutralização de cargas e a formação de ligação entre partículas são os dois principais mecanismos de ação observados quando do uso dos biofloculantes (KURNIAWAN *et al.*, 2022). A neutralização de cargas consiste no processo de adsorção entre coloide e biofloculante de cargas superficiais contrárias, processo possibilitado pela hidrólise da molécula, formando cátions que se ligam às superfícies das partículas, estabilizando-as; e a formação de ligação entre partículas ocorre quando algumas partes do biofloculante, caracterizado por longa cadeia polimérica, atua como uma ponte entre diferentes partículas dispersas no meio, formando estruturas complexas (AMRAN *et al.*, 2018; KOUL *et al.*, 2022).

Os mecanismos de funcionamento dos biofloculantes estão condicionados a componentes estruturais e grupos funcionais presentes no polímero. Apesar de serem moléculas extremamente diversas, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas são os principais constituintes reportados (MORE *et al.*, 2014), bem como os grupos funcionais aminas, carboxilas e hidroxilas (KURNIAWAN *et al.*, 2020). Nos estudos recentes

acerca das propriedades dos biofloculantes, a identificação de grupos funcionais a partir de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é o método mais utilizado.

Atualmente, a aplicação dos biofloculantes já se mostrou eficiente no tratamento de diferentes tipos de resíduos, como efluentes de mineração (FAJAR *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2023) e esgotos sanitários (TSILO *et al.*, 2022; XIA *et al.*, 2022), no tratamento de água para abastecimento doméstico (LI *et al.*, 2009; NIE *et al.*, 2021), na remoção de metais potencialmente tóxicos (AYANGBENRO *et al.*, 2019; TAWILA *et al.*, 2019; HUA *et al.*, 2021), corantes (LI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017) e na diminuição de sólidos suspensos (GUO *et al.*, 2015; AHMAD *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços acerca do potencial biotecnológico dos biofloculantes, existem limitações no seu uso comercial, principalmente com relação à produção em escala, dados os altos custos e os baixos rendimentos se comparados aos aditivos sintéticos e metálicos (LIU *et al.*, 2016; ANG e MOHAMMAD, 2020). Dessa forma, estratégias como o isolamento de novas cepas a partir de ambientes extremos, busca por substratos economicamente acessíveis, otimização das condições de cultivo, expansão das áreas de aplicação e o uso de engenharia genética para a obtenção cepas mais eficientes vêm sendo explorados a fim de melhorar o custo-benefício da produção dos biofloculantes e torná-los economicamente competitivos frente aos aditivos comercialmente consolidados (LIU *et al.*, 2010; SALEHIZADEH e YAN, 2014; LIU *et al.*, 2016).

3.4. Isolamento de microrganismos de interesse biotecnológico

O isolamento de novos microrganismos produtores de biofloculantes é uma das estratégias adotadas para aumentar a competitividade dos aditivos naturais frente às alternativas de natureza química e sintética. O objetivo dessa abordagem é a identificação de indivíduos que apresentem alta atividade e sejam capazes de sintetizar biofloculantes eficientes, estáveis e não tóxicos a partir do uso de substratos de baixo custo (GIRI *et al.*, 2015). Ainda que a maior parte das pesquisas sobre o tema estejam orientadas para produção de biofloculantes usando culturas puras, eficiência igual ou superior pode ser atingida a partir do uso de consórcio de microrganismos (REBAH *et al.*, 2018).

Neste contexto, o estudo dos extremófilos se consolidou como campo promissor na identificação de novos bioprocessos e aplicações (BABU *et al.*, 2015). Extremófilos são microrganismos evolutivamente adaptados para sobreviver em ambientes cujas características

físico-químicas são limitantes ou letais para a maioria dos organismos vivos, tais como altas ou baixas temperaturas, condições de acidez ou alcalinidade, exposição a elevados índices de radiação, escassez de água e nutrientes, alta salinidade e até mesmo a presença de elementos tóxicos (URBIETA *et al.*, 2015; BASAK *et al.*, 2020).

Existem diferentes categorias de extremófilos em função das condições às quais estão adaptados para sobreviver. De acordo com a forma como respondem a essas condições, os extremófilos podem ainda ser distinguidos entre aqueles que necessitam de uma ou mais condições extremas para viabilizar seu crescimento, e aqueles que apesar de tolerarem a exposição a essas condições, apresentam crescimento ótimo em circunstâncias tidas como normais (SALWAN e SHARMA, 2020).

Em razão das características extremas dos meios que colonizam, esses microrganismos desenvolveram mecanismos e estratégias para se manterem metabolicamente ativos, tornando-os fisiologicamente diversos e como fontes de compostos bioativos altamente especializados, estáveis e com propriedades únicas (SCHULTZ e ROSADO, 2019; SAYED *et al.*, 2020). Ainda, a elevada capacidade de adaptação desses indivíduos permite com que eles tenham melhor eficiência quando comparados a outros microrganismos submetidos a condições extremas (SALWAN e SHARMA, 2020).

Um exemplo dessa diferença é a aplicação de enzimas como biocatalisadoras. Ainda que as enzimas sintetizadas por microrganismos não-extremófilos possam ser eficientemente utilizadas com essa finalidade em processos industriais, não raro apresentam baixa estabilidade quando submetidas a altas temperaturas e condições extremas de pH. Contudo, quando provenientes de extremófilos, essas enzimas, também chamadas extremoenzimas, não só apresentam elevada estabilidade quando submetidas a esses mesmos fatores, mas também na presença de solventes orgânicos, metais potencialmente tóxicos e quando submetidas a ataques proteolíticos (CABRERA e BLAMEY, 2018).

Nas últimas décadas, diferentes estudos se propuseram a investigar a presença de microrganismos extremófilos nos mais diversos ambientes, identificando novas espécies e biomoléculas (VIJAY *et al.*, 2018; WOLELLA e TILAHUN, 2020; BERMANEC *et al.*, 2021; YANEZ-YAZLLE *et al.*, 2021). Esses indivíduos foram identificados em ambientes naturais, como geleiras, vulcões, lagos salinos, fontes termais, desertos e até mesmo em áreas contaminadas, mas também em ambientes artificiais, como é o caso dos painéis fotovoltaicos. Nestes, a diversidade microbiológica foi apontada como similar à observada em locais nos quais a disponibilidade de água, temperatura e a exposição à radiação são fatores limitantes (DORADO-MORALES *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2021).

Considerando o potencial biotecnológico dos extremófilos e visando a investigação de possíveis aplicações para os metabólitos sintetizados por esses microrganismos, Moura *et al.*, (2021) isolaram quinze cepas de painéis fotovoltaicos instalados nos municípios de Sorocaba e Itatiba, ambos localizados no estado de São Paulo. As bactérias foram cultivadas em meio propício para seu crescimento, identificadas e adicionadas à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de São Carlos (LMA – UFSCar).

No contexto deste estudo, quatro das cepas isoladas dos painéis fotovoltaicos, identificadas como *Kocuria* sp., *Psychrobacter* sp., *Serratia nematodiphila* e *Sphingomonas paucimobilis*, foram selecionadas para avaliação da capacidade de síntese de biofloculantes visando sua aplicação no condicionamento do lodo de esgoto. A seleção destas bactérias como foco de análise foi motivada pela escassa produção científica quanto a investigação de seus potenciais floculantes.

A espécie *S. nematodiphila* foi isolada pela primeira vez por Zhang *et al.*, (2009) a partir de intestino do nematoide *Heterorhabditoides chongmingensis*, sendo identificada como aeróbia, gram-negativa, de formato bacilar, coloração avermelhada e dotada de um único flagelo para permitir sua mobilidade. Investigada na agricultura devido a sua ação antimicrobiana (KHOA *et al.*, 2016; FIRDU *et al.*, 2022) e pela capacidade de colonizar raízes de plantas, favorecendo o crescimento vegetal (KHANG *et al.*, 2015; JAGTAP *et al.*, 2023), a espécie também foi utilizada em estudos voltados à biossíntese de nanopartículas (MALARKODI *et al.*, 2013). *S. nematodiphila* também foi identificada como capaz de produzir biosurfactantes, outra categoria de metabólito secundário com propriedades emulsificantes e antimicrobianas (PANJIAR *et al.*, 2020).

Apesar de o isolamento de *S. nematodiphila* a partir de ambientes extremos ainda não ter sido amplamente reportado na literatura científica, *Serratia* spp. isoladas na Antártica foram apontadas como resistentes a baixas temperaturas e à exposição a UV-C (MONSALVES *et al.*, 2020). Especificamente sobre a espécie em análise neste estudo, ainda que seu crescimento ótimo ocorra em faixa de temperatura entre 30 e 37°C (ZHANG *et al.*, 2009), nos estudos conduzidos por Khang *et al.*, (2015), a bactéria apresentou crescimento satisfatório a 5°C.

As bactérias da espécie *S. paucimobilis* são descritas como de formato bacilar, gram-negativas e aeróbias e são conhecidas como um agente infeccioso (RYAN e ADLEY, 2010; BEAINO *et al.*, 2018). A capacidade de colonizar não só ambientes naturais, mas também instrumentos hospitalares, como respiradores e equipamentos de diálise, faz com que esse microrganismo seja visto como um risco especialmente para pessoas portadoras de doenças

crônicas. Nesse contexto, a espécie já foi relacionada a diferentes tipos de infecções, como sepse, endoftalmite, embolia pulmonar séptica e até mesmo meningite (GOKER *et al.*, 2017).

Todavia, a patogenicidade de *S. paucimobilis* não é entrave para a investigação e aplicação de seus metabólitos em processos biotecnológicos. Nicolaus *et al.*, (2010) ressaltam que em escala industrial, produtos de origem microbiológica já consolidados, como as gomas xantana, dextrana, gelana e curdlana, são sintetizadas por espécies dos gêneros *Xanthomonas*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes*, respectivamente, tidas como patógenas. Nas últimas décadas, foram atribuídos a alguns metabólitos de *S. paucimobilis*, propriedades emulsificantes, sendo capazes de emulsionar diferentes óleos e hidrocarbonetos (ASHTAPUTRE e SHAH, 1995); floculantes, com alta eficiência quando aplicado à suspensão caulim e na remoção de corantes em efluentes (SANAYEI *et al.*, 2010) e; gelificantes, pela produção de goma gelana, muito utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia devido sua elevada resistência à acidez e ao calor (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

O gênero *Psychrobacter* compreende diferentes espécies de bactérias gram-negativas, estritamente aeróbias, de formato esférico ou bacilar e incapazes de se mover livremente, isoladas a partir dos mais diferentes ambientes, incluindo oceanos, geleiras, solos e sedimentos (BOWMAN, 2006). Apesar de comuns nesses ambientes, *Psychrobacter* spp. já foram encontradas em aerossóis de fezes de pombos (KAMPFER *et al.*, 2002), em pulmões de ovelhas (VELA *et al.*, 2003) e em sangue humano (WIRTH *et al.*, 2012). Em alguns casos, dadas espécies apresentam patogenicidade; por exemplo, *Psychrobacter arenosus* e *Psychrobacter sanguinis* foram apontadas como causadoras de bacteremia e meningite, respectivamente, em ambiente hospitalar (CASPAR *et al.*, 2013; LE GUERN *et al.*, 2014) e *Psychrobacter glacincola* foi associada à infecção e mortalidade de peixes da espécie *Rhabdosargus haffara* (EL-SAYED *et al.*, 2023).

As *Psychrobacter* spp. não só são reportadas por sua adaptação às baixas temperaturas e altas pressões (STALOCH *et al.*, 2022), mas também por suportarem exposição a elevadas concentrações de sais (CIOK e DZIEWIT, 2018). Tais características impulsionam os estudos acerca dessas espécies, de forma que algumas já foram identificadas como produtoras de enzimas de relevante interesse biotecnológico (LINEHAN *et al.*, 2021; STALOCH *et al.*, 2022), pigmentos (ROMANENKO *et al.*, 2009), resistentes à presença de determinados metais potencialmente tóxicos (LASEK *et al.*, 2017), eficientes em processos de biorremediação (ABD-ELNABY *et al.*, 2016), além de serem consideradas cepas modelo na investigação de bactérias adaptadas a condições extremas (CIOK e DZIEWIT, 2018)

As bactérias do gênero *Kocuria* são descritas como sendo de formato esférico, incapazes de movimentação livre, gram-positivas e em sua maioria, aeróbias (PARK *et al.*, 2010). Podendo ser resistentes a ação de antimicrobianos (RAMOS *et al.*, 2021), colonizam as mucosas e a pele de animais, bem como equipamentos hospitalares, causando diferentes tipos de infecção e tornando-se um risco para pessoas com sistema imunológico debilitado (PURTY *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2015). Em ambientes naturais, condição na qual geralmente não caracterizam riscos à saúde (KANDI *et al.*, 2016), podem ser isoladas a partir de sedimentos e solos, inclusive quando contaminados com metais potencialmente tóxicos, além de ambientes aquáticos, salinos, desérticos, e em quais a exposição a baixas temperaturas, escassez de água e elevados índices de radiação ionizante são as condições limitantes (SAVINI *et al.*, 2010; TIMKINA *et al.*, 2022).

Em termos de aplicação, Timkina *et al.*, (2022) destacam que algumas espécies do gênero ainda são subaproveitadas, como *K. marina* e *K. varians*. Ainda assim, *Kocuria* spp. já foram apontadas como produtoras de biossurfactantes e pigmentos (AKBARI *et al.*, 2021; LOPEZ *et al.*, 2022), fontes de enzimas de interesse para a indústria alimentícia (RAMOS *et al.*, 2021) e como capazes de promover o crescimento vegetal em condições extremas (AFRIDI *et al.*, 2021). Recentemente, atividade floculante foi verificada em algumas espécies de *Kocuria*, possibilitando a remoção de corantes em efluentes, além de seu potencial aplicação em processos de biorremediação (CHEN *et al.*, 2017; CHOUCANE *et al.*, 2018).

3.4.1. Influência das condições de cultivo sobre a síntese de biofloculantes

Em laboratório, as condições de cultivo influenciam diretamente na produção de biofloculantes e por isso, variáveis como tamanho do inóculo, pH, fontes de carbono e nitrogênio e temperatura precisam ser otimizados (SALEHIZADEH e SHOJAOSADATI, 2001).

Durante a fermentação, o tamanho do inóculo desempenha papel-chave à medida em que menores valores podem prolongar a fase estacionária de crescimento dos microrganismos, enquanto maiores valores podem inibir a produção de metabólitos secundários devido à escassez de nutrientes (AWOLUSI *et al.*, 2020). Por exemplo, quando avaliada a eficiência de biofloculante secretado por *Bacillus salmalaya*, o uso de 5% (v/v) de inóculo resultou em atividade floculante de 83,6% quando aplicado em suspensão caulim, mas a aplicação de inóculos de 0,1% (v/v) e 10% (v/v) resultaram em menores índices, de 53,2% e 72,4%, respectivamente (TAWILA *et al.*, 2018).

A correlação entre a produção de biofloculantes e a fase do crescimento bacteriano é aspecto comumente investigado, dado que o momento no qual ocorre a síntese dessas biomoléculas varia entre as espécies. Nesse sentido, enquanto foi observado aumento na produção de biofloculantes por *Microbacterium esteraromaticum* nas primeiras 8 horas de fermentação (LIU *et al.*, 2016), a produção de biofloculantes por *Chryseobacterium daeguense* foi verificada apenas após 54 horas de fermentação (LIU *et al.*, 2010). Essa diferença é indicativa de que o biofloculante de *M. esteraromaticum* é sintetizado ao longo do crescimento bacteriano, mas o de *C. daeguense* tem origem intracelular e sua concentração só é aumentada a partir do rompimento das células durante a fase de morte celular.

As condições ideais de temperatura e pH também variam entre as espécies. Para *Bacillus licheniformis*, o estabelecimento de temperatura em 37 °C e pH igual a 7 resultou na melhor eficiência de atividade floculante quando submetido à suspensão caulim, atingindo 98,5% (LI *et al.*, 2009). Para *Streptomyces platenis*, no entanto, a maior eficiência foi observada a partir de temperatura igual a 50 °C e pH igual a 7,0, resultando em atividade floculante de 90% (AGUNBIADE *et al.*, 2018).

O tipo e a quantidade das fontes de Carbono e Nitrogênio também foram associados à produção de biofloculantes à medida em que exercem influências sobre o crescimento microbiológico e a produção de enzimas, proteínas e ácidos nucleicos (AWOLUSI *et al.*, 2020). Chen *et al.*, (2017) compararam a influência de diferentes concentrações de glicose, sacarose, frutose, amido, glicerol, lactose e citrato de sódio como fontes de Carbono para viabilizar a produção de biofloculante sintetizado por *Alteromonas* sp., bem como extrato de levedura, triptona, extrato de carne, farinha de soja, farinha de trigo, ureia, NaNO₃ e NH₄Cl como fontes inorgânicas e orgânicas de Nitrogênio. A combinação de 30 g/L de glicose e 1,5 g/L de farinha de trigo foi associada à condição ótima para a obtenção da biomolécula.

O uso de íons metálicos em conjunto com os biofloculantes é recorrentemente reportado na literatura. Cátions divalentes, como Ni²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ e Ca²⁺ (NI *et al.*, 2011), favorecem a floculação ao neutralizar e estabilizar as cargas residuais negativas dos grupos funcionais dos biofloculantes, permitindo a formação de ligações entre os polímeros e as partículas suspensas no meio (HIGGINS e NOVAK, 1997; YIM *et al.*, 2007). Ainda, os cátions aumentam a capacidade de adsorção dos biofloculantes às superfícies dos sólidos ao minimizarem as cargas negativas tanto dos polímeros quanto das partículas (AGUNBIADE *et al.*, 2018). Os efeitos positivos da adição de cátions são ressaltados por Awolusi *et al.*, (2020), ao ressaltarem, por exemplo, que quando aplicados à suspensão caulim, a presença desses

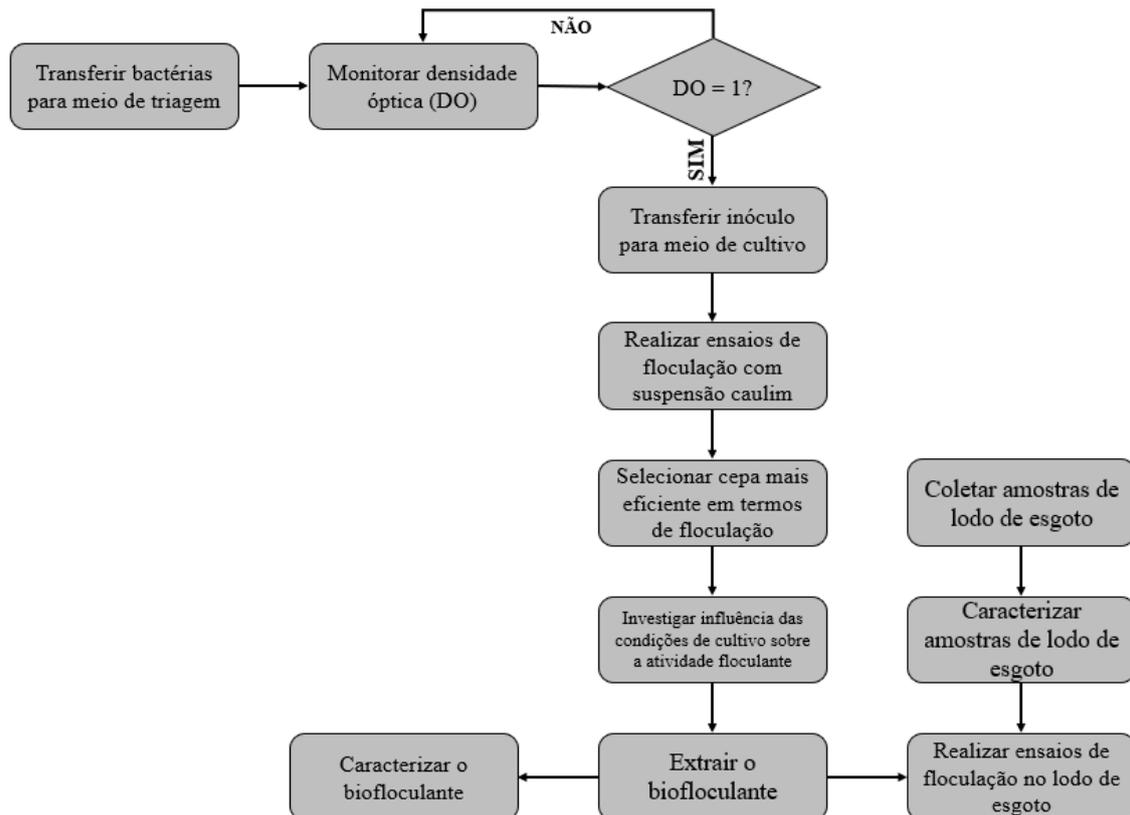
aditivos resultou na formação de flocos com maiores dimensões e, conseqüentemente, na melhoria da taxa de sedimentação das partículas.

Apesar das vantagens decorrentes do uso de íons metálicos, a adição de íons metálicos, além de representar custos adicionais, também pode ser fonte de poluição secundária, aspecto que motiva a busca por cepas produtoras de moléculas cuja eficiência seja independente do uso destes aditivos (LIU *et al.*, 2016). *Enterobacter gergoviae* (TANG *et al.*, 2014), *Microbacterium esteraromaticum* (LIU *et al.*, 2016) e *Bacillus megaterium* (PU *et al.*, 2020) são algumas espécies já destacadas como cátion-independentes. Ainda, quando adicionados durante a fermentação, determinadas espécies metálicas podem ter efeito inibitório sobre a síntese de biofloculantes. Sousa *et al.*, (1992), por exemplo, observaram que a adição de Ca^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Al^{3+} favoreceu a produção de biofloculantes produzidos por *Kluyveromyces marxianus*. No entanto, eficiências reduzidas foram obtidas quando Fe^{2+} e Sn^{2+} foram utilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas e procedimentos experimentais adotados ao longo desta pesquisa são apresentados no fluxograma da Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma simplificado do percurso experimental adotado.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.1. Isolamento e identificação de microrganismos

A determinação da atividade floculante de bactérias foi realizada com quatro espécies previamente isoladas de painéis fotovoltaicos em estudo conduzido por Moura *et al.*, (2021). Após identificadas a partir da análise de sequenciamento do gene 16S rRNA, as bactérias foram adicionadas à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba.

As bactérias das espécies *Sphingomonas paucimobilis*, *Kocuria* sp., *Serratia nematodiphila* e *Psychrobacter* sp. foram isoladas a partir de dois painéis fotovoltaicos instalados nos municípios de Sorocaba (-23°28'55" S, -47°22'19.9" W) e Itatiba (-22°59'36.3" S, -46°50'48" W). O painel instalado em Sorocaba estava em operação há dois anos no

momento da amostragem e nunca havia sido limpo, enquanto o painel de Itatiba estava em funcionamento há um ano e foi limpo seis meses antes da data de coleta.

A amostragem foi realizada com base nos procedimentos de Dorado-Morales *et al.*, (2016) e Porcar *et al.*, (2018). A superfície dos painéis foi esfregada utilizando gaze umidificada com solução tampão fosfato-salina estéril com $\text{pH} = 7,6$. A poeira retirada dos painéis foi armazenada em frasco de vidro contendo 150 mL de solução tampão fosfato-salina estéril e transferida para laboratório. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 5 mL de solução tampão fosfato-salina estéril.

O isolamento foi feito por semeadura de espalhamento ao inocular 100 μL da suspensão em placas de Petri contendo Luria Bertani Agar e R2A Agar. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e incubadas nas temperaturas de 3°C, 35°C e 50°C até que colônias pudessem ser observadas.

4.2. Condições de cultivo e preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos foi realizado de acordo com procedimento descrito por Agunbiade *et al.*, (2018) com adaptações. Com auxílio de alça de inoculação (10 μL), os isolados foram transferidos das placas de Petri para frascos e Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio de triagem composto por (g/L): glicose (2,0), ureia (0,5), extrato de levedura (0,5), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2), NaCl (0,1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), K_2HPO_4 (5,0) e KH_2PO_4 (2,0).

As culturas foram mantidas em incubadora Solab SL 223 a 30°C sob agitação de 150 rpm durante 48 horas. O método da absorbância adotado por Kurniawan *et al.*, (2021) foi utilizado para padronização dos inóculos. Dessa forma, o caldo de fermentação foi diluído em solução salina (0,9%) até atingir absorbância (DO_{600}) igual a 1 e foi utilizado como inóculo padronizado nos ensaios subsequentes.

Em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 30 mL de inóculo e 270 mL de meio de produção composto por (g/L): glicose (10,0), peptona (1,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3), K_2HPO_4 (5,0) e KH_2PO_4 (2,0). O pH foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH e HCl 0,1 M. As culturas foram novamente transferidas para incubadora a 150 rpm e 30 °C durante 120 horas. Alíquotas de 6 mL foram coletadas a cada 24 horas a fim de verificar o potencial flocculante, conforme procedimento descrito por Nwodo *et al.*, (2012). As alíquotas foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas (Eppendorf 5430R) a 10.000 rpm durante 15 minutos

para separar sobrenadante e biomassa. Os sobrenadantes foram utilizados para a análise do potencial floculante das cepas.

4.3. Determinação da atividade floculante

A determinação do potencial floculante das bactérias foi analisado de acordo com procedimento descrito por Mu *et al.*, (2018), utilizando suspensão de silicato de alumínio, também conhecido como caulim. O caulim micronizado (Apêndice B) é amplamente utilizado em estudos de floculação como material teste, pois quando em suspensão, permite simular um sistema coloidal. Em béquer de 1 Litro, 4 g de caulim foram homogeneizados com 1 Litro de água destilada. Antes do uso, a suspensão foi homogeneizada e mantida em repouso durante 10 minutos para sedimentação natural das partículas mais densas.

Em frasco de Erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 2,5 mL de CaCl_2 (10 g/L), 1 mL do sobrenadante livre de células e 46,5 mL de suspensão caulim (4 g/L). O frasco foi transferido para incubadora e submetido a agitação de 180 rpm por 1 minuto, seguido de agitação de 60 rpm por 2 minutos. A suspensão foi mantida em repouso durante 5 minutos e, em seguida, 3 mL da camada clarificada foram coletados para análise de absorvância (DO_{550}) em espectrofotômetro UV-Vis Hach DR 5000. Como amostra controle, o procedimento foi repetido utilizando água destilada no lugar do sobrenadante. A atividade floculante foi calculada a partir da Equação (1).

$$AF = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad (1)$$

Em que: A é a medida da absorvância da amostra controle e B é a medida da absorvância da amostra de interesse. Os resultados das atividades floculantes foram comparados e a espécie que apresentou a maior eficiência foi selecionada para as etapas subsequentes.

4.4. Influência das condições de cultivo sobre a atividade floculante

A fim de avaliar a influência das condições de cultivo sobre a atividade floculante e crescimento bacteriano, foi elaborado a partir do *software Minitab Statistical* (20.3.0), um planejamento experimental por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três fatores (pH inicial do meio, temperatura e tamanho do inóculo), cada um com dois níveis,

caracterizando um *design* fatorial 2^3 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 experimentos (Tabela 1). Dada a escassez de informações prévias acerca dos efeitos dos parâmetros avaliados sobre a produção do biofloculante da espécie investigada, bem como a influência dessas condições de cultivo sobre a capacidade de floculação da molécula, os níveis adotados foram definidos de forma a constituir um intervalo abrangente de análise. Dessa forma, foram definidos no planejamento experimental, os níveis de pH entre 4,0 e 10,0, de temperatura entre 15°C e 45°C e de tamanho de inóculo, entre 5% e 15%.

Tabela 1 – Quadro de ensaios determinados a partir do Delineamento Composto Central Rotacional: valores codificados e decodificados.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	pH	Temperatura	Inóculo	pH	Temperatura (°C)	Inóculo (%)
1	-1	-1	-1	4	15	5
2	1	-1	-1	10	15	5
3	-1	1	-1	4	45	5
4	1	1	-1	10	45	5
5	-1	-1	1	4	15	15
6	1	-1	1	10	15	15
7	-1	1	1	4	45	15
8	1	1	1	10	45	15
9	-1,681	0	0	1,95	30	10
10	1,681	0	0	12,05	30	10
11	0	-1,681	0	7	4,77	10
12	0	1,681	0	7	55,23	10
13	0	0	-1,681	7	30	1,59
14	0	0	1,681	7	30	18,41
15	0	0	0	7	30	10
16	0	0	0	7	30	10
17	0	0	0	7	30	10

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5. Extração e rendimento do biofloculante

A extração do biofloculante foi realizada de acordo com o procedimento modificado descrito por Xia *et al.*, (2022). Após 48 horas de incubação, o caldo do cultivo foi coletado e centrifugado a 7.000 rpm e 4°C por 15 minutos para separação entre sobrenadante e biomassa celular. O sobrenadante foi misturado com álcool etílico absoluto (C₂H₆O) a 4°C em uma proporção de 1:2 (v/v) e foi mantido a -15°C durante 16 horas para precipitação do biofloculante. O precipitado foi separado do sobrenadante após ser centrifugado a 7.000 rpm e 4°C por 15 minutos e lavado uma vez com álcool etílico. A suspensão foi vertida em cadinho e levado à estufa para secar a 45°C durante 24 horas. Após esse período, o biofloculante extraído foi triturado com auxílio de um pistilo. O pó foi armazenado para utilização nos ensaios e caracterizações subsequentes. O rendimento do biofloculante foi calculado por balanço de massa, considerando o volume total de sobrenadante utilizado durante o processo de extração e a massa do biofloculante obtida após secagem.

4.6. Validação das condições de otimização

Para validação das condições otimizadas obtidas a partir das respostas do DCCR, novo cultivo foi realizado estabelecendo pH inicial do meio igual a 12, temperatura de incubação igual 23,2°C e tamanho do inóculo fixado em 5%. Após 48 horas de incubação, o biofloculante foi extraído e secado conforme procedimento descrito no tópico 4.5. O biofloculante em pó foi solubilizado em água destilada nas concentrações de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL e 0,4 mg/mL e aplicados em suspensão caulim a fim de verificar a relação entre a concentração e a eficiência da floculação. Os ensaios de floculação foram realizados em suspensão caulim conforme procedimento descrito no item 4.3, substituindo o sobrenadante do caldo de cultivo pelo biofloculante extraído. A concentração associada à maior eficiência de atividade floculante foi utilizada nos testes de floculação do lodo de esgoto.

4.7. Caracterização do biofloculante

O biofloculante extraído foi caracterizado quanto ao conteúdo de proteínas totais a partir do método de Bradford, utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). A análise foi realizada no Laboratório de Biomarcadores da Universidade Federal de São Carlos, utilizando o espectrofotômetro Synergy HTX em um comprimento de onda de 595 nm. O conteúdo de carboidratos foi determinado a partir do

método fenol-ácido sulfúrico, utilizando glicose como padrão (CHAPLIN e KENNEDY, 2003). A análise foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Hach DR 5000 em um comprimento de onda de 490 nm. A quantificação de açúcares redutores totais foi feita a partir do método ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) (MILLER, 1959). A determinação dos lipídios foi feita a partir do método Bligh-Dyer (1959).

Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada na identificação dos grupos funcionais presentes no biofloculante e foi realizada no Laboratório de Plasmas Tecnológicos da Universidade Estadual de São Paulo – Campus Sorocaba, utilizando o espectrômetro Agilent, modelo Cary 630 FTIR, com um cristal de diamante e acessório de refletância total atenuada (ATR). A análise espectral foi realizada na faixa de número de ondas de 400 a 4.000 cm^{-1} (KIRAN *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2014). O biofloculante ainda foi submetido à análise química dos elementos e de morfologia superficial a partir do uso de Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL – JSM 610.

4.8. Análises no lodo do esgoto

4.8.1. Coleta e caracterização do lodo do esgoto

Amostras de lodo aeróbio provenientes da linha de recirculação de decantador secundário e amostras de lodo anaeróbio provenientes de reator anaeróbio de fluxo ascendente foram coletadas em uma Estação de Tratamento de Esgotos localizada em um município no interior de São Paulo, transportadas para laboratório e armazenadas sob refrigeração a 4°C.

O pH das amostras foi determinado com auxílio de um pHmetro de bancada (LUCA-210). As concentrações de sólidos totais, sólidos fixos, sólidos voláteis e sólidos sedimentáveis foram determinadas de acordo com o método 2540 G (APHA, 2005). A caracterização dos conteúdos de carboidratos e proteínas nas SPE foi realizada pelo método de fenol-ácido-sulfúrico utilizando glicose como padrão (CHAPLIN e KENNEDY, 1994) e pelo método de Bradford utilizando BSA como padrão (BRADFORD, 1976), respectivamente. O teor de umidade foi determinado a partir da diferença de massa após secar as amostras em estufa durante 24 horas a 105°C (CHERIFI e ZIATI, 2009).

As camadas das SPE no lodo foram extraídas conforme procedimento adaptado de Zhou *et al.*, (2014). Em tubo Falcon, 40 mL de lodo foram centrifugados a 2000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi classificado como camada limosa. Os *pellets* foram lavados duas vezes com solução de NaCl 0,05% (m/m) e foram ressuspensos para seu volume

original. A amostra foi submetida a banho de ultrassom por 2 minutos e em seguida, disposta em *shaker* Solab SL 223 a 180 rpm e 28°C durante 10 minutos. A amostra foi novamente submetida a ultrassom por 2 minutos, sendo obtida a camada fracamente ligada após centrifugação do sobrenadante a 7000 rpm por 15 minutos. Os *pellets* foram novamente ressuspendidos para seu volume original com NaCl 0,05% e levados à *shaker* a 180 rpm e 28°C durante 10 minutos. A amostra foi aquecida em banho maria a 70°C durante 30 minutos. Por fim, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante classificado como camada fortemente ligada. Todas as frações foram filtradas com membrana de acetato de celulose de 0,45 µm para remoção de partículas e metabólitos de baixa massa molecular que pudessem estar presente nos materiais extraídos.

Por fim, as amostras de lodo não condicionadas foram avaliadas quanto ao potencial de desaguamento a partir da avaliação do Tempo de Filtração. De acordo com os procedimentos descritos por Wong *et al.*, (2016). Em Funil de Büchner contendo papel filtro (Whatman número 1), foram adicionados 30 mL. O sistema foi mantido sob ação da gravidade durante 2 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida à pressão constante de 50 kPa com uso de bomba à vácuo (Primatec 131). O Tempo de Filtração foi caracterizado pela determinação do tempo necessário para filtrar 15 mL da amostra. Considerando as limitações do processo de filtração de amostras de lodo não condicionadas, o tempo limite do ensaio será de 30 minutos.

4.8.2. Ensaio de floculação no lodo de esgoto

As amostras de lodo foram submetidas a ensaios de floculação utilizando o biofloculante conforme procedimento descrito por Tsilo *et al.*, (2022). Inicialmente, as amostras de lodo foram diluídas com água destilada na proporção de 1:4 (v/v) para possibilitar a leitura no espectrofotômetro. Em frasco de Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 46,5 mL de lodo, 2,5 mL de CaCl₂ e 1 mL de biofloculante em concentração determinada conforme descrito no item 3.6. A suspensão foi inicialmente agitada a 180 rpm durante 1 minuto, seguida por agitação a 60 rpm durante 2 minutos e mantida em repouso durante 5 minutos antes de ser submetida à análise de absorvância (DO₅₅₀) da camada clarificada. O cálculo da atividade floculante foi realizado conforme Equação (1) descrita no item 3.2. O ensaio foi repetido utilizando somente lodo, sem qualquer presença de aditivos, e o sobrenadante foi utilizado como condição controle. Por fim, para estabelecer comparativo entre eficiência do biofloculante e floculante comercial, o ensaio foi repetido substituindo CaCl₂ e o biofloculante pelo floculante Praestol 851 BC,

caracterizado como polímero catiônico, atualmente utilizado na Estação de Tratamento de Esgotos na qual foram coletadas as amostras do lodo.

4.9. Análise estatística

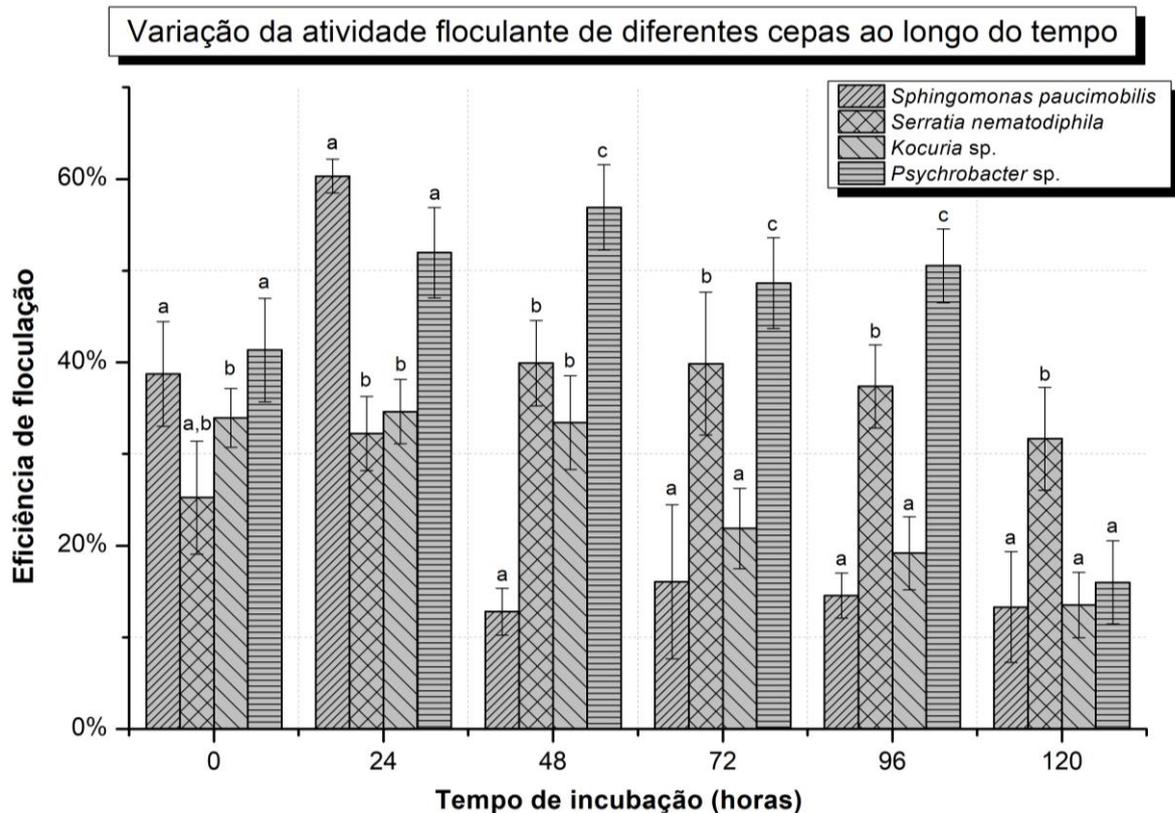
Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) paramétrica, utilizando o *software Minitab Statistical Software* versão 20.3, adotando o intervalo de confiança de 95%. Antes de serem submetidos à ANOVA, todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal e a homogeneidade de variância usando Teste de Levene. Os dados são apresentados como média das medidas individuais \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação da atividade flocculante

A análise da síntese de metabólitos por *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila*, *Kocuria* sp. e *Psychrobacter* sp. durante 120 horas de incubação indicou que todas as espécies bacterianas apresentaram atividade flocculante quando aplicadas à suspensão caulim (Apêndice C). No entanto, a eficiência dos bioflocculantes variou entre as espécies ao longo do tempo (Figura 4).

Figura 4 – Comparativo da atividade flocculante da *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila*, *Kocuria* sp. e *Psychrobacter* sp. em função do tempo de incubação.



Diferentes letras representam diferenças significativas quanto à atividade flocculante ($p < 0,05$) dentro de cada um dos intervalos de tempo analisados. Fonte: Elaborada pela autora.

Durante o cultivo da *Sphingomonas paucimobilis* foi observado um aumento da eficiência do bioflocculante nas primeiras 24 horas, variando de 38,74% para 60,32%, sendo este o pico de eficiência para esta bactéria sob condições não otimizadas de cultivo. Após esse período, foi observada redução acentuada na eficiência, atingindo 12,81% no tempo de 48 horas, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre as eficiências até o final do ensaio ($p > 0,05$).

O cultivo da *Serratia nematodiphila* foi marcado pelo aumento da eficiência de floculação nas primeiras 24 horas, variando de 25,24% para 32,23%. O pico de atividade floculante foi às 48 horas, com floculação de 39,91%. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as eficiências observadas até o final do período de incubação. Nesse sentido, *Serratia nematodiphila* se destaca, pois foi a única espécie a manter índice de floculação acima de 30% até o fim das 120 horas de incubação, o que não foi verificado para as outras cepas cujas eficiências, ao final do processo, estabilizaram na faixa de 14%.

A variação da atividade floculante da *Kocuria* sp. foi marcada por oscilações. Até 48 horas, a eficiência do biofloculante se manteve sem grandes variações, atingindo valor médio de 34,00%. Foi verificada redução na eficiência no período de 72 horas, mantendo valor médio de 20,53% até 96 horas. O término da análise no tempo de 120 horas foi caracterizado por mais uma redução na eficiência, atingindo valor final de 13,53%. Diferentemente das demais cepas, a atividade floculante da *Kocuria* sp. não foi marcada por qualquer pico distinto de eficiência.

Para a *Psychrobacter* sp., a atividade floculante aumentou de iniciais 41,35% para 51,96% nas primeiras 24 horas, atingido pico de 56,91% no tempo de 48 horas. No tempo de 72 horas, houve pequena diminuição na eficiência, estabilizando em valor médio 49,59% até 96 horas. O processo de incubação foi finalizado com eficiência de 16,00%. A elevada eficiência com pequenas variações ao longo do ensaio destacou o biofloculante de *Psychrobacter* sp. quando comparado aos sintetizados pelas demais bactérias.

Estabelecendo um comparativo entre as espécies bacterianas avaliadas, diferentes aspectos podem estar relacionados às variações de eficiências de seus biofloculantes. A natureza da molécula desempenha papel fundamental quanto à eficiência de floculação (KURNIAWAN *et al.*, 2020), pois pode resultar em características estruturais específicas, como determinados grupos funcionais e cargas superficiais (WEI *et al.*, 2018). De acordo com Alias *et al.*, (2022), biofloculantes com elevadas massas moleculares são mais eficientes, pois estabelecem ligações mais fortes e possuem maior capacidade de adsorção, permitindo formação de flocos maiores. Dessa forma, é possível que as espécies sintetizem moléculas com características e propriedades distintas, condicionando a eficiência do processo.

Ainda, a síntese dos biofloculantes pode ocorrer em momentos diferentes ao longo do processo de incubação. A princípio, as melhores eficiências observadas nas primeiras 48 horas, acompanhadas por redução nas taxas de floculação em função do tempo, sugerem que as moléculas são originadas pela síntese direta e não em decorrência de autólise. Contudo, quando em paralelo ao crescimento celular, a síntese do biofloculante pode ocorrer em fases distintas para cada espécie. A síntese de biofloculante por *Bacillus subtilis*, por exemplo, foi paralela à

fase de crescimento exponencial, tendo sido verificado aumento gradativo da eficiência de floculação entre 36 e 72 horas, com pico de atividade em 60 horas, mas redução na taxa de floculação durante a fase de morte celular (GIRI *et al.*, 2015). Em contrapartida, a produção do biofloculante de *Klebsiella pneumoniae* só ocorreu ao final da fase de crescimento exponencial em 18 horas de incubação, e apesar de oscilações em sua eficiência, novos picos de produção puderam ser verificados após 70 e 90 horas (NIE *et al.*, 2011).

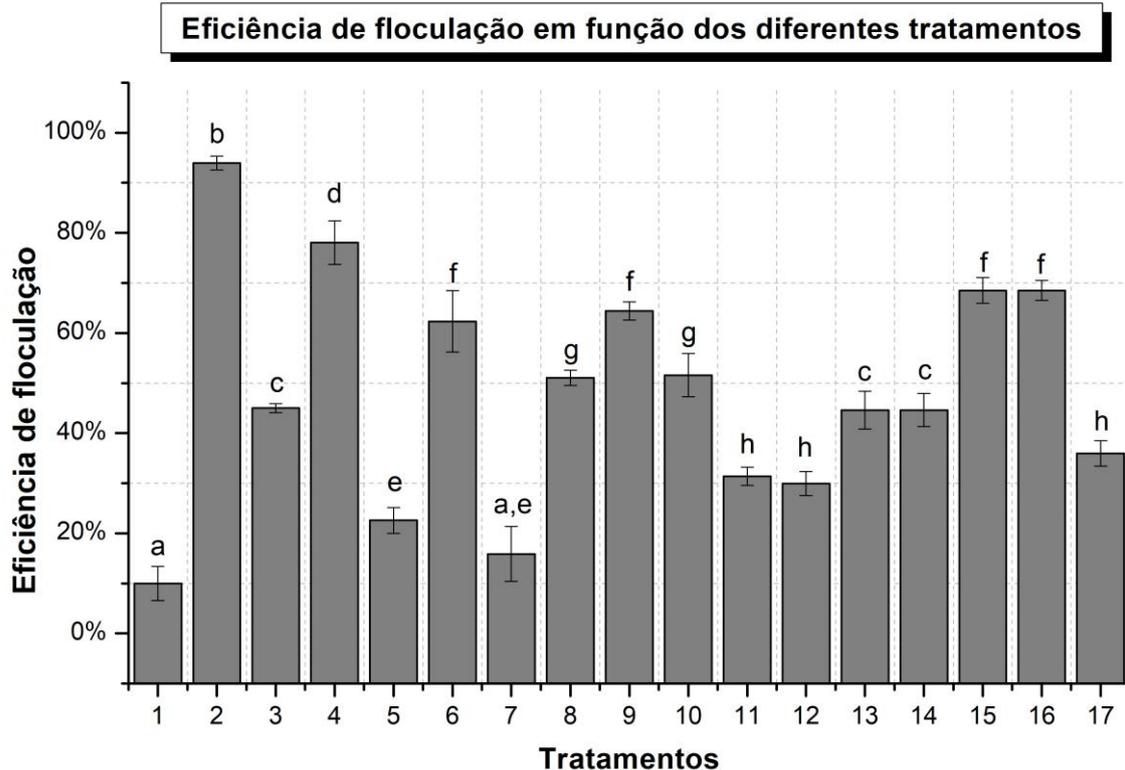
A redução na eficiência de floculação dos biofloculantes de *Sphingomonas paucimobilis*, *Kocuria* sp. e *Psychrobacter* sp. no decorrer das 120 horas de incubação pode ser associada à diminuição do conteúdo dessas moléculas no meio, que foi utilizado pelas bactérias para fins nutricionais. Nesse sentido, More *et al.*, (2014) ressaltam que metabólitos secundários podem ser degradados pelas bactérias como fontes de carbono e energia, em um cenário de escassez de nutrientes. Contudo, essa redução de eficiência não foi verificada para o biofloculante de *Serratia nematodiphila*, o que pode sugerir que o sistema ainda não havia alcançado a fase de morte celular em 120 horas de incubação e/ou que essa espécie, diferente das demais, não produz enzimas degradadoras de biofloculantes (MAKAPELA *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2021).

Desta forma, a partir das condições de cultivo adotadas neste estudo, o biofloculante produzido por *Psychrobacter* sp., com atividade máxima em 48 horas de incubação, apresentou considerável eficiência com menores variações ao longo do tempo, motivando a seleção desta cepa para investigações mais detalhadas nos ensaios subsequentes. No entanto, cabe ressaltar que existe potencial no uso dos biofloculantes sintetizados por *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila* e *Kocuria* sp. se determinadas as condições mais favoráveis e individualizadas de cultivo.

5.2. Relação entre condições de cultivo e atividade floculante

Após definição da cepa de maior atividade floculante, a *Psychrobacter* sp. foi submetida a novo processo de incubação de 48 horas, período no qual foi observada eficiência máxima do biofloculante sintetizado. A relação entre os diferentes tratamentos e a respectiva resposta da atividade floculante está apresentada na Figura 5.

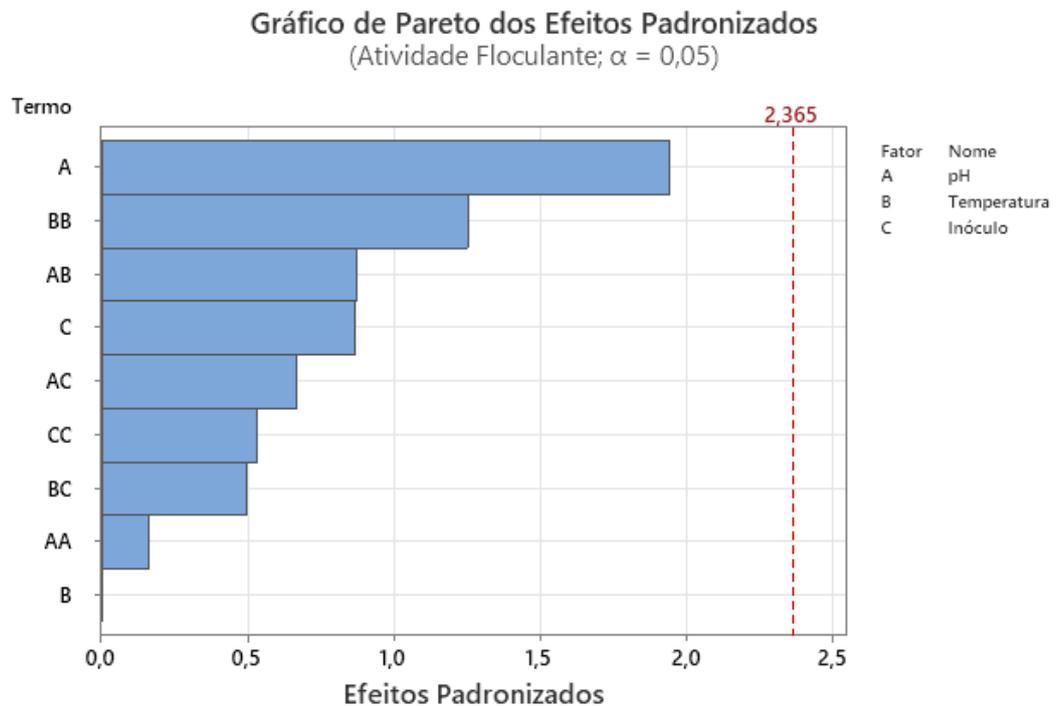
Figura 5 – Comparativo da atividade floculante da *Psychrobacter* sp. em função dos diferentes tratamentos adotados.



Diferentes letras representam diferenças significativas quanto à atividade floculante de cada um dos tratamentos ($p < 0,05$). Fonte: Elaborada pela autora.

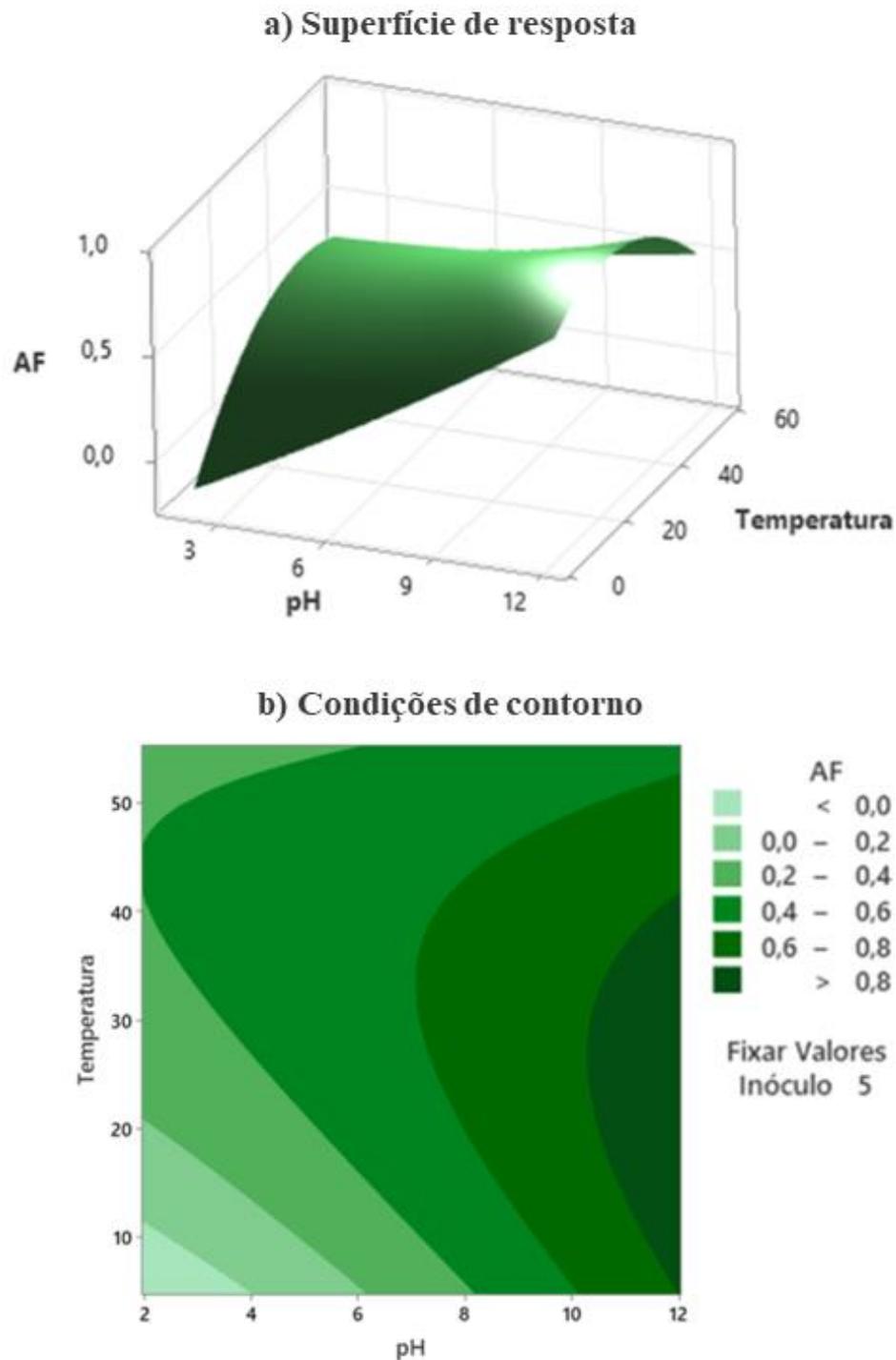
Análise estatística dos resultados da atividade floculante da *Psychrobacter* sp. denotou a existência de diferença significativa ($p \leq 0,05$) na resposta de pelo menos um dos tratamentos em relação aos demais (Apêndice D). Contudo, os parâmetros adotados não influenciaram significativamente as respostas obtidas, relação ilustrada pelo Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados (Figura 6). O gráfico de Pareto é uma ferramenta que pode ser utilizada na determinação de quão importantes são os efeitos dos fatores para uma determinada resposta. Considerando que nenhuma das barras azuis cruzou a linha vermelha e tracejada de referência, é possível afirmar que, de maneira conjunta, pH inicial do meio, temperatura de incubação e tamanho do inóculo, nas faixas de valores adotadas, não foram os fatores que condicionaram os resultados de floculação, sendo estes influenciados por outros fatores não mapeados neste estudo.

Figura 6 – Gráfico de Pareto sobre os efeitos do pH inicial do meio, temperatura de incubação e tamanho do inóculo na resposta da atividade flocculante do bioflocculante sintetizado por *Psychrobacter* sp.



Ainda que os parâmetros investigados não tenham sido significativamente relevantes para a atividade flocculante, os gráficos de superfície de resposta e de contorno (Figura 7) foram analisados a fim de estabelecer as condições de otimização dos parâmetros para maximizar a eficiência de flocculação do bioflocculante. De acordo com os dados e fixando o tamanho do inóculo em 5%, foi estabelecido que pH menor ou igual a 7,0, combinado à faixa da temperatura entre 30°C e 50°C resultaria em índices de flocculação acima de 40%. Independente da temperatura, no entanto, é esperado que valores de pH na faixa de 12,0 resultem em atividades flocculantes > 80%.

Figura 7 – Resultados dos experimentos definidos no Delineamento Composto Central Rotacional: gráfico de superfície de resposta e gráfico de condições de contorno.

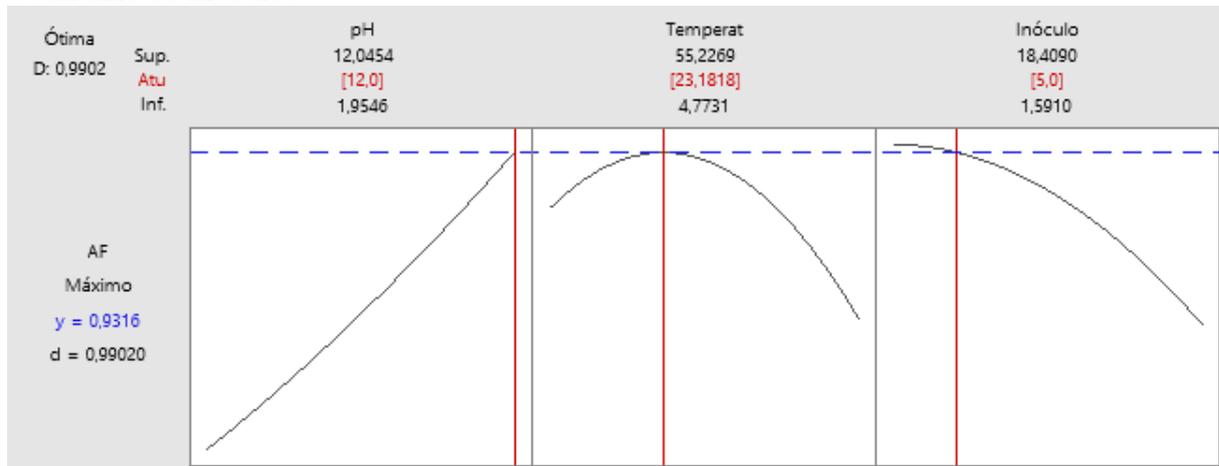


AF: Atividade Floculante. Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico de otimização de respostas também foi utilizado para avaliar como pH inicial do meio, temperatura de incubação e tamanho do inóculo influenciam nas respostas previstas, visando definir qual combinação dos fatores resultaria na maximização da atividade floculante

(Figura 8). Foram adotados como pontos superiores e inferiores, os valores extremos analisados para cada parâmetro durante o planejamento experimental.

Figura 8 – Gráfico de otimização de resposta para pH inicial do meio, temperatura de incubação e tamanho do inóculo.



Fonte: Elaborada pela autora.

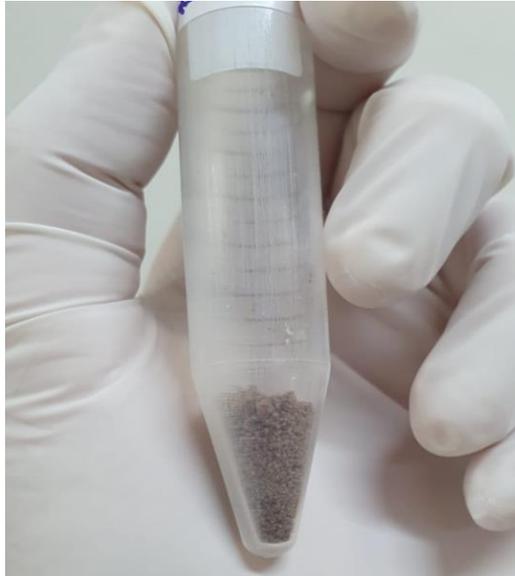
No gráfico de otimização de respostas, a linha azul tracejada representa a resposta máxima possível de ser obtida a partir dos ajustes ideais dos fatores analisados, representados pelas linhas verticais vermelhas. Dessa forma, ajustando o pH inicial do meio em 12,0, a temperatura de incubação em 23,18°C e fixando o tamanho do inóculo em 5%, é previsto que seja atingida uma atividade flocculante máxima de 93,16%. Ainda pelo gráfico, as linhas pretas sugerem que um aumento da temperatura e do tamanho do inóculo para além das faixas tidas como ideais resultariam em uma diminuição da atividade flocculante.

5.3. Validação das condições de otimização

Um novo cultivo de *Psychrobacter* sp. foi realizado adotando como parâmetros, os valores de pH inicial do meio, temperatura de incubação e tamanho do inóculo apontados como condição ideal para a maximização da atividade flocculante. O rendimento médio do bioflocculante depois de seco e extraído (Figura 9) foi de 2,9 g/L, que é comparável ao rendimento de bioflocculantes sintetizados por *Bacillus salmalaya* (TAWILA *et al.*, 2018), *Pantoea* sp. (AYANGBENRO *et al.*, 2019), *Bacillus pumilus* (MALIEHE *et al.*, 2020) e *Bacillus megaterium* (SELEPE *et al.*, 2022) com 2,7 g/L, 2,9 g/L, 3,1 g/L e 3,01 g/L, respectivamente. Ainda que o rendimento tenha sido satisfatório, a otimização das condições de cultivo adotando fatores não considerados neste estudo, tais como aspectos nutricionais,

velocidade de agitação e tempo de incubação, podem aumentar a quantidade de floculante obtida.

Figura 9 – Biofloculante sintetizado por *Psychrobacter* sp. a partir das condições otimizadas de cultivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

A aplicação do biofloculante em suspensão caulim após otimização resultou em floculação média de 82%, estando de acordo com a eficiência estimada a partir das ferramentas de otimização de resposta. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na eficiência do processo ao aplicar o biofloculante nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,3 mg/mL. No entanto, foi observada redução da eficiência na concentração de 0,4 mg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Validação das condições de otimização: resultados das atividades floculantes utilizando diferentes concentrações do biofloculante.

Concentração (mg/mL)	Atividade Floculante (%)
0,2	87,19% \pm 2,61%
0,3	84,42% \pm 3,14%
0,4	74,62% \pm 5,85%

Fonte: Elaborada pela autora.

A determinação da concentração do biofloculante no sistema é tida como fator crítico do processo de floculação, pois além de auxiliar na redução de custos, também condiciona a eficiência do tratamento. Quando em quantidade insuficiente, os mecanismos do biofloculante que promovem a ligação entre as partículas podem não ocorrer de maneira eficiente, mas em

excesso, há aumento das forças repulsivas no meio, inibindo a sedimentação (GONG *et al.*, 2008; ZULKEFLEE *et al.*, 2012). O restabelecimento dessa condição de estabilidade pode ocorrer pela adsorção do biofloculante à superfície dos coloides, bloqueando os espaços disponíveis para estabelecimento de ligações com outras partículas (COSA e OKOH, 2014). Esses aspectos podem estar associados à diminuição da eficiência do biofloculante sintetizado por *Psychrobacter sp.* quando aplicado na concentração de 0,4 mg/mL.

Considerando a eficiência e economicidade do processo, a concentração de 0,2 mg/mL foi adotada como padrão nos ensaios subsequentes. Essa concentração é similar à reportada em diferentes estudos que avaliaram o potencial de floculação de outras espécies bacterianas, como por Cosa e Okah (2014) que obtiveram 98,3% de floculação utilizando biofloculante sintetizado por bactérias dos gêneros *Halobacillus* e *Oceanobacillus*; Agunbiade *et al.*, (2018) que notaram 95% de eficiência usando biofloculante de *Streptomyces platensis*; e Tsilo *et al.*, (2022) que observaram floculação máxima de 80% ao aplicarem concentração de 0,4 mg/mL de biofloculante produzido por *Pichia kudriavzevii*.

5.4. Caracterização do biofloculante

A análise química do biofloculante evidenciou a predominância de polissacarídeos e lipídios (Tabela 3). De acordo com as frações caracterizadas, a proporção de polissacarídeos, lipídios e proteínas foi de 46,52%, 34,17% e 19,31%, respectivamente. Esses resultados diferem dos comumente reportados na literatura dado que, quando mapeado, o conteúdo de lipídios raramente é destacado como um componente relevante em termos de proporção. Assim como observado no biofloculante de *Psychrobacter sp.*, diferentes estudos destacam a maior proporção de polissacarídeos em comparação às demais frações mapeadas (OKAIYETO *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2020; DING *et al.*, 2021; XIA *et al.*, 2022).

O biofloculante sintetizado *Diaphorobacter nitroreducens*, por exemplo, foi caracterizado como contendo 73,9% de polissacarídeos e 24,1% de proteínas (ZHONG *et al.*, 2020), enquanto o de *Bacillus subtilis* apresentou 77,2% de polissacarídeos e 14,8% de proteínas (XIA *et al.*, 2022). Cabe ressaltar que a análise química do biofloculante de *Psychrobacter sp.* foi realizada com a molécula não purificada. Dessa forma, a inclusão de etapa de purificação pode resultar em índices de polissacarídeos e proteínas mais próximos dos reportados na literatura.

Tabela 3 – Caracterização química do biofloculante produzido por *Psychrobacter* sp. dado em miligramas da fração caracterizada por grama de biofloculante.

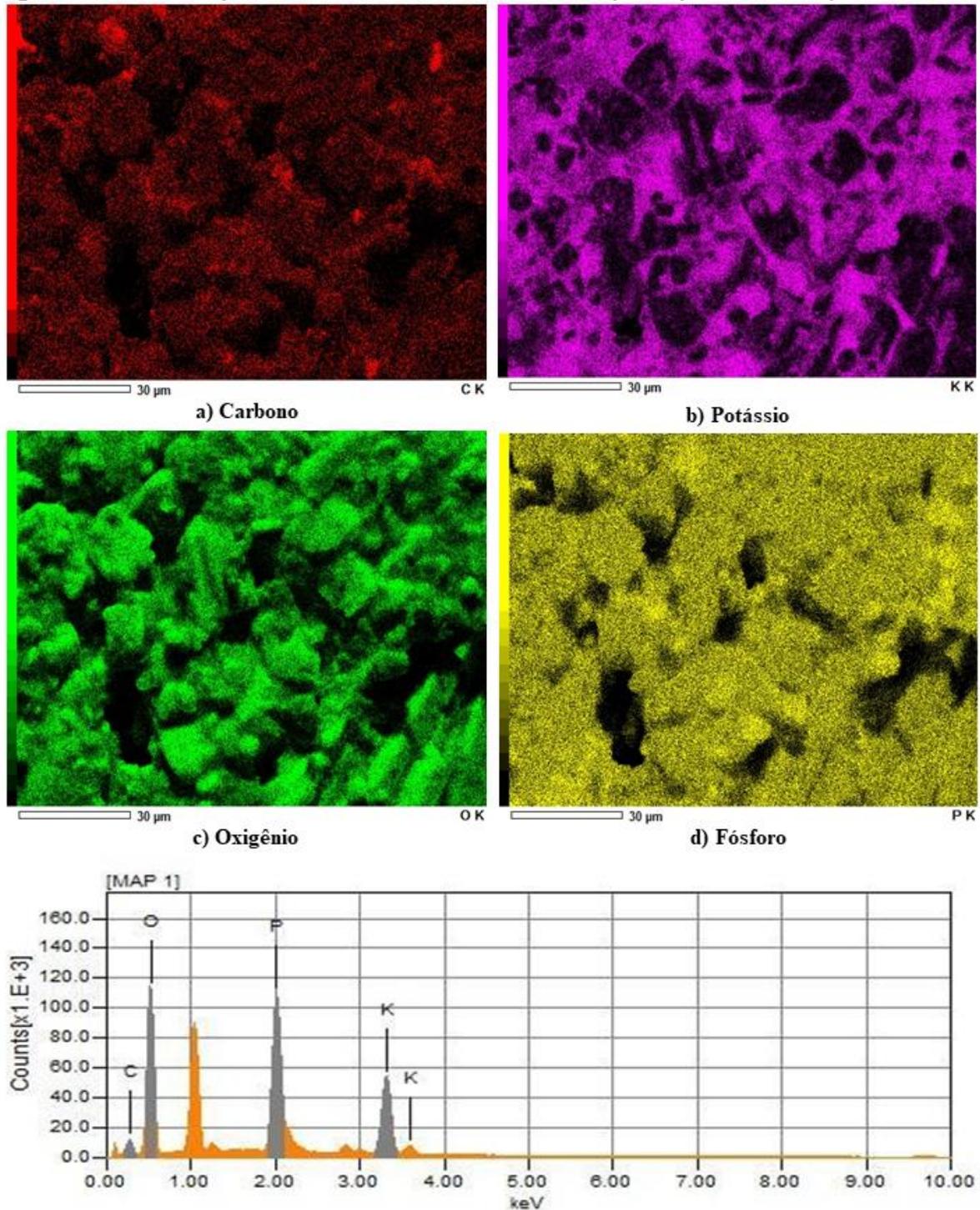
Composto	Quantidade (mg/g)
Açúcares totais	246,43 ± 27,20
<i>Açúcares não redutores</i>	133,05 ± 6,63
<i>Açúcares redutores</i>	113,38 ± 5,95
Lipídios	181,00 ± 71,90
Proteínas	102,31 ± 9,37

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise elementar qualitativa da molécula apontou presença de O, C, P e K na proporção de massa de 59,9%, 18,6%, 12,54% e 9,01%, respectivamente (Figura 10). Enquanto os constituintes do meio de produção do biofloculante podem ter influenciado os conteúdos de P e K, os conteúdos de C e O já foram apontados como relevantes, pois são considerados a base estrutural de alguns biofloculantes (NTSANGANI *et al.*, 2017; ALIAS *et al.*, 2022).

A predominância de C e O também foi verificada nos biofloculantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* (PATHAK *et al.*, 2017), *Streptomyces platensis* (AGUNBIADE *et al.*, 2018), *Bacillus salmalaya* (TAWILA *et al.*, 2019) e *Bacillus* spp. (ALIAS *et al.*, 2022).

Figura 10 – Análise química do biofloculante sintetizado por *Psychrobacter* sp.

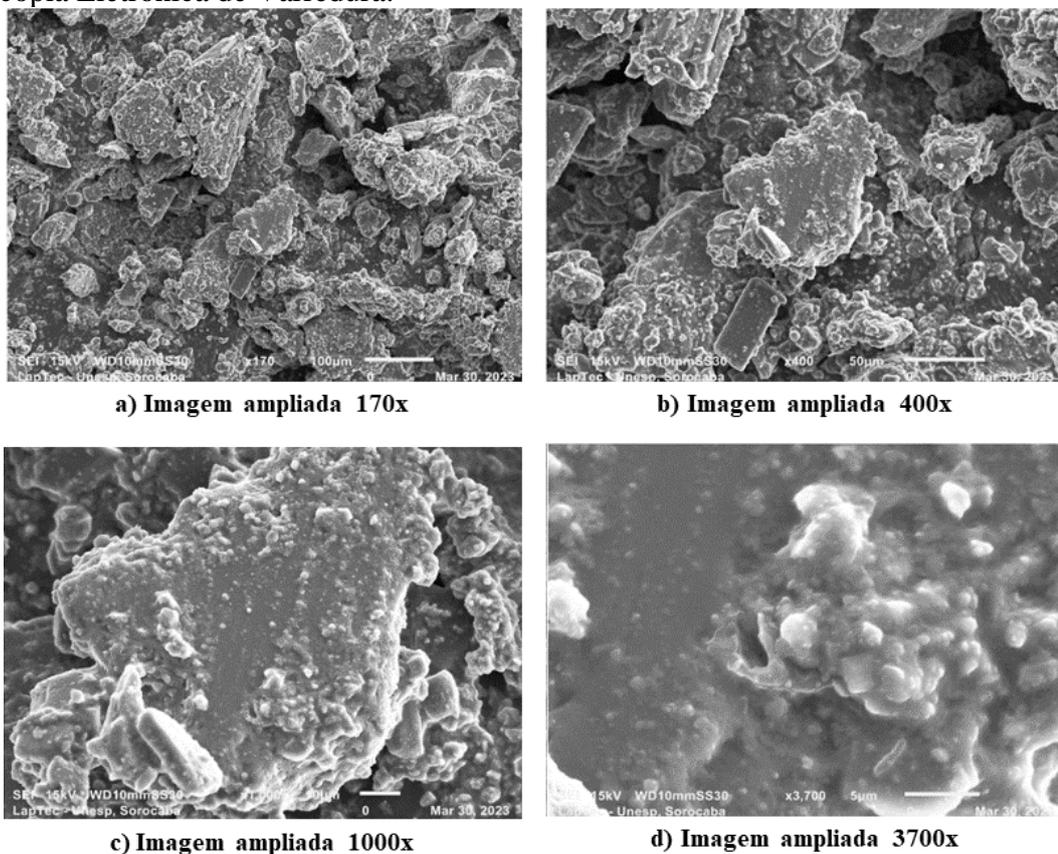


Fonte: Elaborada pela autora.

Pela análise dos aspectos morfológicos superficiais, foi possível identificar a presença de microestruturas em forma de grânulos com dimensões variando de aproximadamente 5 µm até aproximadamente 100 µm (Figura 11). As microestruturas do biofloculante de *Psychrobacter* sp. são distintas das observadas para os biofloculantes de *Serratia marcescens*

(KURNIAWAN *et al.*, 2022) e *Bacillus megaterium* (SELEPE *et al.*, 2022), mas apresenta similaridades com a morfologia da biomolécula sintetizada pela levedura *Pichia kudriavzevii* (TSILO *et al.*, 2022). As diferenças observadas na microscopia do biofloculante de *Psychrobacter* sp. quando comparada com a de outras espécies pode ser decorrente de diferentes métodos de preparo da amostra, como a adição de etapa prévia de liofilização ou apenas moagem do biofloculante. Ainda, de acordo com Kanamarlapudi e Muddada (2017), o método de extração utilizado pode alterar a estrutura do biofloculante.

Figura 11 – Imagem do biofloculante sintetizado por *Psychrobacter* sp. obtida a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura.

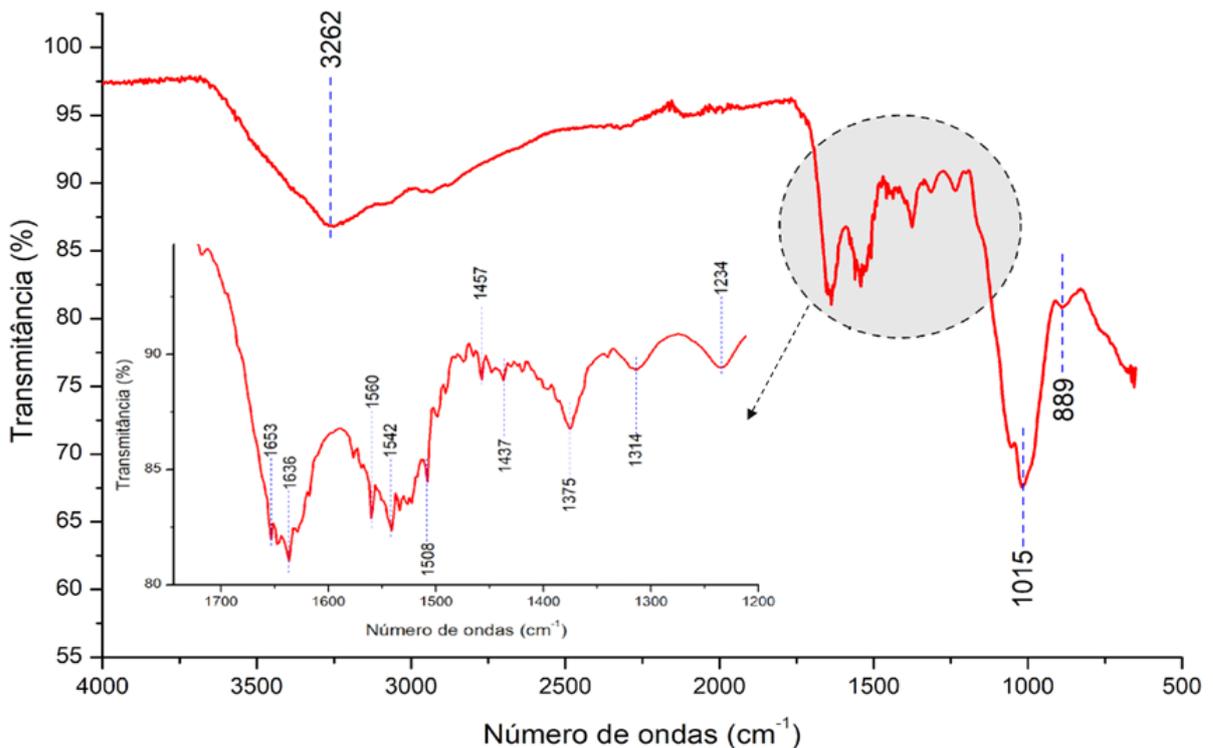


Fonte: Elaborada pela autora.

Os grupos funcionais presentes no biofloculante foram observados a partir da avaliação do espectro de Infravermelho (Figura 12). Essa análise se faz relevante à medida em que os espaços disponíveis para adsorção das partículas no meio dependem da quantidade e do tipo de grupos funcionais ao longo da molécula (MALIEHE *et al.*, 2020). Foram identificadas 12 bandas de absorção, indicativo de que a molécula em análise é complexa (NANDIYANTO e RAGADHITA, 2019). Essa característica pode sugerir que o biofloculante não se trata de um composto de pequena massa molecular (COATES, 2000).

A presença dos grupos funcionais amina e hidroxila pode ser associada à ampla banda de absorção em 3262 cm^{-1} (MUTHULAKSHMI *et al.*, 2023). Os estiramentos moderados nas regiões entre 1600 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} e próxima a 800 cm^{-1} reforçam a presença do grupo hidroxila (COATES, 2000). Estiramentos acentuados em 1653 cm^{-1} e 1636 cm^{-1} sugerem a presença de grupos funcionais amida ou carboxila (NANDIYANTO e RAGADHITA, 2019). A presença de carboxila é ressaltada à medida em que a banda em 1375 cm^{-1} pode sugerir um estiramento simétrico ou assimétrico de grupo carboxílico (COSA *et al.*, 2013). As bandas em 1015 cm^{-1} e 889 cm^{-1} podem estar associadas ao conteúdo de açúcares na molécula, dado que estiramentos entre 1100 cm^{-1} e 800 cm^{-1} são característicos de compostos derivados de açúcares (COSA *et al.*, 2013; NTSANGANI *et al.*, 2017).

Figura 12 – Espectro infravermelho do biofloculante sintetizado por *Psychrobacter* sp.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os grupos carboxila e hidroxila estão entre os principais elementos estruturais associados ao potencial floculante (NTSANGANI *et al.*, 2017). Enquanto a presença da hidroxila facilita a solubilização do biofloculante em água, a carboxila favorece a ligação da molécula com cátions divalentes, como Ca^{2+} , de forma a permitir a adsorção do biofloculante às partículas e aumentando a taxa com que os flocos são formados (AGUNBIADE *et al.*, 2022). O espectro obtido neste estudo apresenta similaridades com os reportados por Maliehe *et al.*,

(2020) e Selepe *et al.*, (2022), sendo que os biofloculantes foram caracterizados como glicoproteínas pelos autores.

5.5. Ensaio no lodo de esgoto

5.5.1. Caracterização do lodo de esgoto

No sistema de tratamento no qual as amostras de lodo foram coletadas, o tratamento secundário é composto por reator anaeróbio de fluxo ascendente seguido de tanque de aeração. As amostras foram provenientes de uma única coleta realizada em abril de 2022, tendo sido o lodo anaeróbio retirado do leito do reator de fluxo ascendente e o lodo aeróbio, da linha de recirculação do decantador secundário após o tanque de aeração.

Os resultados da caracterização das amostras de lodos em termos de pH, teor de umidade, sólidos totais (ST), sólidos fixos (SF), sólidos voláteis (SV), sólidos sedimentáveis (SS) e conteúdo de carboidratos e proteínas nas substâncias poliméricas extracelulares (SPE) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização inicial de amostras de lodo ativado e lodo anaeróbio.

Parâmetros	Lodo aeróbio	Lodo anaeróbio
pH	7,39 ± 0,22	7,06 ± 0,10
Teor umidade (%)	98,56 ± 0,02	94,43 ± 0,35
SS (mL/L)	560 ± 10,61	110 ± 4,95
ST (g/L)	13,60 ± 0,07	53,87 ± 2,07
SF (g/L)	5,40 ± 0,28	22,50 ± 0,71
SV (g/L)	8,20 ± 0,28	31,37 ± 1,37
SPE _c (g/L)	1,55 ± 0,23	0,63 ± 0,15
SPE _p (g/L)	1,00 ± 0,07	1,12 ± 0,02
Turbidez (DO ₅₅₀)	1,331	2,655
Tempo de filtração (min)	21,0	> 30

SS: Sólidos sedimentáveis. ST: Sólidos totais. SF: Sólidos fixos. SV: Sólidos voláteis. SPE_c: Substâncias Poliméricas Extracelulares – conteúdo de carboidratos. SPE_p: Substâncias Poliméricas Extracelulares – conteúdo de proteínas. DO₅₅₀: Densidade Óptica medida em comprimento de onda de 550 nm. Fonte: Elaborada pela autora.

A análise dos sólidos sedimentáveis evidenciou a diferença de turbidez das amostras (Figura 13). Após 1 hora em repouso, foi possível verificar a formação de espessa camada de sólidos no fundo da proveta contendo lodo aeróbio. Ainda assim, a camada clarificada apresentou elevada turbidez, aspecto decorrente da quantidade de sólidos suspensos no meio. Para o lodo anaeróbio, a camada sedimentada foi de difícil visualização, sendo este sistema marcado pela não observação de camada clarificada. Esse aspecto pode ser indicativo de uma maior estabilidade no sistema devido à predominância de forças repulsivas, dificultando a sedimentação de partículas finas e coloidais.

Figura 13 – Comparativo de sólidos sedimentáveis em amostra de lodo anaeróbio e lodo aeróbio.



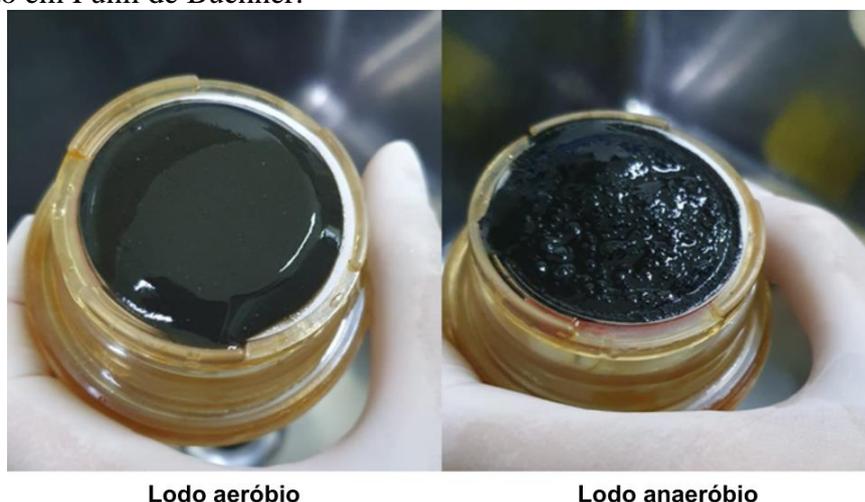
Fonte: Elaborada pela autora.

A diferença no conteúdo de SPE nas amostras pode ser associado às especificidades das comunidades microbianas em cada sistema. Houghton *et al.*, (2001) ressaltam que bactérias anaeróbias provavelmente utilizam essas substâncias como substrato, impulsionadas pelas restrições energéticas de seu metabolismo, resultando na diminuição das moléculas no meio. Sheng *et al.*, (2010) reforçam a ideia ao destacar que a escassez de oxigênio em sistemas de lodo ativado suprime a produção desses metabólitos, levando à maior desintegração dos flocos. Em contrapartida, níveis elevados de oxigenação estão associados a um aumento no conteúdo de carboidratos nessas moléculas.

A fim de avaliar o potencial de desaguamento, as amostras de lodo aeróbio e lodo anaeróbio foram avaliadas quanto a capacidade de remoção de água a partir do ensaio de tempo de filtração, sem terem sido submetidas previamente a qualquer etapa de condicionamento. À pressão constante, as duas amostras apresentaram baixíssima filtrabilidade. Ainda que tenha sido observada rápida obstrução dos poros dos filtros, esse fenômeno foi acelerado para o lodo anaeróbio, ocorrendo logo nos primeiros segundos de ensaio.

A análise do tempo de filtração do lodo aeróbio foi satisfatória, sendo registrados 21 minutos para filtração de 15 mL de amostra, metade do volume de trabalho. Contudo, o ensaio com o lodo anaeróbio foi dificultado pelas características do resíduo. Após 30 minutos, somente 3,3 mL de um total de 30 mL havia sido eficientemente filtrado. Dessa maneira, não foi possível determinar com precisão o tempo de filtração do lodo anaeróbio a partir de ensaios de bancada, sendo considerados neste estudo, acima de 30 minutos. Após a obstrução dos poros, os ensaios foram suspensos e o volume não filtrado foi removido do funil. Os filtros utilizados e os sólidos retidos após o fim dos ensaios são apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Sólidos de lodo aeróbio e lodo anaeróbio retidos no filtro após testes de desaguamento em Funil de Büchner.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o lodo anaeróbio, a rápida obstrução do filtro durante os ensaios é indicativa de que a concentração de partículas em suspensão tenha sido aspecto crítico quanto à dificuldade de desaguamento. Essa perspectiva é reforçada pelos resultados do ensaio de tempo de filtração, dado que a quantidade de sólidos suspensos é um dos principais fatores de interferência sobre os resultados (APHA, 2005), bem como a elevada quantidade de sólidos totais no resíduo e os pontos observados durante a caracterização de sólidos sedimentáveis. Segundo Cao *et al.*, (2020), quanto maior a proporção de partículas suspensas, maior a viscosidade do lodo, condição que reduz a permeabilidade da torta e afeta negativamente sua filtrabilidade e desaguamento. De acordo com Mowla *et al.*, (2013), a resistência à filtração está diretamente relacionada ao grau de dispersão das partículas finas e coloidais no meio, dada a influência dessas sobre a obstrução dos meios filtrantes.

Para o lodo aeróbio, a formação de camada de aspecto gelatinoso sobre o filtro pode ser indicativa de que a maior concentração de SPE foi aspecto decisivo para a baixa filtrabilidade do resíduo. Apesar dessas substâncias serem essenciais para a manutenção da integridade dos flocos, Wu *et al.*, (2020) observaram que quando em excesso, podem acarretar na redução da capacidade de desaguamento devido ao aumento das forças repulsivas no sistema, além de contribuírem para a obstrução da passagem de água pelos meios filtrantes por meio da formação de camada gelatinosa.

A partir dos resultados dos ensaios de tempo de filtração, a dificuldade de separação entre as fases sólida e líquida são ressaltadas, evidenciando a necessidade de etapa de condicionamento dessas amostras.

5.5.2. Ensaio de floculação no lodo de esgoto

Os resultados de floculação das amostras de lodo utilizando floculante comercial caracterizado como polímero catiônico (CPAM) e o biofloculante são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparativo da atividade floculante em lodo aeróbio e lodo anaeróbio utilizando floculante comercial (CPAM), biofloculante e biofloculante com CaCl₂.

Lodo	CPAM (%)	Biofloculante + CaCl₂ (%)
Aeróbio	96,32 ± 0,60	93,96 ± 1,13
Anaeróbio	97,72 ± 0,12	71,53 ± 1,37

Fonte: Elaborada pela autora.

A aplicação do polímero catiônico usualmente utilizado no tratamento de esgoto apresentou elevados índices de floculação, com eficiência similar tanto para o lodo aeróbio quanto anaeróbio. Os resultados obtidos neste estudo foram similares ou melhores aos reportados na literatura acerca do desempenho de diferentes tipos de coagulantes e floculantes comerciais quando utilizados no tratamento de diferentes lodos de esgoto (Tabela 6).

Tabela 6 – Eficiência de floculantes e coagulantes comerciais na redução da turbidez de diferentes tipos de amostras.

Aditivo	Amostra	Concentração (mg/L)	Redução Turbidez	Referência
PAC	Lodo aeróbio	120	71%	Cainglet <i>et al.</i> , (2020)
Poliamina	Lodo aeróbio	20	71%	Cainglet <i>et al.</i> , (2020)
PAC	Lodo anaeróbio	175	99%	Cainglet <i>et al.</i> , (2023)
Poliamina	Lodo anaeróbio	60	92%	Cainglet <i>et al.</i> , (2023)
PAM	Lodo aeróbio	5	60%	Piaskowski <i>et al.</i> , (2023)
PAM	Lodo aeróbio	100	64%	Piaskowski <i>et al.</i> , (2023)
CPAM	Lodo aeróbio	200	96%	Este estudo
CPAM	Lodo anaeróbio	200	98%	Este estudo

PAC: Cloreto de polialumínio. PAM: Polímero de acrilamida; CPAM: Polímero de acrilamida catiônico
 Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados observados quando da aplicação do biofloculante acompanhado de CaCl_2 também foram satisfatórios, embora sua eficiência tenha sido consideravelmente menor no lodo anaeróbio. Essa diferença pode estar associada à concentração de sólidos suspensos em cada uma das amostras. Tendo em vista o excesso de sólidos não sedimentáveis na amostra de lodo anaeróbio, uma concentração de biofloculante e CaCl_2 maior do que a utilizada no tratamento do lodo aeróbio seria necessária para a efetiva desestabilização do sistema e a formação de flocos. Os resultados obtidos neste estudo foram similares ou melhores do que os reportados na literatura acerca da aplicação de biofloculantes no tratamento de esgoto (Tabela 7).

Tabela 7 – Microrganismos produtores de biofloculantes e eficiência quanto a redução da turbidez quando aplicados ao tratamento de diferentes efluentes.

Microrganismo	Amostra	Cátion	Redução turbidez (%)	Referências
<i>Serratia ficaria</i>	Efluente agroindustrial – cervejaria	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	91,8	Gong <i>et al.</i> , 2008
<i>Serratia ficaria</i>	Efluente agroindustrial – processamento de carne	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	93,7	Gong <i>et al.</i> , 2008
<i>Serratia ficaria</i>	Efluente agroindustrial – molho de soja	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	93,7	Gong <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Efluentes de suinocultura	Ca ²⁺	94,8	Guo <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus elgii</i>	Efluente sanitário	Ca ²⁺	83,0	Li <i>et al.</i> , 2013
<i>Arthrobacter sp.</i>	Efluente sanitário	Ca ²⁺	33,0	Li <i>et al.</i> , 2014
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Efluente industrial	Ca ²⁺	81,4	Chen <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	Efluente sanitário	Ca ²⁺	90,0	Vimala, 2019
<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	Efluente industrial	Ca ²⁺	96,2	Zhong <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus sp.</i>	Efluente sanitário	Al ³⁺	24,7	Gupta <i>et al.</i> , 2023

Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda que a análise da conformação dessas estruturas não seja feita a olho nu, sendo usualmente utilizados métodos como dispersão a laser, microscopia eletrônica por varredura e microscopia estática na determinação das características dos aglomerados (FAN *et al.*, 2020), outra diferença verificada entre os tratamentos foi acerca do tamanho e formato dos aglomerados formados após a aplicação dos aditivos (Figura 15).

Figura 15 – Ensaio de floculação e comparativo de biofloculante e coagulante comercial na formação de flocos no lodo de esgoto.



a) Amostra controle: lodo aeróbio sem aditivos



b) Tratamento 1: lodo aeróbio + biofloculante + CaCl₂



c) Tratamento 2: lodo aeróbio + floculante comercial

Fonte: Elaborada pela autora.

A aplicação do floculante comercial catiônico resultou na formação de flocos grandes e com limites bem definidos. Os agregados foram considerados resistentes, dado que após sua formação, perturbações decorrentes da manipulação do frasco não alteraram a cor da amostra tratada, indicativo de que o floco manteve a conformação. Em relação à aplicação do biofloculante acompanhado de CaCl₂, a rápida sedimentação das partículas suspensas evidenciou a eficiência do conjunto na redução da turbidez do meio. Entretanto, não foi observada a formação de flocos, mas de pequenos agregados dispersos no fundo do frasco. Nesse sentido, os agregados formados a partir da aplicação do biofloculante nas amostras de

lodo de esgoto foram similares aos verificados quando de sua aplicação em suspensão caulim (Figura 16).

Figura 16 – Formação de agregados de partículas quando da aplicação do biofloculante em suspensão caulim.



a) Sólidos sedimentados sem formação de agregados

b) Sólidos sedimentados com formação de agregados

Fonte: Elaborada pela autora.

A formação e estabilidade dos flocos são condicionantes de uma eficiente separação entre as fases sólida e líquida durante o desaguamento. Contudo, conforme discutido por Marques e Filho (2016), os mecanismos envolvidos na formação dos aglomerados e em seu rompimento ainda não estão totalmente elucidados, apesar da diversidade de modelos matemáticos que se propõem a fazê-lo. Ainda de acordo com os autores, algumas condições podem levar ao rompimento dos flocos formados de maneira irreversível, gerando uma turbidez residual no meio. Dessa forma, o tipo de coagulante utilizado, a concentração e o gradiente de velocidade de agitação foram fatores associados ao rompimento irreversível dos flocos.

A relevância da velocidade de agitação é também ressaltada por Hyrycz *et al.*, (2022), à medida em que promove a dispersão do floculante no meio e auxilia na ocorrência de colisões entre as partículas e o aditivo. De acordo com Vajihinejad e Soares (2018), baixas velocidades de mistura são preferíveis por geralmente resultarem na formação de flocos maiores, mas o uso de velocidades excessivamente baixas tende a dispersar os sólidos e o floculante de maneira não uniforme. Dessa maneira, a velocidade é apontada como parâmetro que deve ser otimizado de acordo com as concentrações de sólidos, o tipo de floculante usado e seus aspectos

estruturais. Todavia, a velocidade de agitação não foi um dos parâmetros otimizados no presente estudo.

Os efeitos do tipo de coagulante sobre o tratamento dizem respeito aos diferentes mecanismos de ação possíveis, que por sua vez influenciam no formato, densidade e resistência dos flocos formados (KURNIAWAN *et al.*, 2020). Para os aditivos derivados de poliacrilamida, que é o caso do CPAM, os mecanismos de adsorção típicos são ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou ligações entre partículas (LAPOINTE e BARBEAU, 2020). Este último, por exemplo, foi apontado como aspecto principal da formação de flocos compactos, resistentes e de grandes dimensões quando do uso do floculante comercial Praestol (NOUMORADI *et al.*, 2016). Acerca disso, a elevada massa molecular do floculante comercial também é decisiva para os resultados obtidos à medida em que quando o principal mecanismo de floculação é a ligação entre partículas, quanto maior a massa molecular, maior a cadeia polimérica, resultando em mais pontos de adsorção e conseqüentemente, melhor atividade floculante e maiores as dimensões dos flocos formados (ZHAO *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021).

De acordo com Jiang (2015), flocos gerados pelo mecanismo de formação de pontes entre partículas apresentam maior resistência do que os gerados a partir dos mecanismos de neutralização de cargas e varredura. No entanto, o mecanismo de varredura resulta em flocos de maiores dimensões. Segundo Koul *et al.*, (2022), os agregados formados por varredura apresentam menores proporções, boa capacidade de sedimentação, mas lenta taxa de formação de flocos e facilmente rompíveis.

Tendo em vista as características dos flocos formados após o tratamento do lodo com biofloculante e coagulante comercial, é possível que as diferenças observadas sejam decorrentes de mecanismos de ação distintos. Dessa forma, o monitoramento da variação do potencial zeta, que fornece medida da magnitude das forças atrativas ou repulsivas atuantes no sistema, e da distribuição do tamanho das partículas antes e após tratamento, bem como a análise de sua massa molecular, são etapas necessárias em estudos futuros a fim de elucidar os mecanismos envolvidos no processo de floculação promovido pelo uso do biofloculante sintetizado por *Psychrobacter* sp.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento deste estudo, foi possível concluir que:

- *Psychrobacter* sp., *Serratia nematodiphila*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Kocuria* sp. são bactérias produtoras de biofloculantes que apresentaram resultados positivos quando aplicados em processos de floculação em suspensão caulim.
- A partir das condições de cultivo adotadas, o biofloculante de *Psychrobacter* sp. foi o que apresentou melhores resultados de floculação, com menores variações de eficiência ao longo do tempo. Foi observado pico de eficiência às 48 horas de incubação, atingindo 56,91% de floculação sob condições não otimizadas.
- A temperatura de incubação, o pH inicial do meio e o tamanho do inóculo não foram fatores significativos para os resultados de atividade floculante de *Psychrobacter* sp., de forma que a eficiência do biofloculante foi condicionada outros fatores não mapeados neste estudo.
- O biofloculante sintetizado por *Psychrobacter* sp. foi extraído e caracterizado em termos de polissacarídeos, lipídios e proteínas, com proporções de 46,52%, 34,17% e 19,31%, respectivamente. A análise dos grupos funcionais sugeriu presença de aminas, hidroxilas e carboxilas, responsáveis pelo potencial floculante da molécula. O perfil morfológico apresentou grânulos com dimensões variando de aproximadamente 5 µm até 100 µm. A análise elementar qualitativa da macromolécula indicou uma proporção em massa de O, C, P e K de 59,9%, 18,6%, 12,54% e 9,01%, respectivamente.
- A aplicação do biofloculante no tratamento do lodo de esgoto resultou em 93% de floculação no lodo aeróbio e 72% no lodo anaeróbio. A redução de eficiência no lodo anaeróbio pode estar associada ao excesso de partículas suspensas neste meio, de forma que uma maior concentração de biofloculante pode ser necessária para a promover a desestabilização do sistema. Para o lodo aeróbio, a eficiência obtida foi similar à de polímero catiônico comercialmente utilizado no tratamento de esgotos.

- Em estudos futuros, a análise da massa molecular do biofloculante e o monitoramento da variação do potencial zeta e da distribuição do tamanho das partículas ao longo do tratamento são etapas que devem ser adotadas para auxiliar na determinação dos mecanismos de floculação da molécula. Ainda, otimização do cultivo de *Psychrobacter* sp. considerando fatores não analisados neste estudo, como período de incubação, velocidade de agitação e composição do meio de cultivo, pode ser estratégia promissora para o aumento da eficiência de floculação da macromolécula.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELNABY, H. M. *et al.* Characterization and bioremediation potential of marine *Psychrobacter* species. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 193–203, 2016. DOI: 10.1016/j.ejar.2016.04.003
- AFRIDI, M. S. *et al.* Biotechnological approaches in agriculture and environmental management - bacterium *Kocuria rhizophila* 14ASP as heavy metal and salt- tolerant plant growth- promoting strain. **Biologia**, v. 76, p. 3091–3105, 2021. DOI: 10.1007/s11756-021-00826-6
- AGUNBIADE, M. *et al.* Bioflocculant production from *Streptomyces platensis* and its potential for river and waste water treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 731–741, 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.02.013
- AHMAD, A. *et al.* Plant-based versus metal-based coagulants in aquaculture wastewater treatment: Effect of mass ratio and settling time. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, 2021. DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.102269
- AKBARI, E. *et al.* A novel biosurfactant producing *Kocuria rosea* ABR6 as potential strain in oil sludge recovery and lubrication. **AMB Expr**, v. 131, 2021. DOI: 10.1186/s13568-021-01283-9
- ALIAS, J. *et al.* Properties of bioflocculant-producing bacteria for high flocculating activity efficiency. **Environmental Technology & Innovation**, v. 27, 2022. DOI: 10.1016/j.eti.2022.102529.
- ALMUBADDAL, F. *et al.* Performance optimization of coagulation/flocculation in the treatment of wastewater from a polyvinyl chloride plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 431–438, 2009. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.03.121
- AMRAN, A. H. *et al.* Effectiveness of Natural Coagulant in Coagulation Process: A review. **International Journal of Engineering and Technology**, v. 7, p. 34-37, 2018.
- ANG, W. L.; MOHAMMAD, A. W. State of the art and sustainability of natural coagulants in water and wastewater treatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 262, 2020. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.121267
- ANJUM, M. *et al.* Wastewater sludge stabilization using pre-treatment methods. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 615–632, 2016. DOI: 10.1016/j.psep.2016.05.022
- APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 755–781, 2008. DOI: 10.1016/j.peccs.2008.06.002
- ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 219–222, 1995. DOI: 10.1007/bf00704653

AWOLUSI, O. O. *et al.* Marine Actinobacteria Bioflocculant: A Storehouse of Unique Biotechnological Resources for Wastewater Treatment and Other Applications. **Applied Sciences**, v. 10, p. 7671, 2020. DOI: 10.3390/app10217671

AYANGBENRO, A. S. *et al.* Bioflocculant production and heavy metal sorption by metal resistant bacterial isolates from gold mining soil. **Chemosphere**, v. 231, p. 113-120, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.092

BABU, P. *et al.* Extremophiles and Their Applications in Medical Processes. **SpringerBriefs Microbiology**, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-12808-5

BARTIKO, D.; JULIO, M. D. Construção e emprego de diagramas de coagulação como ferramenta para o monitoramento contínuo da floculação em águas de abastecimento. **Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v.10, 2015. DOI:10.4136/ambi-agua.1239

BASAK, P. *et al.* Exploration of extremophiles genomes through gene study for hidden biotechnological and future potential. **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**, p. 315–325, 2020. DOI: 10.1016/b978-0-12-818322-9.00024-1

BEAINO, M. E. *et al.* Sphingomonas Paucimobilis-Related Bone and Soft-Tissue Infections: A Systematic Review. **International Journal of Infectious Diseases**, 2018. DOI: 10.1016/j.ijid.2018.09.021

BERMANEC, V. *et al.* Novel arsenic hyper-resistant bacteria from an extreme environment, Crven Dol mine, Allchar, North Macedonia. **Journal of Hazardous Materials**, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123437

BEZAWADA, J. *et al.* Production of extracellular polymeric substances (SPE) by *Serratia* sp.1 using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the SPE produced. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 83–91, 2013. DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.04.039

BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v. 41, n. 11, p. 2301–2324, 2007. DOI: 10.1016/j.watres.2007.03.012

BOWMAN, J. P. The Genus *Psychrobacter*. **The Prokaryotes**, p. 920–930. DOI: 10.1007/0-387-30746-x_35

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

CABRERA, M.A; BLAMEY, J. M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. **Biological Research**, v. 51, 2018. DOI: 10.1186/s40659-018-0186-3

CAI, Y. *et al.* Non-surface Attached Bacterial Aggregates: A Ubiquitous Third Lifestyle. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.557035.

CAINGLET, A. *et al.* Organic polyelectrolytes as the sole precipitation agent in municipal wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 271, 2020. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111002

- CAINGLET A. *et al.* The influence of coagulant type on the biological treatment of sewage sludge, **Science of The Total Environment**, v. 869, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.161706.
- CAO, B. *et al.* Enhanced technology based for sewage sludge deep dewatering: A critical review. **Water Research**, v. 189, 2021. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116650.
- CASPAR, Y. *et al.* *Psychrobacter* arenosus bacteremia after blood transfusion, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, 2013. DOI: 10.3201/eid1907.121599.
- CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate analysis: a practical approach/ monograph**. Oxford; New York: Ilr Press, 2003.
- CHENG, Z. *et al.* The effect of bioleaching on sewage sludge pyrolysis. **Waste Management**, v. 48, p. 383–388, 2016. DOI: 10.1016/j.wasman.2015.10.002
- CHEN, H. *et al.* Removal of cadmium by bioflocculant produced by *Stenotrophomonas maltophilia* using phenol-containing wastewater. **Chemosphere**, v. 155, p. 163–169, 2016. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.044
- CHEN, Z. *et al.* Characterization of a novel bioflocculant from a marine bacterium and its application in dye wastewater treatment. **BMC Biotechnology**, v. 17, 2017. DOI: 10.1186/s12896-017-0404-z
- CHERIFI, M. *et al.* Initial Water Content and Temperature Effects on Electrokinetic Removal of Aluminium in Drinking Water Sludge. **Physics Procedia**, v. 2, p. 1021–1030, 2009. DOI: 10.1016/j.phpro.2009.11.058.
- CHOUCHANE, H. *et al.* A novel thermally stable heteropolysaccharide-based bioflocculant from hydrocarbonoclastic strain *Kocuria rosea* BU22S and its application in dye removal. **Environmental Technology**, v. 39, p. 859–872, 2017. DOI: 10.1080/09593330.2017.1313886
- CIOK, A.; DZIEWIT, L. Exploring the genome of Arctic *Psychrobacter* sp. DAB_AL32B and construction of novel *Psychrobacter*-specific cloning vectors of an increased carrying capacity. **Archives of Microbiology**, 2018. DOI: 10.1007/s00203-018-1595-y
- COSA, S. *et al.* Characterization and flocculation efficiency of a bioflocculant produced by a marine *Halobacillus*. **Environmental Technology**, v. 34, p. 2671–2679, 2013. DOI: 10.1080/09593330.2013.786104
- COSA, S.; OKOH, A. Bioflocculant Production by a Consortium of Two Bacterial Species and Its Potential Application in Industrial Wastewater and River Water Treatment. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 23, p. 689-696, 2014.
- DING, R. *et al.* Rapid Production of a Novel Al(III) Dependent Bioflocculant Isolated From *Raoultella ornithinolytica* 160-1 and Its Application Combined With Inorganic Salts. **Frontiers in Microbiology**, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.622365
- DORADO-MORALES, P. *et al.* A highly diverse, desert-like microbial biocenosis on solar panels in a Mediterranean city. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. DOI: 10.1038/srep29235.

DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77–90, 2020. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.03.013. 2

DOTTO, J. *et al.* Performance of different coagulants in the coagulation/flocculation process of textile wastewater. **Journal of Cleaner Production**, 2018. DOI:10.1016/j.jclepro.2018.10.112

EL-SAYED, M.R. *et al.* Detection and description of a novel *Psychrobacter* glacincola infection in some Red Sea marine fishes in Hurghada, Egypt. **BMC Veterinary Research**, 2023. DOI: 10.1186/s12917-022-03542-8

EXLEY, C. Aluminum Should Now Be Considered a Primary Etiological Factor in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v. 1, p. 23–25, 2017. DOI: 10.3233/adr-170010.

FAJAR, R. A. *et al.* Application of fungi as bioflocculant for mine drainage treatment with extra high total suspended solid. **2nd international conference on earth science, mineral, and energy**, 2020. DOI: 10.1063/5.0007421

FAN, Y. *et al.* Characterisation of floc size, effective density and sedimentation under various flocculation mechanisms. *Water Science and Technology*, v. 82, p. 1261–1271, 2020. DOI: 10.2166/wst.2020.385

FARD, M. B. *et al.* Utilization of Alyssum mucilage as a natural coagulant in oily-saline wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, 2021. DOI: 10.1016/j.jwpe.2020.101763.

FENG, L. *et al.* Characteristics of exopolysaccharides produced by isolates from natural bioflocculant of *Ruditapes philippinarum* conglutination mud. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1068922

FIRDU, Z. *et al.* Characterization of faba bean (*Vicia faba* L.) rhizosphere associating rhizobacteria against *Botrytis fabae* AAUBF-12 and their plant growth-promoting properties. **Heliyon** 8, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e08861

FITZPATRICK, C. S. B. *et al.* Temperature effects on flocculation, using different coagulants. **Water Science and Technology**, v. 50, p. 171–175, 2004. DOI: 10.2166/wst.2004.0710

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (SPEs) - Part I: Structural and ecological aspects. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 1–8, 2001. DOI: 10.2166/wst.2001.0326

FOUILLAUD, M.; DUFOSSÉ, L. Microbial Secondary Metabolism and Biotechnology. **Microorganisms**, v. 10, p. 123, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10010123

GENG, H. *et al.* An overview of removing heavy metals from sewage sludge: Achievements and perspectives. **Environmental Pollution**, v. 266, 2020. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115375

GIRI, S. S. *et al.* Production and characterization of a thermostable bioflocculant from *Bacillus subtilis* F9, isolated from wastewater sludge. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121, p. 45–50, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.06.010

GHERGHEL, A. *et al.* A review on wastewater sludge valorization and its challenges in the context of circular economy. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, p. 244–263, 2019. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.04.240

GHERNAOUT, D. *et al.* Direct Potable Reuse: The Singapore NEWater Project as a Role Model. **OALib**, v. 06, p. 1–10, 2019. DOI: 10.4236/oalib.1105980

GOKER, T. *et al.* *Sphingomonas paucimobilis*: a rare infectious agent found in cerebrospinal fluid. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 60, p. 481–483, 2017. DOI: 10.3340/jkns.2014.0102.004

GONG, W. X. *et al.* Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4668–4674, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.077

GOUVEIA, J. G. *et al.* Optimization of bioflocculant production by *Bacillus* spp. From sugarcane crop soil or from sludge of the agroindustrial effluent. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, 2019. DOI: 10.1590/0104-6632.20190362s20180360

GREGORY, J. **Particles in water: properties and processes**. London: Iwa Pub.; Boca Raton, 2006.

GUO, J.; YANG, C.; ZENG, G. Treatment of swine wastewater using chemically modified zeolite and bioflocculant from activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 289–297, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.06.003

GUO, J. *et al.* Characterization and flocculation mechanism of a bioflocculant from hydrolyzate of rice stover. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 393–397, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.066

HASSAN, A.M. *et al.* Bioflocculant production by marine psychrotolerant *Psychrobacter cibarius* H41AKF207755 with its special role in silver nanoparticles production. **Egyptian Journal of Aquatic Biology e Fisheries**, v. 25, p. 735–769, 2021. DOI: 10.21608/EJABF.2021.16953811

HIGGINS, M. J.; NOVAK, J. T. The effect of cations on the settling and dewatering of activated sludges: Laboratory results. **Water Environment Research**, v. 69, p. 215–224, 1997. DOI: 10.2175/106143097x125371

HYRYCZ, M. *et al.* A review of flocculants as an efficient method for increasing the efficiency of municipal sludge dewatering: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. **Science of The Total Environment**, v. 820, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153328

HOGG, R. Flocculation and dewatering of fine-particles suspensions. In: Stechemesser, H.; Dobias, B. **Coagulation and Flocculation**. Surfactant Science Series. 2 ed. California, CRP Press, p. 858. 2005.

HOUGHTON, J. J. *et al.* Municipal wastewater sludge dewaterability and the presence of microbial extracellular polymer. **Water Science and Technology**, v. 44, p. 373–379, 2001. DOI: 10.2166/wst.2001.0792

HUA, J. Q. *et al.* Energy-saving preparation of a bioflocculant under high-salt condition by using strain *Bacillus* sp. and the interaction mechanism towards heavy metals. **Chemosphere**, v. 267, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129324.

IMRON, M. F. *et al.* Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 251, 2020. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.119716

JAGTAP, R.R. *et al.* Impact of plant growth promoting rhizobacteria *Serratia nematodiphila* RGK and *Pseudomonas plecoglossicida* RGK on secondary metabolites of turmeric rhizome. **Biotechnolysis and Agricultura Biotechnologia**, v.47, 2023. DOI: 10.1016/j.bcab.2023.102622

JIANG, J. Q. *et al.* The role of coagulation in water treatment. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 8, p. 36–44, 2015. DOI: 10.1016/j.coche.2015.01.008

KACPRZAK, M. *et al.* Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. **Environmental Research**, v. 156, p. 39–46, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2017.03.010.

KAMPFER, P. *et al.* *Psychrobacter faecalis* sp. nov., a New Species from a bioaerosol originating from pigeons faeces. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 31–36, 2002.

KANAMARLAPUDI, S. L. R. K.; MUDDADA, S. Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. **BioMed Research International**, p. 1–11, 2017. DOI:10.1155/2017/4201809

KANDI, V. *et al.* Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. **Cureus**, v. 8, 2016. DOI: 10.7759/cureus.731

KANG, S. M. *et al.* Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. **European Journal of Soil Biology**, v. 68, p. 85–93, 2015. DOI:10.1016/j.ejsobi.2015.02.005

KHOA, N. D. *et al.* Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biological Control**, v. 103, p. 1–10, 2016. DOI:10.1016/j.biocontrol.2016.07.010

KOUL, B. *et al.* Application of Natural Coagulants in Water Treatment: A Sustainable Alternative to Chemicals. **Water**, v. 14, 2022. DOI: 10.3390/w14223751

KURADE, M. B. *et al.* Ferric biogenic flocculant produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* enable rapid dewaterability of municipal sewage sludge: A comparison with commercial cationic polymer. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 105–111, 2014. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.09.001.

KURNIAWAN, S. B. *et al.* Challenges and Opportunities of Biocoagulant/Bioflocculant Application for Drinking Water and Wastewater Treatment and Its Potential for Sludge

Recovery. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 9312, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17249312

KURNIAWAN, S. B. *et al.* Isolation and characterisation of bioflocculant-producing bacteria from aquaculture effluent and its performance in treating high turbid water. **Journal of Water Process Engineering**, v. 42, 2021. DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.102194

KURNIAWAN, S. B. *et al.* What compound inside biocoagulants/bioflocculants is contributing the most to the coagulation and flocculation processes? **Science of The Total Environment**, v. 806, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150902

LAPOINTE, M.; BARBEAU, B. Understanding the roles and characterizing the intrinsic properties of synthetic vs. natural polymers to improve clarification through interparticle Bridging: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 231, 2020. DOI: 10.1016/j.seppur.2019.115893

LASEK, R. *et al.* Genome content, metabolic pathways and biotechnological potential of the psychrophilic Arctic bacterium *Psychrobacter* sp. DAB_AL43B, a source and a host of novel *Psychrobacter*-specific vectors. **Journal of Biotechnology**, v. 263, p. 64–74. 2017. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.09.011

LE GUERN, R. *et al.* *Psychrobacter sanguinis*: an unusual bacterium for nosocomial meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, 2014. DOI: 10.1128/JCM.01197-14

LI, Z. *et al.* Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3650–3656, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.029.

LI, O. *et al.* Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 87–93, 2013. DOI:10.1016/j.biortech.2013.02.013

LI, Y. *et al.* Characterization and flocculation mechanism of an alkali-activated polysaccharide flocculant from *Arthrobacter* sp. B4. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 574-577, 2014. DOI:10.1016/j.biortech.2014.07.112

LI, N. J. *et al.* Soluble microbial products from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as the bioflocculant for municipal wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 780, 2021. DOI:10.1016/j.scitotenv.2021.146662

LIU, Y.; FANG, H. H. P. Influences of Extracellular Polymeric Substances (SPE) on Flocculation, Settling, and Dewatering of Activated Sludge. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 237–273, 2003. DOI: 10.1080/10643380390814479.

LIU, W. *et al.* Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1044–1048, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.08.108.

LIU, W. *et al.* An alkali-tolerant strain *Microbacterium esteraromaticum* C26 produces a high yield of cation-independent bioflocculant. **AIMS Environmental Science**, v. 3, p. 408–419, 2016. DOI: 10.3934/environsci.2016.3.408.

- LIU, Y. *et al.* A bioflocculant from *Corynebacterium glutamicum* and its application in acid mine wastewater treatment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1136473
- LOPEZ, M.F. *et al.* potential of microorganisms isolated from the salar del hombre muerto, Argentina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2023. DOI: 10.1590/0001-3765202320211199
- LU, Y. *et al.* Improving the compression dewatering of sewage sludge through bioacidification conditioning driven by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: dewatering rate vs. dewatering extent. **Environmental Technology**, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1080/09593330.2018.1465129
- MAKAPELA, B. *et al.* Assessment of *Bacillus pumilus* Isolated from Fresh Water Milieu for Bioflocculant Production. **Applied Sciences**, v. 6, 2016. DOI: 10.3390/app6080211
- MALARKODI, C. *et al.* Bactericidal activity of bio mediated silver nanoparticles synthesized by *Serratia nematodiphila*. **Drug Invention Today**, v. 5, p. 119–125, 2013. DOI: 10.1016/j.dit.2013.05.005
- MALIEHE, T. *et al.* Wastewater treatment by a novel bioflocculant from a consortium of *Bacillus pumilus* JX860616 and *Bacillus subtilis* CSM5. **Bioscience Research**, v.17. p. 1610-1625, 2020.
- MARQUES, R. O.; FILHO, F. S. S. Flocculation kinetics of low-turbidity raw water and the irreversible floc breakup process. **Environmental Technology**, v. 38, p. 901–910, 2016. DOI: 10.1080/09593330.2016.1236149
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MIRZA, A. *et al.* Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 40, p. 30–36, 2017. DOI: 10.1016/j.jtemb.2016.12.001.
- MONSALVES, M. *et al.* Isolation of a psychrotolerant and UV-C resistant bacterium from elephant island, Antarctica with a highly thermoactive and thermostable catalase. **Microorganisms**, v.8, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8010095
- MORE, T. T. *et al.* Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, v. 144, p. 1–25, 2014. DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.05.010
- MOREIRA, J. S. *et al.* Endocarditis by *Kocuria rosea* in an immunocompetent child. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 82–84, 2015. DOI: 10.1016/j.bjid.2014.09.007
- MOURA, J. B. *et al.* Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, 2021. DOI: 10.1093/femsle/fnab105.

- MOWLA, D. *et al.* A review of the properties of biosludge and its relevance to enhanced dewatering processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 365–378, 2013. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.09.002.
- MU, J. *et al.* Microbial origin of bioflocculation components within a promising natural bioflocculant resource of *Ruditapes philippinarum* conglutination mud from an aquaculture farm in Zhoushan, China. **PLOS ONE**, v. 14, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0217679.
- MURUGESAN, K. *et al.* Fate of extracellular polymeric substances of anaerobically digested sewage sludge during predewatering conditioning with *Acidithiobacillus ferrooxidans* culture. **Bioresource technology**, v. 217, p.173–178, 2016. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2016.03.081
- NOURMORADI, H. *et al.* Effect of praestol as a coagulant-aid to improve coagulation-flocculation in dye containing wastewaters. **Global NEST Journal**, v. 18, p. 38-46, 2015.
- NTSANGANI, N. *et al.* Bioflocculation potentials of a uronic acid-containing glycoprotein produced by *Bacillus* sp. AEMREG4 isolated from Tyhume River, South Africa. **3 Biotech**, v. 7, 2017. DOI:10.1007/s13205-017-0695-8
- NAYERI, D.; MOUSAVI, S. A. A comprehensive review on the coagulant recovery and reuse from drinking water treatment sludge. **Journal of Environmental Management**, v. 319, 2022. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115649.
- NEYENS, E. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. **Journal of Hazardous Materials**, v. 106, p. 83–92, 2004. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2003.11.014.
- NICOLAUS, B. *et al.* (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. **Environmental Technology**, v. 31, p. 1145–1158, 2010. DOI: 10.1080/09593330903552094
- NIE, Y. *et al.* *Aspergillus oryzae*, a novel eco-friendly fungal bioflocculant for turbid drinking water treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 279, 2021. DOI: 10.1016/j.seppur.2021.119669
- NIU, M. *et al.* Correlation of physicochemical properties and sludge dewaterability under chemical conditioning using inorganic coagulants. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 337–343, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.06.126.
- NWODO, U. U. *et al.* Freshwater *Streptomyces*, Isolated from Tyume River, Produces a Predominantly Extracellular Glycoprotein Bioflocculant. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8679–8695, 2012. DOI: 10.3390/ijms13078679.
- OKAIYETO, K. *et al.* Characterization of a Bioflocculant (MBF-UFH) Produced by *Bacillus* sp. AEMREG7. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8; p. 12986-3003, 2015. DOI: 10.3390/ijms160612986.
- PANDE, S.; KOST, C. Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks. **Trends in Microbiology**, v. 25, p. 349–361, 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2017.02.015

- PANJIAR, N. *et al.* Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. **Science of The Total Environment**, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138933
- PARK, E. J. *et al.* *Kocuria atrinae* sp. nov., isolated from traditional Korean fermented seafood. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 914–918, 2009. DOI: 10.1099/ijs.0.014506-0
- PATHAK, M. *et al.* Characterization of a Novel Polymeric Bioflocculant Produced from Bacterial Utilization of n-Hexadecane and Its Application in Removal of Heavy Metals. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00170
- PIASKOWSKI, K. *et al.* Impact of cationic polyelectrolytes on activated sludge morphology and biological wastewater treatment in a Sequential Batch Reactor (SBR). **Journal of Water Process Engineering**, v. 52, 2023. DOI: 10.1016/j.jwpe.2023.103500.
- PORCAR, M. *et al.* Microbial Ecology on Solar Panels in Berkeley, CA, United States. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03043
- PRAHARAJ, S. *et al.* Bioleaching Approach for Enhancing Sewage Sludge Dewaterability. **Sustainable Management and Utilization of Sewage Sludge**, p. 51–69, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-85226-9_3
- PRAJAPATI, V. D. *et al.* An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 670–678, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.01.030
- PU, L. *et al.* Using a novel polysaccharide BM2 produced by *Bacillus megaterium* strain PL8 as an efficient bioflocculant for wastewater treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 374–384, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.167.
- PURTY, S. *et al.* The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. **Emerging Microbes & Infections**, v. 2, 2013.
- QI, Y. *et al.* Application of filtration aids for improving sludge dewatering properties – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 373–384, 2011. DOI: 10.1016/j.cej.2011.04.060
- RAMOS, G. L. *et al.* *Kocuria* spp. in Foods: Biotechnological Uses and Risks for Food Safety. **Applied Food Biotechnology**, v. 8, p. 79-88, 2021. DOI: 10.22037/afb.v8i2.30748
- REBAH, B. *et al.* M. Microbial Flocculants as an Alternative to Synthetic Polymers for Wastewater Treatment: A Review. **Symmetry**, v. 10, 2018. DOI: 10.3390/sym10110556
- RENAULT, F. *et al.* Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1337–1348, 2009. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027
- ROMANENKO, L. A. *et al.* *Psychrobacter fulvigenes* sp. nov., isolated from a marine crustacean from the Sea of Japan. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2009. DOI: 10.1099/ijs.0.007195-0

RYAN, M. P.; ADLEY, C. C. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, p. 153–157, 2010. DOI: 10.1016/j.jhin.2010.03.007

SALEEM, M.; BACHMANN, R. T. A contemporary review on plant-based coagulants for applications in water treatment. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 72, p. 281–297, 2019. DOI: 10.1016/j.jiec.2018.12.029

SALEHIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A. Extracellular biopolymeric flocculants. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 371–385, 2001. DOI: 10.1016/s0734-9750(01)00071-4

SALEHIZADEH, H.; YAN, N. Recent advances in extracellular biopolymer flocculants. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1506–1522, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.004

SALWAN, R.; V SHARMA, V. **Physiological and biotechnological aspects of extremophiles**. London; San Diego, Ca: Academic Press, 2020.

SANAYEI, Y. *et al.* Studies on Flocculating Activity of Bioflocculant from Closed Drainage System (CDS) and Its Application in Reactive Dye Removal. **International Journal of Chemistry**, v. 2, 2010. DOI: 10.5539/ijc.v2n1p168

SANTOS, A. L. S. *et al.* What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 9, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760180212

SELEPE, T. N. *et al.* Flocculating activity of a bioflocculant from *Bacillus megaterium* BMBF in treatment of Domestic and Coal Mine Wastewater. **Applied sciences**, v. 12, 2022. DOI: 10.3390/app12168312

STALOCH, B. *et al.* Draft genome sequence of *Psychrobacter nivimaris* LAMA 639 and its biotechnological potential. **Data in Brief**, v. 41, 2022. DOI: 10.1016/j.dib.2022.107927

SAVINI, V. *et al.* Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1395–1402, 2010. DOI: 10.1099/jmm.0.021709-0

SAYED, A. M. *et al.* Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, p. 630–657, 2020. DOI: 10.1111/jam.14386

SEYEDSAYAMDOST M. R. Toward a global picture of bacterial secondary metabolism. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, 2019. DOI: 10.1007/s10295-019-02136-y

SHENG, G. P. *et al.* Extracellular polymeric substances (SPE) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882–894, 2010. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.001.

SCHULTZ, J.; ROSADO, A. S. (2019). Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. **Extremophiles**. DOI:10.1007/s00792-019-01151-2

- SILVEIRA, C. *et al.* Desaguamento do lodo de estações de tratamento de água por leito de drenagem/secagem. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, p. 297–306, 2015. DOI: 10.1590/s1413-41522015020000082264.
- SINCERO, A. P.; SINCERO, G. A. Physical-Chemical Treatment of Water and Wastewater. 2002. DOI: 10.1201/9781420031904.
- SURESH, A. *et al.* Understanding and optimization of the flocculation process in biological wastewater treatment processes: A review. **Chemosphere**, v. 210, p. 401–416, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.021.
- TANG, W. *et al.* Production, Characterization, and Flocculation Mechanism of Cation Independent, pH Tolerant, and Thermally Stable Bioflocculant from *Enterobacter* sp. ETH-2. **PLoS ONE**, v. 9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0114591.
- TAWILA, A. *et al.* A novel efficient bioflocculant QZ-7 for the removal of heavy metals from industrial wastewater. **RSC Advances**, v. 9, p. 27825–27834, 2019. DOI:10.1039/c9ra04683f
- TEH, C. Y. *et al.* Recent Advancement of Coagulation–Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, p. 4363–4389, 2016. DOI: 10.1021/acs.iecr.5b04703.
- TETTEH, E. K.; RATHILAL, S. Evaluating Pre and Post-Coagulation Configuration of Dissolved Air Flotation Using Response Surface Methodology. **Processes**, v. 8, 2020. DOI: 10.3390/pr8040383.
- TIMKINA, E. *et al.* Kocuria Strains from Unique Radon Spring Water from Jachymov Spa. **Fermentation**, v. 8, 2022. DOI: 10.3390/fermentation8010035
- TOMLJENOVIC, L. Aluminum and Alzheimer’s disease: after a century of controversy, is there a plausible link? **Journal of Alzheimer’s disease: JAD**, Netherlands, v. 23, p. 567–98, 2011. DOI: 10.3233/JAD-2010-101494.
- TO, V. H. P. *et al.* (2020). Effects of extracellular polymeric substance fractions on polyacrylamide demand and dewatering performance of digested sludges. **Separation and Purification Technology**, 239, 2020. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116557
- TSILO, P. H. *et al.* Production and Characterization of a Bioflocculant from *Pichia kudriavzevii* MH545928.1 and Its Application in Wastewater Treatment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, 2022. DOI: 10.3390/ijerph19063148
- URBIETA, M. S. *et al.* Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 633–647, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.007
- VAJIHINEJAD, V.; SOARES, J. B. P. Monitoring polymer flocculation in oil sands tailings: A population balance model approach. **Chemical Engineering Journal**, v. 346, p. 447–457, 2018. DOI:10.1016/j.cej.2018.04.039
- VAN HAMME, J. D. *et al.* Physiological aspects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604–620, 2006. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.08.001

VELA, A. I. *et al.* *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 415-419, 2003. DOI: 10.1099/ijs.0.02413-0

VIEIRA, I. M. M. *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1–18, 2021. DOI: 10.1016/j.jiec.2021.05.017.

VIJAY, A. *et al.* Halophilic starch degrading bacteria isolated from Sambhar Lake, India, as potential anode catalyst in microbial fuel cell: A promising process for saline water treatment. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 391–398. 2018. DOI:10.1016/j.biortech.2018.02.044

VIMALA, R. T. V. Production and Flocculating Performance of Bioflocculant by Bacterial Strain and its Application for Municipal Wastewater Treatment. **Journal of Pure Applied Microbiology**, v. 13, p. 1673-1681, 2019. DOI: 10.22207/JPAM.13.3.41

WANG, Z. *et al.* Degradation of slime extracellular polymeric substances and inhibited sludge flocs destruction contribute to sludge dewaterability enhancement during fungal treatment of sludge using filamentous fungus *Mucor* sp. GY-1. **Bioresource technology**, v. 192, p. 514–521, 2015. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2015.06.019

WEI, H. *et al.* Coagulation/flocculation in dewatering of sludge: A review. **Water Research**, v. 143, p. 608–631, 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2018.07.029

WILÉN, B. M. *et al.* Relationship between flocculation of activated sludge and composition of extracellular polymeric substances. **Water Science and Technology**, v. 47, p. 95–103, 2003. DOI: 10.2166/wst.2003.0633

WINGENDER, J. *et al.* What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? **Microbial Extracellular Polymeric Substances**, p. 1–19, 1999. DOI: 10.1007/978-3-642-60147-7_1

WIRTH, S. E. *et al.* *Psychrobacter sanguinis* sp. nov., recovered from four clinical specimens over a 4-year period. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, p. 49–54, 2011 DOI:10.1099/ijs.0.029058-0

WOLELLA, E. K.; TILAHUN, B. Isolation and Characterization of Extremophiles from Shalla/Abidjata Hot Springs, Ethiopia. **Acta Scientifica Microbiology**, 2020.

WONG, J. W. C. *et al.* Dewatering of saline sewage sludge using iron-oxidizing bacteria: Effect of substrate concentration. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 31–38, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.118.

WU, B. *et al.* Mechanism insights into bio-floc bound water transformation based on synchrotron X-ray computed microtomography and viscoelastic acoustic response analysis. **Water Research**, v. 142, p. 480–489, 2018. DOI:10.1016/j.watres.2018.06.003

WU, B.; DAI, X.; CHAI, X. Critical review on dewatering of sewage sludge: Influential mechanism, conditioning technologies and implications to sludge re-utilizations. **Water Research**, v. 180, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115912

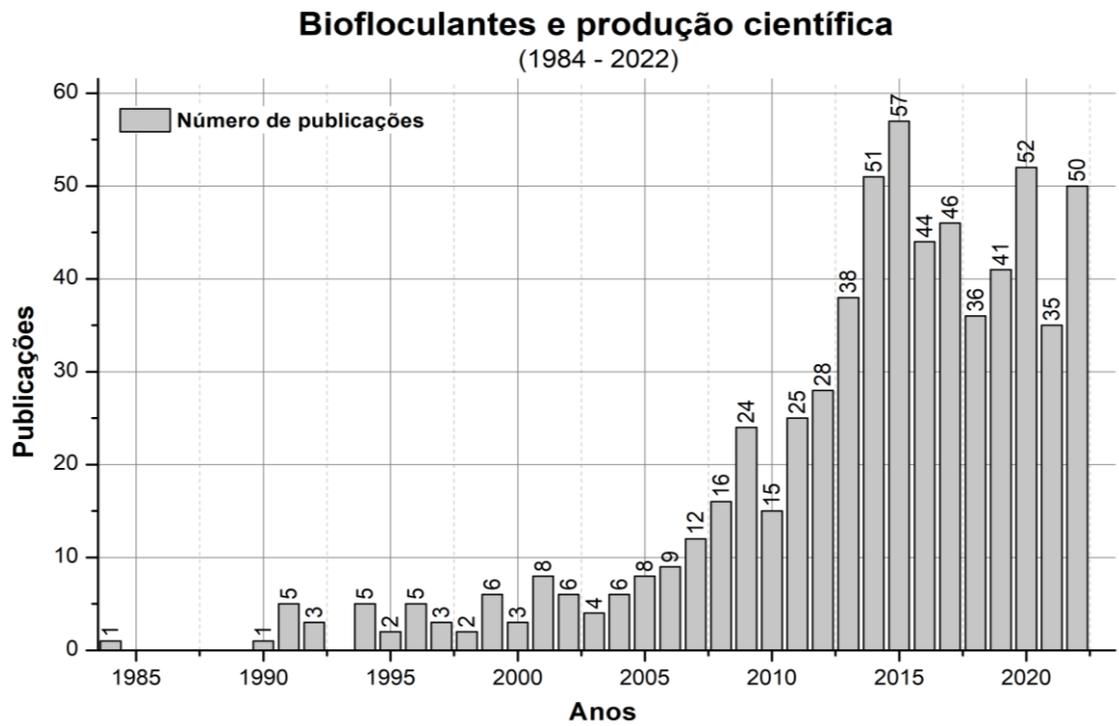
- XIA, M. *et al.* A novel polysaccharides-based bioflocculant produced by *Bacillus subtilis* ZHX3 and its application in the treatment of multiple pollutants. **Chemosphere**, v. 289, 2022. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.133185
- YAÑEZ-YAZLLE, M. F. *et al.* Halotolerant bacteria isolated from extreme environments induce seed germination and growth of chia (*Salvia hispanica* L.) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under saline stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 218, 2021. DOI:10.1016/j.ecoenv.2021.112273
- YANG, T.; LIU, X.; LI, R. *et al.* Hydrothermal liquefaction of sewage sludge to produce bio-oil: Effect of co-pretreatment with subcritical water and mixed surfactants. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 144, p. 28–38, 2019. DOI: 10.1016/j.supflu.2018.10.005. 2021
- YIM, J. H. *et al.* Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 361–367, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.12.021
- YU, W. *et al.* A comparatively optimization of dosages of oxidation agents based on volatile solids and dry solids content in dewatering of sewage sludge. **Water Research**, v. 126, p. 342–350, 2017. DOI:10.1016/j.watres.2017.09.044
- ZAVALA, M. L. *et al.* Enhancement of Activated Sludge Dewaterability by Using Filamentous Fungi as Bioadditives. **Water**, v. 8, n. 11, p. 531, 2016. DOI: 10.3390/w8110531
- ZHANG, C. *et al.* *Serratia nematodiphila* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 59, 2009. DOI: 10.1099/ijss.0.003871-0
- ZHANG, F. *et al.* Culture Condition Effect on Bioflocculant Production and Actual Wastewater Treatment Application by Different Types of Bioflocculants. **New Advances and Technologies**, 2015. DOI:10.5772/62114
- ZHANG, Q. *et al.* Effect of using different proportions of inoculum during bioleaching on sludge dewaterability. **Water Science and Technology**, 2018. DOI:10.2166/wst.2018.234
- ZHANG, X.; YE, P.; WU, Y. Enhanced technology for sewage sludge advanced dewatering from an engineering practice perspective: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 321, 2022. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115938
- ZHAO, S. *et al.* Enteromorpha prolifera polysaccharide based coagulant aid for humic acids removal and ultrafiltration membrane fouling control. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 576–583, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.273
- ZHAO, H. *et al.* Characteristics of methane and bioflocculant production by *Methanosarcina spelaei* RK-23. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2020. DOI:10.1016/j.ijhydene.2020.02.088
- ZHOU, J. *et al.* Influences of Extracellular Polymeric Substances on the Dewaterability of Sewage Sludge during Bioleaching. **PLoS ONE**, v. 9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0102688

ZHU, H. *et al.* Polyacrylamide grafted cellulose as an eco-friendly flocculant: Key factors optimization of flocculation to surfactant effluent. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 145–152, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.08.049

ZHONG, C. *et al.* Production of a bioflocculant from ramie biodegumming wastewater using a biomass-degrading strain and its application in the treatment of pulping wastewater. **Chemosphere**, v. 253, 2020. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.126727

ZULKEFLEE, Z. *et al.* Cation Dependence, pH Tolerance, and Dosage Requirement of a Bioflocculant Produced by *Bacillus* spp. UPMB13: Flocculation Performance Optimization through Kaolin Assays. **The Scientific World Journal**, 2012. DOI: 10.1100/2012/495659

Apêndice A – Série histórica de publicações de artigos científicos retornados a partir da busca pela palavra-chave “*Biofloculant*” na base de dados *Scopus*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Apêndice B – Propriedades do caulim.

Composição básica	
Silicato de Alumínio (SiO₂ + Al₂O₃)	
Características químicas	
SiO ₂	49,30%
Al ₂ O ₃	39,90%
Fe ₂ O ₃	0,30%
K ₂ O	0,24%
Propriedades controladas	
Características	Limite de variação
Absorção DOP (%)	48,0 a 65,0
Absorção de óleo de linhaça (%)	38,0 a 54,0
Cor	Branco
Densidade aparente compactada (g/cm ³)	0,35 a 0,75
Perda ao fogo (850°C) (%)	Até 15,0
Massa específica (g/cm ³)	2,40 a 2,65
pH (solução aquosa 5%)	3,0 a 9,0
Retenção #1000 mesh (0,013 mm) (%)	Até 1,0
Umidade (%)	Até 2,0

Fonte: Elaborado pela autora a partir de ficha técnica fornecida pelo distribuidor (2022).

Apêndice C – Dados de atividade floculante dos biofloculantes sintetizados por *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila*, *Kocuria* sp. e *Psychrobacter* sp. em função do tempo de incubação.

Tempo (horas)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	<i>Kocuria</i> sp.	<i>Psychrobacter</i> sp.
0	38,74 ± 5,72 ^a	25,24 ± 6,15 ^{a, b}	33,94 ± 3,20 ^b	41,35 ± 5,65 ^a
24	60,32 ± 1,84 ^a	32,23 ± 4,05 ^b	34,62 ± 3,50 ^b	51,96 ± 4,93 ^a
48	12,81 ± 2,56 ^a	39,91 ± 4,65 ^b	33,43 ± 5,12 ^b	56,91 ± 4,64 ^c
72	16,05 ± 8,41 ^a	39,85 ± 7,79 ^b	21,88 ± 4,38 ^a	48,65 ± 4,95 ^c
96	14,55 ± 2,45 ^a	37,37 ± 4,53 ^b	19,18 ± 3,97 ^a	50,54 ± 4,02 ^c
120	13,30 ± 6,05 ^a	31,67 ± 5,62 ^b	13,53 ± 3,56 ^a	16,00 ± 4,55 ^a

Diferentes letras representam diferenças significativas quanto à atividade floculante ($p < 0,05$) dentro de cada um dos intervalos de tempo analisados. Fonte: Elaborada pela autora.

Apêndice D – Quadro de ensaios determinados a partir de Delineamento Composto Central Rotacional e respectivas respostas de atividade floculante.

Ensaio	Fatores			Resposta
	pH	Temperatura (°C)	Inóculo (%)	AF (%)
1	4	15	5	9,97 ± 3,39 ^a
2	10	15	5	93,96 ± 1,38 ^b
3	4	45	5	45,01 ± 0,91 ^c
4	10	45	5	78,08 ± 4,35 ^d
5	4	15	15	22,57 ± 2,56 ^e
6	10	15	15	62,34 ± 6,12 ^f
7	4	45	15	15,88 ± 5,46 ^{a,e}
8	10	45	15	51,05 ± 1,49 ^g
9	1,95	30	10	64,44 ± 1,82 ^f
10	12,05	30	10	51,57 ± 4,33 ^g
11	7	4,77	10	31,36 ± 1,82 ^h
12	7	55,23	10	29,92 ± 2,39 ^h
13	7	30	1,59	44,62 ± 3,78 ^c
14	7	30	18,41	44,62 ± 3,30 ^c
15	7	30	10	68,50 ± 2,58 ^f
16	7	30	10	68,50 ± 1,97 ^f
17	7	30	10	35,96 ± 2,53 ^h

Diferentes letras representam diferenças significativas quanto à atividade floculante de cada um dos tratamentos ($p < 0,05$). Fonte: Elaborada pela autora.