

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE - CCTS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS RECURSOS
RENOVÁVEIS

JAMILE GONÇALVES

Desaguamento de lodo biológico de estações de tratamento de esgoto sanitário: uma abordagem microbiológica com *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Rhodotorula mucilaginosa*

Sorocaba

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE - CCTS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS RECURSOS
RENOVÁVEIS

JAMILE GONÇALVES

Desaguamento de lodo biológico de estações de tratamento de esgoto sanitário: uma abordagem microbiológica com *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Rhodotorula mucilaginosa*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso dos Recursos Renováveis como requisito para obtenção do título de Doutora em Planejamento e Uso dos Recursos Renováveis.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Sorocaba

2024

Gonçalves, Jamile

Desaguamento de lodo biológico de estações de tratamento de esgoto sanitário: uma abordagem microbiológica com *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Rhodotorula mucilaginosa* / Jamile Gonçalves -- 2024. 140f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte

Banca Examinadora: Dagoberto Yukio Okada, Marta

Siviero Guilherme Pires, Ariovaldo Jose da Silva, Arnaldo Sarti

Bibliografia

1. Biorremediação. 2. Substâncias poliméricas extracelulares. 3. Proteínas. I. Gonçalves, Jamile. 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jamile Gonçalves, realizada em 19/12/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte (UFSCar)

Prof. Dr. Dagoberto Yukio Okada (UNICAMP)

Profa. Dra. Marta Siviero Guilherme Pires (UNICAMP)

Prof. Dr. Ariovaldo Jose da Silva (UNICAMP)

Prof. Dr. Arnaldo Sarti (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis.

À Deus, que me foi sustento e proteção nessa jornada.

À minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTO

À minha família, que me ajudou a manter a fé no sonho de realizar o doutorado.

À Prof.^a. Dr.^a Iolanda Cristina Silveira Duarte pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pela confiança e orientação tão importantes.

Ao Programa de Pós-graduação em Planejamento e Uso dos Recursos Renováveis da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba, onde essa pesquisa foi desenvolvida. Aos colegas do laboratório LMA, em especial à Juliana Ramos, pelo incentivo e apoio em diversos momentos críticos, e à Amanda Jabur pela companhia nos horários noturnos de uso do laboratório.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba, pelo suporte com alguns materiais de análise.

À Prof.^a. Dr.^a. Cleoni dos Santos Carvalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba, pela ajuda com a bactéria acidófila na fase inicial do projeto e pelo uso do espaço para as análises de proteínas. À Isabela Ferreira Fernandes, do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, que gentilmente auxiliou nas análises de proteínas.

Aos membros da banca examinadora, que aceitaram participar e colaborar com esta tese.

“Quando conseguimos olhar para trás e reconhecer o valor das nossas experiências, ganhamos confiança para seguir em frente, porque reconhecemos a força que tivemos para superar muitos obstáculos. De onde veio aquela força vem mais.”

36 dias - Antônio Sena (2021)

RESUMO

Os lodos de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) possuem elevada umidade, fator que afeta adversamente sua destinação ou reaproveitamento. Neste aspecto, a biolixiviação, já conhecida pela eficácia no tratamento de metais, tem demonstrado capacidade simultânea de promover o desaguamento. No entanto, a concentração elevada de matéria orgânica dissolvida no lodo possui efeito inibitório aos microrganismos comumente utilizados nesse processo, mas que consorciados com microrganismos heterotróficos ácido tolerantes podem minimizar esse efeito. Portanto, o presente trabalho avaliou o desaguamento de lodo de duas ETEs em ensaios com bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* e levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Diferentes concentrações de inóculo, desempenho dos sobrenadantes da bactéria e levedura, bem como surfactantes sintéticos comerciais foram comparados. Por fim, foi avaliado o efeito da coinoculação da bactéria e a levedura no processo de desaguamento. O desaguamento foi mensurado por ensaios de Tempo de Filtração (TTF), Resistência Específica a Filtração (SRF) e Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS). No tratamento com *A. thiooxidans* houve maior redução do TTF ($8,3 \pm 0,2$ min) com 15% de inóculo, concomitante redução da concentração de proteínas ligadas em EPS (71,3 %, comparado ao controle). Com a *R. mucilaginosa*, menor TTF ($1,1 \pm 0,2$ min) foi obtido com a menor concentração de inóculo (5%) e o percentual de proteínas na fração ligada foi inferior a 10% nas três concentrações avaliadas. Ambos os sobrenadantes, da bactéria e levedura, promoveram melhoria no desaguamento (TTF de $1,5 \pm 0,1$ min e $1,2 \pm 0,1$ min, respectivamente). Entretanto, o desaguamento mais eficiente foi obtido com a coinoculação de *A. thiooxidans* (15%) e *R. mucilaginosa* (5%) resultando em TTF de $14 \pm 2,4$ segundos, 98,7% inferior ao lodo controle ($17,9 \pm 0,6$ min), com concentração de proteínas ligadas em EPS 79% inferior ao controle. Análise de Correlação de Kendall demonstrou correlação positiva entre o TTF e concentração de proteínas na fração ligada de EPS reforçando a hipótese de que a redução das proteínas ligadas é favorável ao desaguamento. O ensaio de coinoculação foi replicado com lodo de outra ETE demonstrando sua aplicabilidade em outros tipos de lodo. Os sobrenadantes combinados da *A. thiooxidans* (15%) e *R. mucilaginosa* (15%), por sua vez, reduziram o TTF em 90,0% em relação ao controle, e embora apresente desempenho semelhante a coinoculação, sua aplicação prática pode ser vantajosa ao permitir o reaproveitamento da biomassa e potencial de desaguamento em menor tempo de tratamento.

Palavras-chave: biorremediação, metais, substâncias poliméricas extracelulares, diversidade microbiana.

ABSTRACT

Sludge from Sewage Treatment Plants (STPs) has high moisture content, a factor that adversely affects its disposal or reuse. In this regard, bioleaching, already known for its effectiveness in the treatment of metals, has demonstrated the simultaneous ability to promote dewatering. However, the high concentration of dissolved organic matter in the sludge has an inhibitory effect on microorganisms commonly used in this process, but when combined with acid-tolerant heterotrophic microorganisms, this effect can be minimized. Therefore, this study evaluated the dewatering of sludge from two STPs in tests with the bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* and the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. Different inoculum concentrations, performance of the supernatants of the bacteria and yeast, as well as commercial synthetic surfactants were compared. Finally, the effect of coinoculation of the bacteria and yeast on the dewatering process was evaluated. Dewatering was measured by filtration time (TTF), specific filtration resistance (SRF) and extracellular polymeric substances (EPS) tests. In the treatment with *A. thiooxidans*, there was a greater reduction in TTF (8.3 ± 0.2 min) with 15% inoculum, concomitantly with a reduction in the concentration of proteins bound in EPS (71.3%, compared to the control). With *R. mucilaginosa*, a lower TTF (1.1 ± 0.2 min) was obtained with the lowest inoculum concentration (5%) and the percentage of proteins in the bound fraction was less than 10% in the three concentrations evaluated. Both supernatants, from bacteria and yeast, promoted improved dewatering (TTF of 1.5 ± 0.1 min and 1.2 ± 0.1 min, respectively). However, the most efficient dewatering was obtained with the co-inoculation of *A. thiooxidans* (15%) and *R. mucilaginosa* (5%), resulting in a TTF of 14 ± 2.4 seconds, 98.7% lower than the control sludge (17.9 ± 0.6 min), with a concentration of bound proteins in EPS 79% lower than the control. Kendall's correlation analysis demonstrated a positive correlation between the TTF and the concentration of proteins in the bound fraction of EPS, reinforcing the hypothesis that the reduction of bound proteins is favorable to dewatering. The co-inoculation test was replicated with sludge from another STP, demonstrating its applicability in other types of sludge. The combined supernatants of *A. thiooxidans* (15%) and *R. mucilaginosa* (15%), in turn, reduced the TTF by 90.0% compared to the control, and although it presents similar performance to co-inoculation, its practical application can be advantageous by allowing the reuse of biomass and dewatering potential in a shorter treatment time.

Keywords: bioremediation, metals, extracellular polymeric substances, microbial diversity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
Figura 1.1. Número de publicações sobre o tema nos últimos doze anos. Bancos de dados <i>Scopus</i> , <i>Web of Science</i> e <i>Science Direct</i>	28
Figura 1.2. Distribuição de água em flocos de lodo	29
Figura 1.3. Mecanismos de biolixiviação mediados por EPS	40
Figura 1.4. Frações de EPS estratificadas no flocos de lodo: S-EPS, LB-EPS e TB-EPS	45
CAPÍTULO 2: MELHORAMENTO DO DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR MEIO DE INOCULAÇÃO DE <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	62
Figura 2.1. Fluxograma da ETE na qual foi realizada a primeira coleta de lodo	66
Figura 2.2. Fluxograma da ETE na qual foi realizada a segunda coleta de lodo	68
Figura 2.3. Ensaio de Tempo de Filtração do lodo.....	69
Figura 2.4. Extração de EPS do lodo.....	70
Figura 2.5. Experimentos de desaguamento, condições analisadas e parâmetros monitorados em cada etapa	72
Figura 2.6. TTF e SRF médios do lodo durante o desaguamento com a levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e seu sobrenadante	75
Figura 2.7. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com a levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e seu sobrenadante	76
Figura 2.8. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e seu sobrenadante	78
Figura 2.9. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e seu sobrenadante	79
Figura 2.10. TTF e SRF médios do lodo durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura <i>R. mucilaginosa</i>	80
Figura 2.11. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura <i>R. mucilaginosa</i>	81
Figura 2.12. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura <i>R. mucilaginosa</i>	84

Figura 2.13. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura <i>R. mucilaginosa</i>	84
Figura 2.14. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (<i>R. mucilaginosa</i>).....	86
Figura 2.15. Variação do pH do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (<i>R. mucilaginosa</i>).....	87
Figura 2.16. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (<i>R. mucilaginosa</i>)	88
Figura 2.17. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (<i>R. mucilaginosa</i>).....	89
CAPÍTULO 3: DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO USANDO COINOCULAÇÃO (<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) COMO CONDICIONADOR DE LODO	94
Figura 3.1. Experimentos de desaguamento, condições analisadas e parâmetros monitorados em cada etapa	102
Figura 3.2. TTF e SRF médios do lodo durante o desaguamento com a bactéria acidófila (<i>A. thiooxidans</i>) e seu sobrenadante	107
Figura 3.3. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com a bactéria acidófila (<i>A. thiooxidans</i>) e seu sobrenadante	108
Figura 3.4. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a bactéria acidófila (<i>A. thiooxidans</i>) e seu sobrenadante	111
Figura 3.5. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a bactéria acidófila (<i>A. thiooxidans</i>) e seu sobrenadante	112
Figura 3.6. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria <i>A. thiooxidans</i> e levedura <i>R. mucilaginosa</i>	113
Figura 3.7. Variação do pH do lodo ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria <i>A. thiooxidans</i> e levedura <i>R. mucilaginosa</i>	114
Figura 3.8. Diferença visual entre o lodo controle (esquerda) e o tratamento do lodo com a coinoculação da bactéria <i>A. thiooxidans</i> e levedura <i>R. mucilaginosa</i> (direita) após 96h de tratamento	115
Figura 3.9. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria <i>A. thiooxidans</i> e levedura <i>R. mucilaginosa</i>	117

Figura 3.10. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria <i>A. thiooxidans</i> e levedura <i>R. mucilaginosa</i> ...	118
Figura 3.11. Gráfico de Correlação de Kendall: TTF e concentrações de carboidratos e proteínas nas frações solúvel e ligada de EPS.....	119
Figura 3.12. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e comparativo com ácido sulfúrico	121
Figura 3.13. Variação do pH do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e comparativo com ácido sulfúrico	122
Figura 3.14. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>)	123
Figura 3.15. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o ácido sulfúrico.....	124
Figura 3.16. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>)	125
Figura 3.17. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o ácido sulfúrico.....	125
Figura 3.18. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 96 horas de tratamento: coinoculação da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e sobrenadantes da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) combinados.....	127
Figura 3.19. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e sobrenadantes da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) combinados	128
Figura 3.20. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e sobrenadantes da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) combinados.....	129
Figura 3.21. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e sobrenadantes da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) combinados.....	130

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens das principais categorias de tecnologias para desaguamento de lodo de esgoto	36
Tabela 1.2. Artigos revisados de aspectos microbiológicos da produção e remoção de EPS em lodo	44
CAPÍTULO 2: MELHORAMENTO DO DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR MEIO DE INOCULAÇÃO DE <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	62
Tabela 2.1. Parâmetros físico-químicos e biológicos e métodos utilizados para caracterização inicial do lodo	67
Tabela 2.2. Condições experimentais de desaguamento	72
Tabela 2.3. Caracterização inicial dos lodos: parâmetros físico-químicos, biológicos e de desaguamento	73
Tabela 2.4. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com a levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e seu sobrenadante.....	75
Tabela 2.5. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos e sobrenadante levedura (<i>R. mucilaginosa</i>)	80
Tabela 2.6. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com o sobrenadante da levedura (<i>R. mucilaginosa</i>).....	86
CAPÍTULO 3: DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO USANDO COINOCULAÇÃO (<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) COMO CONDICIONADOR DE LODO	94
Tabela 3.1. Parâmetros físico-químicos e biológicos e métodos utilizados para caracterização inicial do lodo	99
Tabela 3.2. Condições experimentais de desaguamento do lodo ETE.....	103
Tabela 3.3. Caracterização inicial dos lodos: parâmetros físico-químicos, biológicos e de desaguamento	105
Tabela 3.4. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com a bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e seu sobrenadante.....	107
Tabela 3.5. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>).....	114

Tabela 3.6. Matriz de Correlação de Kendall: TTF e concentrações de carboidratos e proteínas nas frações solúvel e ligada de EPS.....	119
Tabela 3.7. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com o sobrenadante da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e comparativo com ácido sulfúrico	122
Tabela 3.8. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) e sobrenadantes da bactéria (<i>A. thiooxidans</i>) e levedura (<i>R. mucilaginosa</i>) combinados	127
Tabela 3.9. Caracterização final do lodo: parâmetros físico-químicos e biológicos.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3D-EEM Espectroscopia de Fluorescência de Matriz de Excitação/Emissão Tridimensional (do inglês *Three-dimensional excitation emission matrix*)
- AOP Processos Oxidativos Avançados (do inglês *Advanced Oxidative Process*)
- BCA Ácido bicinconínico
- B-EPS Fração ligada do EPS (do inglês *Bound EPS*)
- CST Tempo de Sucção Capilar (do inglês *Capillarity Suction Time*)
- CTAB Brometo de cetil trimetil amônio
- DOC Carbono Orgânico Dissolvido (do inglês *Dissolved Organic Carbon*)
- DTAB Brometo de dodecil trimetil amônio
- EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
- EPS Substâncias Poliméricas Extracelulares (do inglês *Extracellular Polymeric Substances*)
- ETE Estações de Tratamento de Esgoto
- FCC Filtração por Célula de Compressão (do inglês *Filtration Compression Cell*)
- FT-IR Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*)
- iTRAQ Análise proteômica de quantificação relativa e absoluta
- LB-EPS Fração fracamente ligada do EPS (do inglês *loosely bound EPS*)
- PDMD Cloreto de polidimetildialilamônio
- ORP Potencial de Oxidação/Redução (do inglês *Oxydation Reduction Potential*)
- PCA Análise de Componentes Principais (do inglês *Principal Component Analysis*)
- PDMD Cloreto de Polidimetildialilamônio

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

S-EPS Fração solúvel do EPS (do inglês *Soluble EPS*)

SRF Resistência Específica à Filtração (do inglês *Specific Resistance to Filtration*)

ST Sólidos Totais

STV Sólidos Totais Voláteis

TA Ácido tânico (do inglês *Tanic acid*)

TB-EPS Fração fortemente ligada do EPS (do inglês *tightly bound EPS*)

TOC Carbono Orgânico Total (do inglês *Total Organic Carbon*)

TTF Tempo de Filtração (do inglês *Time to Filter*)

UASB Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

XPS Espectroscopia de fotoelétrons de raios X (do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	21
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	26
1.2 METODOLOGIA DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
1.3. MECANISMOS DE DESAGUAMENTO DE LODO	29
1.4. PARÂMETROS DE MENSURAÇÃO DO DESAGUAMENTO DE LODO	37
1.5. MICROBIOLOGIA DA BIOLIXIVIAÇÃO.....	38
1.6. BIOLIXIVIAÇÃO E POTENCIAL SIMULTÂNEO DE DESAGUAMENTO	41
1.7. SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES E MECANISMO DE DESAGUAMENTO.....	42
1.7.1. <i>Microbiologia da produção de EPS em lodo.....</i>	<i>44</i>
1.7.2. <i>Frações de Substâncias Poliméricas Extracelulares e influência no desaguamento .</i>	<i>45</i>
1.7.3. <i>Microbiologia da remoção de EPS em lodo</i>	<i>47</i>
1.8. PERSPECTIVAS FUTURAS DE DESAGUAMENTO DE LODO VIA BIOLIXIVIAÇÃO.....	50
1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	51
1.10. REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 2: MELHORAMENTO DO DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR MEIO DE INOCULAÇÃO DE <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	62
2.1 INTRODUÇÃO.....	64
2.2 METODOLOGIA.....	65
2.2.1. <i>Coleta, preservação e caracterização do lodo de Estação de Tratamento de Esgoto</i>	<i>65</i>
2.2.2. <i>Análises de desaguamento</i>	<i>68</i>
2.2.3. <i>Preparo do inóculo da levedura</i>	<i>70</i>
2.2.4. <i>Experimentos de desaguamento do lodo.....</i>	<i>70</i>
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	73
2.3.1. <i>Caracterização inicial do lodo</i>	<i>73</i>
2.3.2. <i>Experimentos de desaguamento do lodo – Primeira Coleta</i>	<i>74</i>
2.3.3. <i>Experimentos de desaguamento do lodo – Segunda Coleta</i>	<i>85</i>

2.4. CONCLUSÃO.....	89
2.5. REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO 3: DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO USANDO COINOCULAÇÃO (<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) COMO CONDICIONADOR DE LODO	94
3.1 INTRODUÇÃO.....	96
3.2 METODOLOGIA.....	98
3.2.1. Coleta, preservação e caracterização do lodo de Estação de Tratamento de Esgoto.....	98
3.2.2. Análises de desaguamento	99
3.2.3. Microrganismos e preparo dos inóculos	100
3.2.4. Experimentos de desaguamento do lodo.....	101
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	104
3.3.1. Caracterização inicial do lodo	104
3.3.2. Experimentos de desaguamento do lodo – Primeira Coleta	105
3.3.3. Experimentos de desaguamento do lodo – Segunda Coleta	120
3.3.4. Caracterização final do lodo	130
3.4. CONCLUSÃO.....	131
3.5. REFERÊNCIAS	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
APÊNDICE A	138

INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional, cresce a demanda por água, energia e alimentos, e conseqüentemente, a geração de efluentes que precisam ser tratados adequadamente. Portanto, é fundamental considerar a relação entre essas demandas para otimizar e recuperar recursos. Uma das principais questões relacionadas ao tratamento de efluentes convencionais é a geração de lodo, pois embora um importante componente das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), o tratamento adequado desse resíduo é indispensável pois pode resultar em impactos ambientais significativos, como contaminação de solo, corpos hídricos e desequilíbrio dos ecossistemas (LIU et al. 2012; BIZIKOVA et al. 2013).

Sob a perspectiva da recuperação de recursos, uma alternativa promissora é o reaproveitamento como fertilizante na agricultura, uma vez que o lodo possui importantes nutrientes em sua composição, como nitrogênio, fósforo e matéria orgânica (CAMARGO et al. 2016). No entanto, a viabilidade desse reuso depende de tecnologias de tratamento de lodo que removam poluentes potencialmente tóxicos, patógenos e metais. Os metais não podem ser degradados e, se descartados de forma inadequada no solo, podem ser metabolizados por plantas e animais e bioacumulados (ELICKER et al. 2014). Além da elevada capacidade de fixação de metais, os lodos de esgoto possuem elevada umidade (geralmente superior a 90%), fatores que afetam adversamente seu reaproveitamento ou sua subsequente destinação (XIE et al., 2019; ZHOU et al., 2016).

O custo de desaguamento do lodo pode chegar a até 50% do custo operacional total das ETEs, sendo o consumo de produtos químicos uma das principais despesas, como polímeros comerciais de poliácridamida usuais em desaguamento químico de lodos (NEYENS et al. 2004). Além disso, a dosagem de produtos químicos pode causar riscos ambientais associados a poluição secundária, tornando mais complexa a reciclagem segura do lodo para fins agrícolas.

Neste contexto, a biolixiviação surge como uma alternativa promissora, pois além da conhecida capacidade de remoção de metais, em detrimento a remoção ácida, estudos demonstram uma capacidade simultânea de desaguamento do lodo (LU et al., 2021; ZHOU et al., 2017; LIU et al., 2016; KURADE et al., 2016). Na biolixiviação, o tratamento dos metais ocorre a partir do metabolismo de microrganismos capazes de oxidar ferro e enxofre, como bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, que reduzem o pH do lodo e solubilizam os metais (ZHENG et al. 2009; RASTEGAR et al. 2014). No desaguamento simultâneo a biolixiviação, o principal mecanismo descrito é a redução de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*) e a liberação de água intersticial do lodo, cuja

remoção é desafiadora por processos físico-químicos tradicionais (HUO et al. 2014; WONG et al. 2015).

Embora as bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, as principais utilizadas nos processos de biolixiviação, apresentem também resultados promissores de desaguamento de lodo, algumas características do esgoto podem inibir o crescimento das bactérias acidófilas e afetar negativamente o processo, como a presença de ácidos orgânicos e matéria orgânica dissolvida (ZHOU et al. 2013). Neste sentido estudos recentes demonstram que uma relação mutualística com microrganismos heterotróficos ácido tolerantes pode favorecer o processo de biolixiviação e consequente desaguamento, pela capacidade de metabolizar compostos orgânicos como fonte de energia e carbono bem como, produzir biosurfactantes (BANAT et al. 2010; ZHENG et al. 2016).

Dessa forma, o presente trabalho avaliou o desaguamento de lodo de duas ETEs em tratamentos com bactéria do gênero *Acidithiobacillus* (*A. thiooxidans*) e levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*). Foram analisadas diferentes concentrações de inóculo, o desempenho desses microrganismos individualmente e combinados, bem como um comparativo desses tratamentos com os sobrenadantes dos inóculos e surfactantes sintéticos, analisando a influência das frações e composição de EPS neste processo.

Esta tese está dividida em três capítulos, sendo o primeiro capítulo uma Revisão Bibliográfica, cujo intuito foi explicar sobre os mecanismos de desaguamento de lodo, relação com a produção e remoção de EPS, bem como aprofundar nos aspectos microbiológicos da biolixiviação e correlação com o processo de desaguamento. O segundo capítulo consiste em ensaios de desaguamento de lodo de ETE com levedura produtora de biosurfactante (*R. mucilaginosa*), avaliando diferentes concentrações de inóculo e estabelecendo um comparativo com o sobrenadante do inóculo, sem células de cultivo, e com surfactantes sintéticos comerciais. O terceiro capítulo consiste em ensaios de desaguamento de lodo de ETE com bactéria acidófila (*A. thiooxidans*), avaliando diferentes concentrações de inóculo e estabelecendo um comparativo com o sobrenadante do inóculo, sem células de cultivo, e com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa*.

OBJETIVOS

No presente trabalho avaliou-se o desaguamento de lodo proveniente de duas ETEs utilizando bactéria do gênero *Acidithiobacillus* (*A. thiooxidans*) e levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*). Os objetivos específicos foram:

- 1) Identificar a melhor concentração de inóculo de *A. thiooxidans* e *R. mucilaginosa* no desaguamento do lodo;
- 2) Avaliar o desaguamento com *A. thiooxidans* e *R. mucilaginosa* isoladamente e combinadas por meio de coinoculação;
- 3) Analisar o desaguamento com os sobrenadantes livres de células de cultivo de *A. thiooxidans* e *R. mucilaginosa* e comparar com seus respectivos inóculos;
- 4) Comparar o desaguamento com o sobrenadante de *R. mucilaginosa* com o desaguamento utilizando surfactantes sintéticos comerciais.

REFERÊNCIAS

- BIZIKOVA, L.; ROY, D.; SWANSON, D.; VENEMA, H. D.; MCCANDLESS, M. The water-energy-food security nexus: towards a practical planning and decision-support framework for landscape investment and risk management. **International Institute for Sustainable Development – IISD Report**, Manitoba-Canadá. 2013. Disponível em: <<https://www.iisd.org/publications/report/water-energy-food-security-nexus-towards-practical-planning-and-decision>>. Acesso em 20 de julho de 2022.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.
- CAMARGO, F. P.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Removal of Toxic Metals from Sewage Sludge Through Chemical, Physical, and Biological Treatments - a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, p. 227-433, 2016.
- ELICKER, C.; SANCHES-FILHO, P. J.; CASTAGNO, R. L. Electroremediation of heavy metals in sewage sludge. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 365–371, 2014.
- HUO, M.; ZHENG, G.; ZHOU, L. Enhancement of the dewaterability of sludge during bioleaching mainly controlled by microbial quantity change and the decrease of slime extracellular polymeric substances content. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 190–197, 2014.
- KURADE, M. B.; MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; YU, S-M.; WONG, J. W. C. Sludge conditioning using biogenic flocculant produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* for enhancement in dewaterability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 179–185, 2016.
- LIU, F.; ZHOU, L.; ZHOU, J.; SONG, X.; WANG, D. Improvement of sludge dewaterability and removal of sludge-borne metals by bioleaching at optimum pH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221–222, p. 170–177, 2012.
- LIU, H.; YANG, S.; SHI, J.; XU, X.; LIU, H.; FUA, B. Towards understanding the dewatering mechanism of sewage sludge improved by bioleaching processing. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 53–59, 2016.

- LU, Y.; WU, R.; ZHANG, J.; LIU, H.; DAI, Y. Effects of phase separation on dewaterability promotion and heavy metal removal of sewage sludge during bioleaching. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 13971–13982, 2021.
- NEYENS, E.; BAEYENS, J.; DEWIL, R.; HEYDER, B. D. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. **Journal of Hazardous Materials**, v. 106B, p. 83–9, 2004.
- RASTEGAR, S. O.; MOUSAVI, S. M.; SHOJAOSADATI, S. A. Cr and Ni recovery during bioleaching of dewatered metal-plating sludge using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 61–68, 2014.
- WONG, J. W. C.; ZHOU, J.; KURADE, M. B.; MURUGESAN, K. Influence of ferrous ions on extracellular polymeric substances content and sludge dewaterability during bioleaching. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 78–83, 2015.
- XIE, S.; YU, G.; LI, C.; YOU, F.; LI, J.; TIAN, R.; WANG, Y. Dewaterability enhancement and heavy metals immobilization by pig manure biochar addition during hydrothermal treatment of sewage sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 16537–16547, 2019.
- ZHENG, G.; ZHOU, L.; WANG, S. An acid-tolerant heterotrophic microorganism role in improving tannery sludge bioleaching conducted in successive multibatch reaction systems. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 4151–4156, 2009.
- ZHENG, G.; WANG, Z.; WANG, D.; ZHOU, L. Enhancement of sludge dewaterability by sequential inoculation of filamentous fungus *Mucor circinelloides* ZG-3 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* LX5. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 216–223, 2016.
- ZHOU, J.; ZHENG, G.; ZHOU, L.; LIU, F.; ZHENG, C.; CUI, C. The role of heterotrophic microorganism *Galactomyces* sp. Z3 in improving pig slurry bioleaching. **Environmental Technology**, v. 34, p. 35–43, 2013.
- ZHOU, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, J.; XIA, S. Understanding key constituents and feature of the biopolymer in activated sludge responsible for binding heavy metals. **Chemical Engineering Journal**, v. 304, p. 527–532, 2016.
- ZHOU, Q.; GAO, J.; LI, Y.; ZHU, S.; HE, L.; NIE, W.; ZHANG, R. Bioleaching in batch tests for improving sludge dewaterability and metal removal using *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* after cold acclimation. **Water Science and Technology**, v. 76, p. 1347–1359, 2017.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aspectos microbiológicos do desaguamento de lodo de esgoto via remoção de Substâncias Poliméricas Extracelulares durante o processo de biolixiviação: uma revisão

Resumo

O lodo consiste em um importante componente das estações de tratamento de esgoto sanitário, porém concentra patógenos, poluentes orgânicos e metais potencialmente tóxicos, sendo fundamental seu tratamento adequado, que inclui seu desaguamento, pois afeta adversamente sua subsequente destinação. Muitas técnicas têm sido empregadas na tentativa de promover um desaguamento eficaz e remover poluentes do lodo, mas o alto custo dos tratamentos físico-químicos e o risco de causar poluição secundária dificultam a aplicação em maior escala, bem como seu reaproveitamento. Portanto, os tratamentos biológicos, como a biolixiviação, têm se tornado uma escolha cada vez mais promissora, pois apresentam benefícios econômicos e ambientais, que com melhorias podem viabilizar o aproveitamento do lodo como recurso. O objetivo desta revisão bibliográfica foi investigar a produção científica dos últimos doze anos, a respeito da influência dos aspectos microbiológicos de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*) no desaguamento de lodo de esgoto durante o processo de biolixiviação. Os objetivos específicos foram elucidar a influência das frações de EPS no desaguamento do lodo, identificar os principais microrganismos envolvidos na geração de EPS e identificar os principais microrganismos envolvidos na sua remoção durante a biolixiviação. Esta revisão da literatura contribui com o entendimento dos aspectos microbiológicos do desaguamento durante o processo de biolixiviação e fornece informações úteis para pesquisas futuras sobre a aplicação da biolixiviação no tratamento de lodo de esgoto.

Palavras-chave: *Acidithiobacillus*; *Firmicutes*; diversidade microbiana; proteínas; *Proteobacteria*.

Abstract

Sludge is an important component of conventional sewage treatment plants, but it concentrates pathogens, organic pollutants and potentially toxic metals, and its adequate treatment, which includes dewatering, is essential, as it adversely affects its subsequent disposal. Many techniques have been employed to promote effective dewatering and remove pollutants from sludge, but the high cost of physicochemical treatments and risk of causing secondary pollution make it difficult to apply on a larger scale, as well as reuse the sludge. Therefore, biological treatments, such as bioleaching, have become an increasingly popular choice, as they have economic and environmental benefits, which with improvements can enable the use of sludge as a resource. The objective of this bibliographic review was to investigate the scientific production of the last twelve years, regarding the microbiology of Extracellular Polymeric Substances (EPS) influence on sewage sludge dewatering during the bioleaching process. The specific objectives were to elucidate the influence of EPS fractions on sludge dewatering, to identify the main microorganisms involved in EPS generation and identify the main microorganisms involved in its removal during bioleaching. This literature review will help to understand the microbiological aspects of dewatering during the bioleaching process and will provide useful information to improve future research on the application of bioleaching in sewage sludge treatment.

Keywords: *Acidithiobacillus*; *Firmicutes*; microbial diversity; proteins; *Proteobacteria*.

1.1 INTRODUÇÃO

O lodo é um importante componente das ETE, porém concentra patógenos, poluentes orgânicos e metais potencialmente tóxicos, sendo fundamental o tratamento adequado desse resíduo, pois pode resultar em riscos significativos à saúde e impactos ambientais, como a contaminação solo, corpos d'água e desequilíbrio dos ecossistemas. A contaminação por metais constitui um importante risco à saúde pública e ao meio ambiente devido à sua toxicidade, não biodegradabilidade, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar. Cádmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni), zinco (Zn), chumbo (Pb) e arsênio (As) são os metais comumente detectados no lodo de esgoto (CAMARGO et al. 2016). Além disso, as tecnologias de remediação convencionais possuem custos elevados e podem gerar subprodutos tóxicos (GUPTA & DIWAN 2017; GONG et al. 2018).

Uma das etapas essenciais no tratamento do lodo é o desaguamento, de modo a minimizar seu volume, facilitar o transporte, aumentar o poder calorífico, aumentar a eficiência quando o destino é a geração de energia, ou até mesmo reduzir a produção de lixiviados quando a destinação final são aterros sanitários (WONG et al. 2016; WU et al. 2020).

Nestes aspectos, a biolixiviação constitui uma abordagem inovadora, pois além da conhecida capacidade de remoção dos metais presentes no lodo, estudos apontam um potencial simultâneo de desaguamento do lodo (PATHAK et al. 2009; WONG et al. 2015; LIU et al. 2016). As bactérias mais utilizadas em processos de biolixiviação são do gênero *Acidithiobacillus*, mais especificamente *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* (FANG & ZHOU, 2007), que liberam H^+ pela hidrólise do Fe^{3+} e Fe^{2+} reduzindo assim o pH e solubilizando os metais presentes no lodo (ZHENG et al., 2009; RASTEGAR et al., 2014). O desaguamento do lodo durante o processo de biolixiviação relaciona-se a capacidade de liberação da água ligada em EPS (HUO et al., 2014; WONG et al., 2015; LIU et al., 2016).

Os principais parâmetros descritos para mensurar o desaguamento do lodo são o Tempo de Sucção Capilar (CST, do inglês *Capillarity Suction Time*), Tempo de Filtração (TTF, do inglês *Time to Filter*) e Resistência Específica à Filtração (SRF, do inglês *Specific Resistance to Filtration*), de modo que, valores mais baixos de SRF, TTF e CST são considerados indicativos de melhor desaguamento. Por meio do processo de biolixiviação foram identificadas reduções nos polissacarídeos e proteínas de EPS em 97% e 76%, respectivamente, e embora outros fatores tenham sido correlacionados com o desaguamento, a biossubstituição da comunidade microbiana foi identificada como um fator decisivo para reduzir EPS e melhorar o desaguamento (LIU et al. 2016).

De modo semelhante, em ZHANG et al. (2018) o desaguamento também foi aprimorado em um experimento de biolixiviação com 5% de inóculo, atingindo desaguamento máximo em pH próximo a 2,3, no qual CST e SRF foram reduzidos em 74% e 62%, respectivamente, enquanto o teor total de EPS reduziu em 71%. KURADE et al. (2014) compararam o floculante férrico produzido por *A. ferrooxidans* com polímeros comerciais de poliacrilamida e constataram que em apenas 1 hora de tratamento, o floculante produzido por *A. ferrooxidans* reduziu o CST e SRF do lodo em 92 e 91%, respectivamente, em comparação com reduções de 89 e 72% utilizando o polímero.

Embora vários estudos anteriores já tenham investigado os fatores que influenciam o desaguamento do lodo e muitos tenham se dedicado a melhorar essa capacidade por meio de diferentes abordagens e tecnologias (físicas, químicas e biológicas), ainda existem muitas lacunas em relação à microbiologia de EPS e correlação com o processo de desaguamento. Estudos correlacionaram o aprimoramento do desaguamento com alterações na diversidade e composição de EPS (ZHOU et al. 2014), no entanto, a influência de microrganismos nessas alterações, tanto na geração e redução de EPS e suas frações solúveis e ligadas, quanto no conteúdo de proteínas, carboidratos e outras substâncias húmicas, ainda não são completamente compreendidos. Uma revisão de literatura compilando e sistematizando esses aspectos microbiológicos do EPS torna-se especialmente relevante para o avanço das pesquisas em desaguamento de lodo por biolixiviação.

Portanto, o objetivo desta revisão bibliográfica foi investigar a produção científica dos últimos doze anos a respeito da influência da microbiologia de EPS no desaguamento do lodo de esgoto durante o processo de biolixiviação. Os objetivos específicos foram: (i) elucidar a influência das frações de EPS no desaguamento do lodo; (ii) identificar os principais microrganismos envolvidos na geração de EPS; (iii) identificar os principais microrganismos envolvidos na remoção de EPS durante a biolixiviação; e (iv) orientar perspectivas futuras de pesquisa sobre melhorias no uso de biolixiviação para desaguamento de lodo de esgoto.

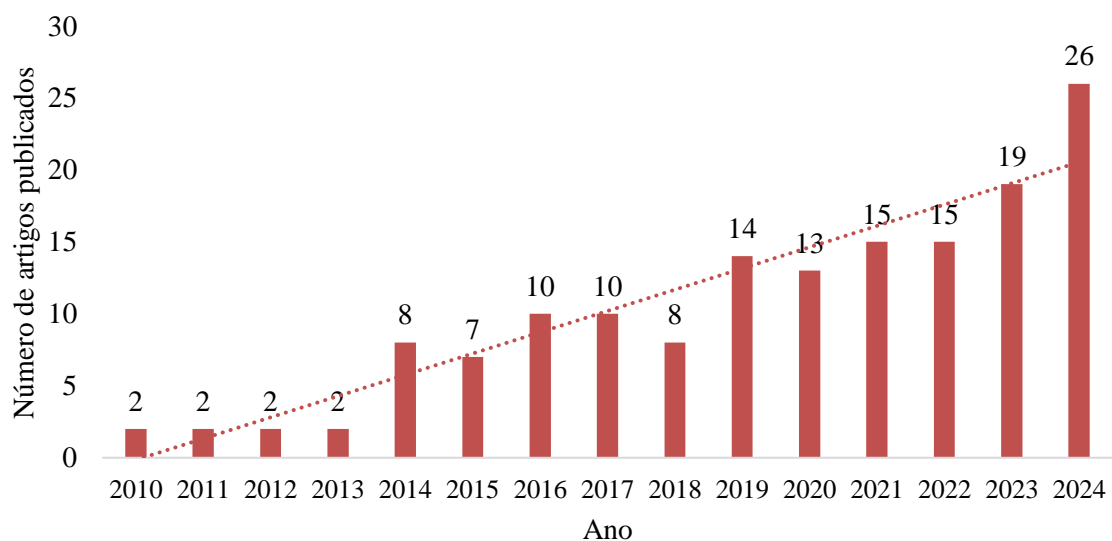
A revisão da literatura incluída neste trabalho contribui com o entendimento dos aspectos microbiológicos do desaguamento, uma vez que mudanças na comunidade microbiana, teor de água ligada e teor de EPS do lodo foram identificados como os fatores dominantes (taxas de contribuição mais altas) para o desaguamento durante o processo de biolixiviação (HUO et al. 2014). A compreensão desses aspectos microbiológicos fornece informações úteis para aprimorar as pesquisas sobre a aplicação da biolixiviação no tratamento de lodo de esgoto, bem como contribui com possíveis direcionamentos para o desenvolvimento de pesquisas nessa área.

1.2 METODOLOGIA DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão foi escrita com base em uma pesquisa bibliográfica aprofundada e revisão de artigos de periódicos usando os bancos de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Science Direct*, concatenando as palavras-chave “*Sludge AND Dewatering AND Extracellular Polymeric Substances AND Bioleaching*”. O horizonte temporal para a seleção dos artigos foram os últimos 14 anos (2010 a 2024), período em que houve um aumento significativo no número de artigos publicados (Figura 1.1). Do total de artigos obtidos na busca, 57,5% das publicações sobre o tema foram dos últimos 5 anos do período analisado (2020 a 2024).

Na pesquisa, foram obtidos 173 artigos, mas 20 foram descartados por duplicidade entre as bases de dados. Os 153 artigos restantes foram cuidadosamente analisados e as informações sobre o desaguamento do lodo durante o processo de biolixiviação foram sistematizadas e discutidas nesta revisão. Além disso, foi realizada uma investigação sobre a influência de EPS e suas frações no desaguamento do lodo e dos microrganismos envolvidos na sua geração, bem como na sua remoção via biolixiviação. Artigos adicionais, não necessariamente incluídos no horizonte temporal, foram utilizados para consolidar conceitos teóricos ou temas de especial relevância.

Figura 1.1. Número de publicações sobre o tema nos últimos catorze anos. Bancos de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Science Direct*

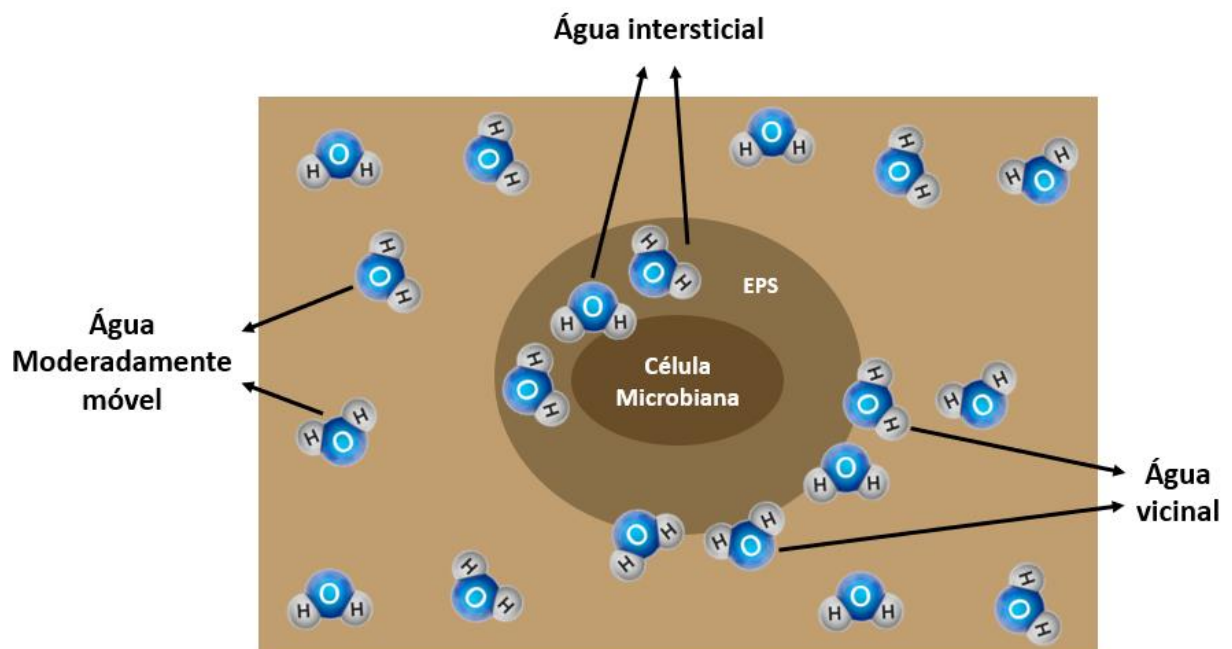


Fonte: Autor (2024).

1.3. MECANISMOS DE DESAGUAMENTO DE LODO

A água nos flocos de lodo pode ser encontrada em três situações conforme a Figura 1.2: (i) forma moderadamente móvel, que representa 65 a 85% do teor total de água do lodo, podendo ser definida como a fase com menor influência da fase sólida e pode ser parcialmente separado por tecnologias mecânicas; (ii) água vicinal, que representa de 10 a 25% do teor total de água, e é definida como água aderida à fase sólida por capilaridade; finalmente, (iii) água intersticial, definida como a água de ligação interna, retida no floco de lodo que representa apenas cerca de 10% do teor total de água do lodo e é difícil de remover mecanicamente (CAO et al. 2021). As abordagens exploradas na literatura referem-se à conversão de água vicinal e intersticial, integradas ao lodo por ligações químicas ou forças capilares, em água moderadamente móvel (YANG et al. 2020; WANG et al. 2021).

Figura 1.2. Distribuição de água em flocos de lodo



Fonte: Autor (2023).

O desaguamento do lodo de esgoto é função de diversos fatores físicos, químicos e biológicos, incluindo morfologia, tamanho e carga superficial das partículas do lodo, pH, potencial zeta, hidrofobicidade e presença/estrutura/composição/microbiologia de EPS (DAI et al. 2018).

A viscosidade é um fator reológico que reflete a retenção de água e a estabilidade dos flocos de lodo. Tem correlação com o tamanho das partículas, pois uma maior proporção de partículas finas no lodo resulta em maior viscosidade, maior SRF e, conseqüentemente, menor desempenho de desaguamento (CAO et al. 2021). LIU et al. (2022) identificaram uma correlação positiva significativa entre viscosidade e desempenho de desaguamento (coeficiente de Pearson $> 0,9898$, p -valor $< 0,05$). LIN et al. (2022) correlacionam a viscosidade do lodo com o teor de EPS na célula, com a diminuição da viscosidade decorrente da desintegração e quebra de EPS.

A carga superficial dos flocos de lodo é geralmente caracterizada pelo potencial zeta, que expressa a magnitude da repulsão ou atração eletrostática entre as partículas. Quanto mais forte for a carga negativa do lodo, mais estáveis são os flocos e mais difícil é a floculação e o desaguamento. Flocos de lodo têm uma carga de superfície negativa e um potencial zeta entre -30 e -10 m · V, então a neutralização de carga é uma das abordagens de condicionamento de lodo (CAO et al. 2021). O condicionamento químico pode neutralizar a carga na superfície do lodo adicionando produtos químicos, como floculantes ou coagulantes, que adsorvem na superfície as partículas negativas do lodo, desestabilizando o sistema e promovendo a agregação dos flocos. No entanto, existe uma extensão de floculação ideal para melhorar o desaguamento, que depende do pH da solução, pois após o ponto isoelétrico ser atingido (carga elétrica líquida igual a zero) ocorre a reversão da carga superficial e quebra do agregado de floco de lodo (HYRYCZ et al. 2022).

Como o mecanismo de desaguamento por floculação se baseia em alterar a carga superficial das partículas e promover a agregação dos flocos de lodo, ele se restringe ao desaguamento predominantemente de água moderadamente móvel, sendo que para um desaguamento mais completo é necessário liberar a água vicinal e intersticial, para os quais o conteúdo EPS tem especial relevância.

A natureza química da matriz de EPS também é complexa e extremamente diversa devido à forma e concentração de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas, que por sua vez diferem pela composição de monossacarídeos, carga, ligações entre unidades monoméricas, presença de cadeias laterais repetidas, comprimento e frequência de ramificação da fração de monômero, e esses fatores são cruciais na determinação das características das macromoléculas de EPS e do potencial de desaguamento (SHUKLA et al. 2019). Portanto, o teor de EPS também influencia a carga superficial, o potencial zeta e a estabilidade dos flocos de lodo, aumentando a dificuldade de desaguamento mecânico.

Os microrganismos podem liberar EPS por vários fatores que governam o metabolismo microbiano, devido à lise celular ou secreção como uma reação ao ambiente externo, por exemplo, mudanças no pH, presença de metais ou outras substâncias tóxicas, ou um simples mecanismo de proteção contra perda de água e ressecamento celular. Dentre as diversas macromoléculas que compõem EPS, sabe-se que as proteínas têm papel de destaque em relação aos polissacarídeos e às substâncias húmicas, pois seu caráter hidrofílico (afinidade pela água) dificulta os processos de desaguamento (SHAO et al. 2009; DAI et al. 2018). Além disso, existem proteínas estruturais em EPS que atuam como pontes entre a superfície extracelular e a superfície bacteriana (FLEMMING & WINGENDER, 2010). No estudo de YU et al. (2018), as correlações entre as composições das frações de EPS e o desempenho de desaguamento do lodo foram avaliadas e revelaram que o CST foi significativamente correlacionado com o teor de proteína EPS (coeficiente de Pearson $> 0,72$; p -valor $< 0,01$). O estudo aponta que a proteína de EPS tem papel decisivo no desaguamento do lodo devido à sua alta hidrofiliabilidade, que afeta negativamente o desaguamento. No entanto, os resultados foram baseados em CST empíricos e métodos colorimétricos (método de Lowry para determinação de proteínas e método de fenol-sulfoácido para determinação de polissacarídeos), que não fornecem precisão adequada, especialmente em relação a composições específicas de EPS.

No processo de desaguamento, destacam-se dois mecanismos de ligação das moléculas de água na matriz de EPS, a saber: (i) interações eletrostáticas entre os dipolos permanentes da molécula de água e os grupos funcionais de EPS; e (ii) ligações químicas do tipo ligação de hidrogênio entre moléculas de água e grupos hidroxila do EPS (NEYENS et al. 2004). Muitos métodos foram explorados na literatura para desaguamento do lodo usando diferentes abordagens, físicas, químicas e biológicas (Tabela 1.1), no entanto, a maior dificuldade relatada foi o rompimento da água fortemente ligada em EPS, que é o desafio atual para o desaguamento efetivo do lodo de esgoto. Além disso, os diferentes métodos apresentam importantes vantagens e limitações, que devem ser cuidadosamente avaliadas considerando a aplicação do desaguamento em larga escala, com viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental.

Os métodos físicos de tratamento de lodo incluem tratamento mecânico (COLIN & GAZBAR 1995; LO et al. 2001), tratamento térmico (WANG et al. 2017; ZHANG & YAO 2022), tratamento de ultrassom (MOBARAKI et al. 2018; LIPPERT et al. 2020) e tratamento elétrico (MAHMOUD et al. 2016; LI et al. 2022a; ZHANG et al. 2022a). O tratamento mecânico, que inclui tecnologias como centrífuga e filtro prensa, embora amplamente utilizado em estações de tratamento, apresenta ineficiência na remoção da água vicinal e intersticial,

limitando as possibilidades de reutilização posterior do lodo (RAO et al. 2017; LI et al. 2018; RAO et al. 2022). Assim, há a necessidade de aprimorar as técnicas de desaguamento de lodo.

Técnicas de ultrassom, térmica e elétrica podem ser aplicadas como métodos complementares ao desaguamento mecânico, e embora estudos indiquem eficiência de desaguamento (MA et al. 2021; GAO et al. 2021), essas tecnologias requerem equipamentos especializados, consumo de energia e conseqüentemente maiores custos de implementação e operação (ZHANG et al. 2022a; RAO et al. 2022).

A maioria das técnicas de condicionamento químico baseia-se em melhorar a floculação, alterando a carga dos flocos de lodo e, para isso, requer a adição de produtos químicos como ácidos/bases (YANG et al. 2013; GE et al. 2019; HAKEEM et al. 2020; HE et al. 2022) e floculantes ou coagulantes (XIONG et al. 2018; JIANG et al. 2021). Inicialmente sais metálicos de ferro e alumínio eram amplamente utilizados em ETE para tratamento de lodo, mas o alto consumo de produtos químicos e riscos relacionados a subprodutos tem direcionado as pesquisas na busca por alternativas mais eficientes, econômicas e sustentáveis. Entre os floculantes sintéticos, as poliacrilamidas são amplamente utilizadas, mas ainda existem controvérsias quanto à toxicidade e aos riscos ambientais secundários devido aos subprodutos de sua degradação (HYRYCZ et al. 2022). Os coagulantes inorgânicos podem restringir a reciclagem do lodo para aplicação em solo agrícola, pois a introdução de grandes quantidades de cátions metálicos, como Al^{3+} e Fe^{3+} , e ânions inorgânicos, como SO_4^{2-} e Cl^- , podem aumentar a salinidade (CAO et al. 2021).

A pesquisa também aponta para o uso de condicionadores compostos para desaguamento profundo de lodo, incluindo surfactantes, ácidos e floculantes (HE et al. 2022). Polímeros orgânicos, como Cloreto de Polidimetildialilamônio (PDMD) têm uma função de floculação ao neutralizar a carga de lodo e foi relatado que o PDMD combinado com ácido tânico (TA, do inglês *Tanic acid*) melhorou o desempenho de desaguamento devido à capacidade do TA de precipitar proteínas (LIU et al. 2022). No entanto, são necessários mais estudos sobre os possíveis efeitos colaterais dos condicionadores combinados, principalmente quando o objetivo é a reciclagem via aplicação de lodo em terras agrícolas, o que afetará diretamente a saúde humana.

Ainda, na categoria de processos de desaguamento químico, os Processos Oxidativos Avançados (AOP, do inglês *Advanced Oxidative Process*) foram descritos na literatura como bastante eficientes e promissores. O princípio de ação do AOP é a produção de radicais livres com forte efeito oxidante, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), persulfato, ferrato, permanganato e ozônio (O_3), que podem oxidar proteínas, polissacarídeos e lipídios de EPS a

substâncias orgânicas solúveis, resultando na quebra do EPS e promovendo um efeito de desaguamento significativo (HE et al. 2015; MO et al. 2015; GUAN et al. 2018; LIN et al. 2022). Além disso, os AOP também foram amplamente utilizados para a degradação de poluentes, íons metálicos podem ser transformados em um estado livre, compostos orgânicos persistentes e substâncias hormonais podem ser degradados com eficiência (RODRIGUEZ et al. 2011, VILLEGAS-GUZMAN et al. 2017; SGROI et al. 2021). As limitações dos AOP consistem na necessidade de dosagem de produtos químicos para geração de radicais livres e controle do pH, o que pode resultar em riscos ambientais secundários. Outra limitação para a aplicação do processo em larga escala é a necessidade de combinar o AOP com alguns processos adicionais de desaguamento por limitações da sua influência na água moderadamente móvel (LIN et al. 2022).

Os AOP também podem ser combinados com processos físico-químicos de desaguamento para potencializar a geração de radicais oxidantes, bem como reduzir a dosagem de reagentes por meio de fontes auxiliares de energia (calor, eletricidade, magnetismo). Ultrassom pode contribuir para a ativação de H_2O_2 para produzir OH^\bullet no processo Fenton, promovendo economia de Fe^{2+} e H_2O_2 e tempo de reação (JIANG et al. 2014). O método de Fenton combinado com um processo eletroquímico pode acelerar a ruptura dos flocos de lodo, reduzindo o tempo de reação (MASIHI & GHOLIKANDI 2018). No entanto, o uso de métodos combinados deve considerar não apenas a maximização do desaguamento, mas também as consequências técnicas, econômicas e ambientais.

Em geral, os métodos de desaguamento que dependem da dosagem de produtos químicos limitam sua aplicação em larga escala, devido ao custo e complexidade operacional, além dos problemas ambientais associados devido aos riscos de poluição secundária. Nesse aspecto, os processos biológicos podem ser apontados como uma alternativa mais sustentável, de menor custo e ecologicamente amigável, permitindo uma reciclagem mais segura do lodo, inclusive para fins agrícolas.

O desaguamento enzimático do lodo tem princípio de ação semelhante aos processos oxidativos, promovendo a ruptura de EPS e liberando água intersticial, com a vantagem de exigir uma dosagem menor que os AOP, possuindo biodegradabilidade, não toxicidade e, portanto, menores riscos ambientais de geração de poluentes secundários (WU et al. 2020). As limitações consistem principalmente na necessidade de mais estudos para identificar as enzimas apropriadas para diferentes tipos de lodo, que possuem composições diversas e complexas, bem como para melhorar as condições de reação para futuras aplicações em larga escala (CHEN et al. 2015; LU et al. 2011).

O processo de biolixiviação é bem conhecido na literatura como uma forma eficiente de tratar metais, inclusive em lodo de esgoto (GUPTA & DIWAN 2017; XU et al. 2017; GENG et al. 2020; ZHANG et al. 2022b), mas estudos apontam potencial simultâneo de melhoria no desaguamento (KURADE et al. 2014; ZHANG et al. 2018; YANG et al. 2020). Além disso, o custo operacional da biolixiviação é menor em relação aos AOP, devido à possibilidade de acidificação e oxidação do lodo com produtos químicos comuns e mais baratos, como por exemplo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e S_0 (LU et al. 2021). No entanto, a aplicação em maior escala da biolixiviação ainda é limitada pela velocidade de reação e instabilidade no efeito da biolixiviação, mas isso pode ser melhorado com mais estudos sobre os mecanismos de desaguamento e conhecimento sobre as alterações nas comunidades microbianas durante a biolixiviação.

A biolixiviação também é explorada em combinação com outras estratégias de desaguamento, como ultrassom (HUANG et al. 2020), processos eletroquímicos (XIAO et al. 2019) e AOP, como processos do tipo Fenton (ZHU et al. 2013; LIU et al. 2015; FONTMORIN & SILLANPÄÄ 2015; MOHAMMADI et al. 2017).

Cavitação ultrassônica de baixa densidade ($0,018 \text{ W} \cdot \text{mL}^{-1}$) e tempo de exposição curto (8 segundos) aplicada como pré-tratamento da biolixiviação apresentou alterações na diversidade microbiana, melhoria no desaguamento, redução da SRF em 7,59% e redução no tempo de reação em 12,5%, que consiste na principal limitação da biolixiviação aplicada como tratamento único (HUANG et al. 2020). A hipótese deste estudo foi que o tratamento ultrassônico acelerou as células bacterianas, tornando-as mais afetadas pela bioacidificação e bio-oxidação.

XIAO et al. (2019) aplicaram um pré-tratamento eletroquímico para acelerar o processo de acidificação do lodo durante a biolixiviação e concluíram que 5 min de eletrólise (20 Volts) seguido de 12 horas de biolixiviação pode ser o tempo ideal para melhorar o desaguamento do lodo, condições nas quais se obteve uma redução de 67,3% na CST. Além disso, análises de diversidade microbiana indicaram *Acidocella*, *Nitrospira*, *Alicyclobacillus* e *Rhodanobacter* como os gêneros bacterianos dominantes no tratamento. *Thiobacterales*, enriquecido pelo tratamento combinado, foi um potencializador na conversão de enxofre em ácido sulfúrico, redução do pH, carga de neutralização e melhoria do desaguamento.

A biolixiviação utilizada como pré-tratamento para reação do tipo Fenton foi investigada em alguns estudos, uma vez que a biolixiviação reduz o pH do lodo para uma faixa próxima ao ideal para a reação do tipo Fenton. ZHU et al. (2013) identificaram uma redução no pH do lodo de 6,95 para 2,5 após 5 dias de biolixiviação, e nessas condições houve uma redução

de mais de 50% dos metais presentes no lodo. Após a biolixiviação, o lodo foi submetido a uma reação do tipo Fenton com $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de H_2SO_4 e a remoção do metal foi mais eficaz do que a biolixiviação como tratamento único por 15 dias. Em LIU et al. (2015), a mesma redução de pH foi obtida em 2 dias de biolixiviação e o desaguamento pelo processo combinado (SRF de $3,75 \times 10^8 \text{ s}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) foi maior do que o desaguamento do lodo pelo processo Fenton simples (SRF de $4,26 \times 10^9 \text{ s}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

Em um estudo semelhante, biolixiviação seguida de reação de Fenton, resultou em elevado desaguamento do lodo (6 dias de tempo de biolixiviação e reação do tipo Fenton com a adição de 36 m·M, 180 m·M e 360 m·M de H_2O_2). Neste estudo, foi demonstrado que a melhoria no desaguamento não foi diretamente proporcional ao aumento na concentração de H_2O_2 (FONTMORIN et al. 2015). Em MOHAMMADI et al., os processos combinados permitiram uma menor dose de H_2O_2 e Fe^{2+} para melhoria do desaguamento. Com baixas concentrações de H_2O_2 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e Fe^{2+} ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) obtiveram resultados semelhantes de remoção de materiais orgânicos e sólidos suspensos em comparação com o processo Fenton como tratamento único (MOHAMMADI et al. 2017).

Portanto, a dosagem de H_2O_2 é uma importante limitação do processo Fenton, que pode ser minimizada com o pré-tratamento de biolixiviação. Porém, para o tratamento de maiores quantidades de lodo em larga escala, a dosagem de agentes químicos aumentará consideravelmente e conseqüentemente o custo de operação e possíveis impactos ambientais adversos.

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens das principais categorias de tecnologias para desaguamento de lodo de esgoto

Categoria	Técnica	Vantagens	Limitações	Referências
Físico	Mecânica	Eficiência na remoção da água moderadamente móvel	Ineficiente na remoção de água vicinal e intersticial e no consumo de energia.	COLIN & GAZBAR (1995); LO et al. (2001)
	Ultrassom	Desintegração dos flocos coloidais, ruptura de EPS, e liberação de água.	Equipamentos especializados, dificuldade de ampliação e consumo de energia.	MOBARAKI et al. (2018); LIPPERT et al. (2020)
	Térmica	Desintegração dos flocos coloidais, ruptura de EPS, e liberação de água.	Equipamentos especializados e consumo de energia.	WANG et al. (2017); ZHANG & YAO (2022)
	Elétrica	Eletroforese, eletromigração, eletromose, eletrólise. Ação de degradação de poluentes.	Equipamento especializado, corrosão de eletrodos e consumo de energia.	MAHMOUD et al. (2010); MAHMOUD et al. (2011); MAHMOUD et al. (2016); LI et al. (2022); ZHANG et al. (2022)
Químico	Coagulação/Floculação	Agregação dos flocos de lodo.	Dosagem de produtos químicos e riscos ambientais secundários. Ineficiente na remoção de água intersticial.	XIONG et al. (2018); JIANG et al. (2021); HYRYCZ et al. (2022)
	Ácido/Base	Regulação da carga superficial, ruptura de EPS e liberação de água.	Equipamentos anticorrosivos, dosagem de produtos químicos e riscos ambientais secundários (corrosão e toxicidade biológica).	YANG et al. (2013); GE et al. (2019); HAKEEM et al. (2020); HE et al. (2022)
	AOP	Ruptura de EPS e liberação de água. Ação de degradação de poluentes.	Dosagem química complexa em várias etapas, controle de pH e riscos ambientais secundários (corrosão, persulfato tóxico, resíduos de cloro).	HE et al. (2015); MO et al. (2015); GUAN et al. (2018); LIN et al. (2022)
Biológico	Bióliviação	Tratamento de metais simultaneamente ao desaguamento.	Inoculação e tempo de reação. Aplicação em desaguamento em fase de estudo.	KURADE et al. (2016); LU et al. (2019); YANG et al. (2020)
	Enzimático	Ruptura de EPS	Controle de temperatura e pH, dosagem de produtos químicos. Aplicação em desaguamento em fase de estudo.	CHEN et al. (2015); LU et al. (2011); Wu et al. 2020

Fonte: Autor (2023).

1.4. PARÂMETROS DE MENSURAÇÃO DO DESAGUAMENTO DE LODO

CST, TTF e SRF são os parâmetros frequentemente utilizados para mensurar o desaguamento de lodo de esgoto em pesquisas em escala laboratorial, porém são métodos empíricos que requerem maior precisão (WEI et al. 2018; WU et al. 2020). Comparado com o TTF e o SRF, o CST pode ser apontado como uma metodologia mais simples e econômica, pois, diferentemente dos outros métodos citados, não requer fonte externa de pressão ou sucção. O teste de Filtração por Célula de Compressão (FCC, do inglês *Filtration Compression Cell*) pode ser apontado como um método aprimorado, comparado ao CST e SRF, para avaliar o desaguamento em escala laboratorial, porém, ainda existem limitações devido à variabilidade no tamanho, forma e composição das partículas do lodo. (WEI et al. 2018).

A extração de EPS também é amplamente utilizada para medir o desempenho do desaguamento, principalmente por meio da liberação do teor de água ligada. Os métodos de extração comumente aplicados incluem processos físicos de extração, como centrifugação, ultrassom ou aquecimento, que promovem a separação de EPS solúvel e fracamente ligado, e processos químicos, como resina de troca iônica, ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) ou HCHO/NaOH, para a separação do EPS fortemente ligado às células (CAO et al. 2021). Após a extração do EPS, análises adicionais podem ser necessárias para avaliar quantitativamente o teor de proteínas, polissacarídeos e substâncias húmicas, que geralmente são medidos por métodos colorimétricos (Kjeldahl, Biureto, Lowry, ácido bicinconínico (BCA), Bradford, antrona, fenol-sulfúrico, entre outros), cujos resultados podem ser subestimados ou superestimados em águas residuárias (WEI et al. 2018).

A espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS, do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*) e a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*) podem ser usadas para identificar grupos funcionais em EPS e relacioná-los em função do desaguamento. No entanto, um método mais sensível para identificar as frações e componentes do EPS é a Espectroscopia de Fluorescência de Matriz de Excitação/Emissão Tridimensional (3D-EEM, do inglês *Three-dimensional excitation emission matrix*), que permite a divisão do espectro 3D-EEM em regiões de fluorescência de compostos como compostos aromáticos, proteínas, compostos do tipo ácido fúlvico, tirosina/triptofano e ácidos húmicos (WU et al. 2020; LI et al. 2022b). LI et al. identificaram a partir do 3D-EEM que a posição de certos tipos de proteínas na fração

fortemente ligada de EPS pode contribuir para melhorar o desaguamento do lodo (LI et al. 2022b).

A proteômica também tem sido explorada em estudos de EPS, principalmente na caracterização de processos microbiológicos relacionados a proteínas extracelulares (ZHANG et al. 2015b, WU et al. 2020). Estudos de proteômica já identificaram que importantes funções moleculares estão relacionadas a atividades ligantes, por exemplo, proteínas ligantes aniônicas possuem maior quantidade de grupos funcionais amino livres em comparação com proteínas ligantes catiônicas, e tais características podem resultar em maiores interações com outros cátions, favorecendo a biofloculação (HU et al. 2020). No entanto, ainda existem limitações relacionadas aos procedimentos de extração de EPS e purificação de proteínas, para as quais WU et al. propõem o desenvolvimento de técnicas de microscopia e espectrofotometria juntamente com genômica, proteômica e glicômica (WU et al. 2020).

Outro aspecto importante que deve ser considerado em relação a EPS é a sua variabilidade no tipo de lodo e tratamento, que pode fornecer resultados muito diferentes em termos de composição e frações de EPS e, conseqüentemente, desempenho de desaguamento. Além disso, pesquisas ainda precisam elucidar aspectos microscópicos, estruturais e microbiológicos de EPS, que possam explicar os mecanismos relacionados ao desaguamento do lodo, podendo minimizar interferências como a variabilidade na composição e frações de EPS no lodo.

1.5. MICROBIOLOGIA DA BIOLIXIVIAÇÃO

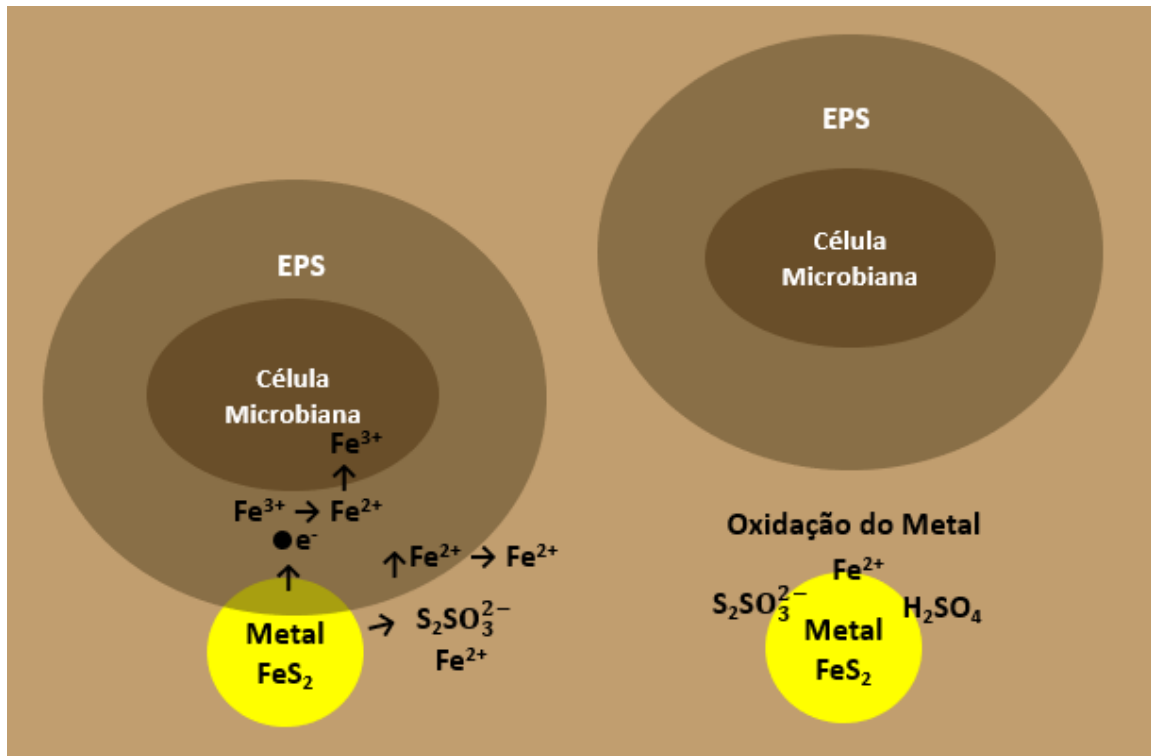
Os grupos de microrganismos que obtêm energia de compostos químicos são quimiolitotróficos e quimioautotróficos. Quimiolitotróficos são procariotos acidófilos que utilizam compostos inorgânicos, principalmente ferro (Fe^{2+}) e/ou enxofre reduzido (S_8 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S e polissulfeto), como fontes de energia. Além disso, podem ser classificados, de acordo com a temperatura ideal de crescimento, em mesofílicos e moderadamente termofílicos (que incluem principalmente bactérias) e termofílicos (incluindo arqueias) (SRICHANDAN et al., 2019). Na estabilização do metal, há oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} e redução de enxofre a ácido sulfúrico, H_2SO_4 (DENG et al. 2013; YANG et al. 2016; XU et al. 2017). Esses microrganismos encontram-se distribuídos nos filos: (i) α - β - γ -*Proteobacteria*, o maior filo de bactérias gram-negativas, cujos principais representantes na biolixiviação são *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Acidiferrobacter* e *Ferrovum*; (ii) *Nitrospirae*, também um filo de bactérias gram-negativas; (iii) *Firmicutes*, cuja maioria possui parede celular gram-positiva, e os principais representantes

na biolixiviação são *Alicyclobacillus* e *Sulfobacillus*; e (iv) *Actinobacteria*, um filo de bactérias gram-positivas, no qual *Ferrimicrobium*, *Acidimicrobium* e *Ferrithrix* são os representantes na biolixiviação. Entre archaea, representantes de biolixiviação são encontrados nos filos *Crenarchaeota* (*Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* e *Sulfurisphaera*), embora dois oxidantes acidofílicos Fe^{2+} sejam encontrados em *Euryarchaeota* (*Ferroplasma acidiphilum* e *Ferroplasma acidarmanus*) (FONTI et al. 2016). Em estudos de biolixiviação em lodo de esgoto, os microrganismos acidófilos mais citados no processo de biolixiviação são *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Na biolixiviação, a parede celular microbiana, mais especificamente a camada de EPS, atua como agente tensoativo, pois possui polissacarídeos, lipídios e proteínas, e os diversos grupos funcionais, como carboxilato, hidroxila, amino e fosfato, que pode se ligar a metais (GONG et al. 2018). A estabilização de metais pode ocorrer por contato ou não contato entre microrganismos e metais.

No processo de biolixiviação por contato mediado por EPS, o complexo Fe^{3+} ácido glicurônico recebe um elétron do metal com o qual está em contato, reduzindo o Fe^{3+} a Fe^{2+} , que é então difundido em direção à membrana bacteriana externa, onde é oxidado a Fe^{3+} , catalisada por citocromo (Cyc2) e/ou citocromo periplasmático (Cyc1) seguido por citocromo oxidase (Cox) (TAO & DONGWEI 2014; SRICHANDAN et al. 2019; GENG et al. 2020). Após extrações sucessivas de elétrons do metal, a porção de enxofre e o metal são liberados como tiosulfato ($S_2SO_3^{2-}$) e cátion metálico (Fe^{2+}) (SRICHANDAN et al. 2019). No mecanismo sem contato ocorre a oxidação de Fe^{2+} e enxofre (presente em solução e liberado pelo mecanismo de contato) em Fe^{3+} e ácido sulfúrico, que oxidam o metal (GENG et al. 2020) (Figura 1.3).

Figura 1.3. Mecanismos de biolixiviação mediados por EPS



Fonte: Autor (2023).

Além de bactérias e archaea, alguns fungos, como *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium purpurogenum*, também apresentam potencial para biolixiviação por meio da produção de metabólitos de baixo peso molecular, como os ácidos cítrico, pirúvico, oxálico e glucônico. A biolixiviação fúngica ocorre via solubilização de metais e formação de complexos solúveis em água ou por adsorção mediada por grupos funcionais em suas paredes celulares, como grupos carboxila, carbonila, amina, amida, hidroxila e fosfato (FONTI et al. 2016; XU et al. 2017; SRICHANDAN et al. 2019).

Estudos mostram que algumas características do esgoto podem inibir o crescimento de bactérias acidófilas e afetar negativamente o processo de biolixiviação, como a presença de ácidos orgânicos e matéria orgânica dissolvida (ZHOU et al. 2013). Assim, pesquisas recentes demonstram que a coinoculação de bactérias acidófilas quimioautotróficas com microrganismos quimiorganotróficos tolerantes a ácidos pode ser uma alternativa para esse problema, pois estabelece uma relação mutualística devido à capacidade desses organismos de metabolizar compostos orgânicos como fonte de energia e carbono e também para produzir biosurfactantes que podem até melhorar o processo de biolixiviação (BANAT et al. 2010; ZHENG et al. 2016a; UYSAL e CELIK 2019).

Cepas de leveduras tolerantes a ácidos que produzem biossurfactantes, incluindo *Meyerozyma guilliermondii* - sophorolipids (CAMARGO et al. 2018) e *Rhodotorula mucilaginosa* - glicoproteínas coinoculadas ao processo de biolixiviação podem reduzir a toxicidade da matéria orgânica dissolvida em espécies de *Acidithiobacillus* (ZHANG et al. 2018; CAMARGO et al. 2018).

Os resultados da biolixiviação de metais relatados na literatura apontam para uma alta eficiência em relação aos processos de lixiviação, envolvendo principalmente metais como Cu (34-100%), Cr (18-80%), Cd (18-69%), Pb (10-58%), Mn (58-99%), Ni (42-100%) e Zn (38-100%), cujas eficiências podem chegar a 100% para alguns metais (KIM et al. 2005; PATHAK et al. 2009; XU et al. 2017).

1.6. BIOLIXIVIAÇÃO E POTENCIAL SIMULTÂNEO DE DESAGUAMENTO

Além da conhecida alta eficiência da biolixiviação de metais, esse processo também ganhou destaque inovador na última década por apresentar potencial simultâneo de desaguamento de lodo (MARCHENKO et al. 2018; LU et al. 2021). Em comparação com outros métodos físicos e químicos, AOP e biolixiviação foram descritos como as tecnologias mais promissoras em termos de eficiência de desaguamento de lodo (LIU et al. 2012; WU et al. 2020). No entanto, o AOP tem custos operacionais mais elevados devido à necessidade de adição de oxidantes e pré-acidificação com ácidos inorgânicos, enquanto a biolixiviação não requer produtos químicos complexos e atinge a acidificação por meio de microrganismos (LU et al. 2021).

Assim como na biolixiviação de metais, *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* também se destacam no processo de desaguamento, pois os biofloculantes gerados podem reduzir o teor de EPS do lodo, liberando água ligada (HUO et al. 2014; KURADE et al. 2016).

A coinoculação de *A. thiooxidans* e *A. ferrooxidans* resultou em melhor desaguamento do lodo durante o processo de biolixiviação, conforme observado por uma redução no CST de 48,9s para 10s após a biolixiviação. O pH ótimo identificado para desaguamento foi entre 2,4 e 2,7. No entanto, embora tenha conseguido atingir uma faixa de pH adequada, atingiu CST abaixo dos 20s em pH <2,5, ou seja, antes mesmo de atingir as condições de biolixiviação (LIU et al. 2012).

Biofloculante produzido por *A. ferrooxidans* foi comparado com polímeros comerciais de poliácridamida usuais em desaguamento químico de lodos. Os resultados demonstraram melhor desaguamento usando o biofloculante, com reduções no CST e SRF do lodo de 92 e

91%, respectivamente, em comparação com reduções de 89 e 72% usando o polímero de poliacrilamida. Além de um aumento no poder calorífico de 18 e 27% com polímero e biofloculante, respectivamente. Esses resultados foram atribuídos a uma forte afinidade entre EPS e os íons de ferro do biofloculante, levando à neutralização de sua carga e agregação de flocos de lodo (KURADE et al. 2014). A biolixiviação com *A. ferrooxidans* foi comparada com a adição separada de ácido sulfúrico e Fe^{2+} e identificaram que esta adição não resultou em redução significativa da EPS do lodo, indicando que a acidificação química não foi decisiva para melhoria do desaguamento. Com a biolixiviação, observaram uma redução considerável no teor de EPS e uma redução de proteínas e polissacarídeos em 97% e 76%, respectivamente. Esses resultados foram atribuídos a alterações na comunidade microbiana do lodo biolixiviado (LIU et al. 2016).

O processo de biolixiviação em duas fases foi comparado com a biolixiviação em fase única, assumindo que a sinergia microbiológica é interrompida em algum ponto do processo de biolixiviação. Na biolixiviação em duas fases, observaram que o processo foi reduzido para 4 dias, em comparação com os 7 dias da biolixiviação em fase única e houve um aumento nas taxas de remoção de metal em 11,06 - 15,04%, 4,45 - 11,03%, 17,98 - 23,46% e 7,20 - 9,28% para Cd, Cr, Cu e Ni, respectivamente, o que pode estar relacionado ao aumento da abundância de *Acidithiobacillus spp.* Além disso, houve melhoria no desaguamento do lodo, com reduções de 25,0 - 33,3% no SRF e 14,2% no CST, correlacionada a valores de pH mais baixos, potencial zeta mais próximo do neutro ($ph \sim 7$) e teor reduzido de matéria orgânica dissolvida em biolixiviação de duas fases (LU et al. 2021).

1.7. SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES E MECANISMO DE DESAGUAMENTO

O teor de EPS representa entre 50-80% da massa do lodo e forma uma estrutura semelhante a um “gel” envolvendo e impedindo a perda de água pelo microrganismo, mas quando rompido melhora significativamente o potencial de desaguamento (WU et al., 2020; WANG et al., 2021). Por esta razão, conhecer o papel de EPS no desaguamento de lodo tornou-se um tema de grande relevância.

A composição de EPS inclui principalmente carboidratos, proteínas, lipídios e pequenas quantidades de ácidos nucleicos e substâncias húmicas (adsorvidas do ambiente) que conferem à sua matriz características muito específicas, como capacidade de formar biofilmes, adesão a superfícies, biodegradabilidade, proteção em ambientes severos, retenção de água para

minimizar a dessecação celular, adsorção a compostos orgânicos e inorgânicos, por exemplo, metais, e transferência de massa através do biofilme (MORE et al., 2014). Pesquisas indicam que a composição química de EPS tem proporções, como aproximadamente até 60% de proteínas, 40% a 95% de polissacarídeos, até 40% de lipídios, até 10% de DNA e vestígios de substâncias húmicas e pequenas moléculas (FLEMMING & WINGENDER, 2010; SHENG et al. 2010; SHUKLA et al. 2019). Proteínas e carboidratos possuem derivados como lipopolissacarídeos, lipoproteínas e glicoproteínas (SHENG et al., 2010).

No entanto, lodo aeróbio e lodo anaeróbio possuem composições de EPS diferentes e vários estudos indicam que a estabilização do lodo por digestão anaeróbia deteriora a capacidade de desaguamento do lodo, pois o lodo digerido possui maiores quantidades de EPS no lodo e maiores quantidades de ácidos húmicos (MURUGESAN et al., 2014; WONG et al., 2016; LIU et al., 2021; CAI et al., 2021). No entanto, estudos demonstram uma correlação negativa entre o teor de EPS e a capacidade de desaguamento do lodo digerido anaerobiamente (MURUNGESAN et al., 2016; ZHANG et al., 2018; CAI et al., 2021).

Existem diversas discussões sobre o teor ideal de EPS para desaguamento de lodo, cujo teor maior ou menor que esse teor ideal acarretaria menor capacidade de desaguamento. HOUGHTON & STEPHENSON sugerem um teor de EPS de 35 mg/gDM a partir do estudo de amostras de lodo de seis digestores anaeróbicos em escala laboratorial (HOUGHTON & STEPHENSON 2002). No entanto, ainda há necessidade de melhorias nos métodos de extração e quantificação de EPS para obter um teor ideal mais preciso e elucidar aspectos microscópicos, estruturais e microbiológicos.

Polissacarídeos hidratados, proteínas e moléculas de DNA caracterizam a hidrofiliabilidade das EPS, embora algumas EPS possam apresentar características hidrofóbicas, neste caso relacionadas à presença de grupos metil e acetil ligados nos polissacarídeos (MORE et al. 2014). Além disso, os grupos carboxila, hidroxila, fosforila e amida presentes na matriz de EPS permitem sua interação com cátions metálicos divalentes, estabelecendo uma ligação entre esses cátions metálicos e microrganismos, favorecendo o processo de biolixiviação por contato (XU et al. 2019; MOLAEY et al. 2021).

Nas seções a seguir, serão apresentados os principais aspectos microbiológicos de EPS, relacionados tanto com a produção de EPS por microrganismos, quanto com sua remoção e consequente melhoria do potencial de desaguamento. Os principais periódicos que abordaram esses aspectos microbiológicos foram organizados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Artigos revisados de aspectos microbiológicos da produção e remoção de EPS em lodo

Aspecto	Referências
Produção de EPS	MORE et al. (2014); SONG et al. (2014); ZHANG et al. (2015); ZHOU et al. (2017); HUANG et al. (2020); LI et al. (2021).
Remoção de EPS	FLEMMING & WINGENDER (2010); LIU et al. (2012); HUO et al. (2014); MORE et al. (2014); MURUGESAN et al. (2014); ZHANG et al. (2015); WONG et al. (2015); LIU et al. (2016); MURUGESAN et al. (2016); ZHENG et al. (2016b); MOHAMMADI et al. (2017); WU et al. (2017); SHUKLA et al. (2019); XIAO et al. (2019); HUANG et al. (2020); CAI et al. (2021); LI et al. (2021).

Fonte: Autor (2023).

1.7.1. Microbiologia da produção de EPS em lodo

Em sistemas de lodos ativados, os filos dominantes são Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Bactérias acidófilas podem ser encontradas no filo Proteobacteria, como *Acidithiobacillus*, que têm sido amplamente estudadas devido ao seu potencial de biolixiviação (LI et al. 2021). A secreção de EPS é realizada, tanto por microrganismos procarióticos, quanto por eucarióticos devido a (i) interações com o meio em que estão inseridos; (ii) como resultado de seu metabolismo (por exemplo, durante o processo de biolixiviação de metais); ou (iii) são liberados a partir da degradação dos próprios microrganismos devido ao metabolismo, a secreção pode ser decorrente de fatores físicos, químicos, biológicos e genótipos, como relação carbono/nitrogênio, pH, oxigênio dissolvido e temperatura do ambiente (MORE et al. 2014).

A temperatura pode ser considerada um dos parâmetros mais importantes que influenciam a geração de EPS. Em baixas temperaturas, alguns microrganismos podem reduzir sua atividade celular. Maior secreção de proteína ocorre no verão por causa de maior atividade microbiana e maior força de ligação de proteína às células microbianas em temperaturas mais altas (ZHANG et al. 2015a). Esses são fatores que podem influenciar consideravelmente o potencial de desaguamento. No entanto, a produção de EPS pode variar entre diferentes microrganismos sob a mesma temperatura, dependendo da temperatura ideal do microrganismo e da temperatura do ambiente natural em que está inserido.

Acidithiobacillus pode mostrar atividade em temperaturas próximas a 10°C (SONG et al. 2014). Os processos de biolixiviação e desaguamento a baixas temperaturas (*A. ferrooxidans*

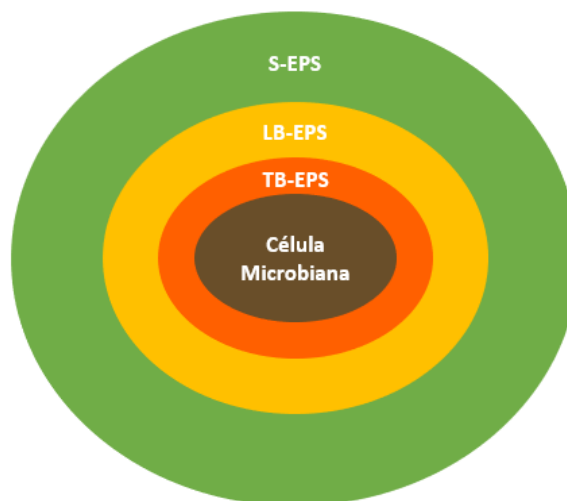
e *A. thiooxidans* aclimatados a 15°C) foram investigados por ZHOU et al. e observaram uma redução na biolixiviação e no tempo de adaptação desses microrganismos após um período de três gerações (ZHOU et al. 2017).

Conforme discutido acima, EPS tem um papel ativo na biolixiviação de metais, e esse papel pode ser resultado de um mecanismo de proteção para microrganismos em ambientes hostis ou tóxicos. A exposição ao cromo aumentou o conteúdo de EPS, proteínas, DNA e açúcares e uma possível causa para a lise celular foi atribuída à toxicidade do cromo (PRIESTER et al. 2006).

1.7.2. Frações de Substâncias Poliméricas Extracelulares e influência no desaguamento

O conceito de estratificação de EPS em flocos de lodo foi introduzido por YU et al., que descobriram que a matriz de EPS geralmente compreende uma fração solúvel (S-EPS, do inglês *Soluble EPS*) e uma fração ligada (B-EPS, do inglês *Bound EPS*), a primeira é secretada fora da membrana celular e encontra-se disperso no meio e esta última ligada às células microbianas (YU et al. 2008). A fração ligada também tem uma estrutura de camada dupla, EPS fracamente ligado (LB-EPS, do inglês *loosely bound EPS*) e EPS fortemente ligado (TB-EPS, do inglês *tightly bound EPS*) (LIN et al. 2019; WU et al. 2020). Na Figura 1.4 é apresentada uma ilustração dessas frações estratificadas no floco de lodo.

Figura 1.4. Frações de EPS estratificadas no floco de lodo: S-EPS, LB-EPS e TB-EPS



Fonte: Autor (2023).

Análises 3D-EEM indicam impressões digitais de fluorescência semelhantes das frações EPS (S-EPS, LB-EPS e TB-EPS) para diferentes ETEs no mesmo período, e S-EPS, LB-EPS e TB-EPS representam 53–72%, 9–17% e 15–27%, respectivamente, do EPS total. Além disso, as proteínas foram descritas como o componente dominante da fração TB-EPS (ZHANG et al. 2015a).

Para o efeito de desaguamento do lodo, ambas as frações LB-EPS e TB-EPS contribuem, mas por mecanismos diferentes. A fração LB-EPS está intimamente relacionada com o processo de floculação, pois em flocos de lodo é a camada superficial na interface lodo-água e é essencial quebrar essa camada para liberar a água correspondente à fração mais fortemente ligada. A fração TB-EPS, por outro lado, representa um desafio para as tecnologias convencionais de desaguamento, devido a interações químicas mais fortes com a água (MURUGESAN et al. 2016; LIU et al. 2021).

Considerando a coinoculação de *A. thiooxidans* e *A. ferrooxidans*, o teor de EPS no lodo impactou significativamente o potencial de desaguamento, principalmente nos teores de proteínas e polissacarídeos da fração TB-EPS, cuja diminuição contribuiu para o desaguamento (ZHOU et al. 2014). As proteínas presentes no TB-EPS constituem a maior parte de EPS total (WONG et al. 2015). TB-EPS pode conter 70% de biopolímeros, incluindo proteínas e carboidratos. A liberação de proteínas, cuja característica é predominantemente hidrofílica, pode enfraquecer sua capacidade de se ligar à água e conseqüentemente melhorar sua capacidade de desaguamento (SHAO et al. 2009; DAI et al. 2018).

Diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (0,8 - 3,1 mg · L⁻¹; 3,1 - 5,5 mg · L⁻¹; e 5,5 - 7,5 mg · L⁻¹) foram avaliadas em experimentos de biolixiviação para promover o desaguamento do lodo em função da distribuição das frações de EPS. Foi observado aumento na abundância de *Acidithiobacillus* com o aumento na concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, foi obtida uma redução significativa (83,4 - 93,2%) no teor de proteína da fração TB-EPS e uma correlação positiva significativa ($r = 0,924$, $P < 0,01$) entre SRF e o teor de proteína da fração TB-EPS (LI et al. 2021). Resultado semelhante foi obtido por MURUGESAN et al., que também demonstraram redução no teor de TB-EPS e correlação com desaguamento durante a biolixiviação com *A. ferrooxidans* (MURUGESAN et al. 2016).

A redução simultânea do teor de TB-EPS causou um aumento nas concentrações de S-EPS e LB-EPS em 43,5% e 29,3%, respectivamente, e a destruição de TB-EPS em condições ácidas levou à liberação de matéria orgânica que aumentou EPS nas outras frações (LI et al. 2021).

O efeito de diferentes concentrações de lodo (5, 10, 15, 20 e 30 g · L⁻¹, peso seco) foi investigado para melhorar o desaguamento durante o processo de biolixiviação e identificaram a redução da fração TB-EPS como um dos principais influenciadores do desaguamento aprimorado. Além disso, os resultados da Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) mostraram que o teor reduzido de proteína na fração TB-EPS foi o principal fator no aumento do desaguamento do lodo. A concentração ótima de lodo para desaguamento foi de 10 g · L⁻¹, quando o pH estava próximo de 2,11, pois, em maiores concentrações de lodo, há maiores interações entre os flocos, devido às forças coloidais e hidrodinâmicas, tornando o processo de desaguamento ainda mais complexo (YANG et al. 2020).

Embora vários estudos apontem uma maior influência do TB-EPS no desaguamento do lodo, outros apontam que o potencial de desaguamento foi fortemente prejudicado pelo teor excessivo de LB-EPS, o que aumenta a estabilidade dos flocos soltos na água com sua camada “gel”, além de favorecer maior retenção de água intersticial (LI & YANG 2007; YU et al. 2008; DAI et al. 2018).

1.7.3. Microbiologia da remoção de EPS em lodo

No processo de biolixiviação, os íons de ferro são os principais agentes apontados como responsáveis pela redução do teor de EPS, principalmente na fração LB-EPS devido à afinidade com o Fe³⁺, com atuação na neutralização de cargas, favorecendo a floculação e levando a um melhor desaguamento (MURUGESAN et al. 2014; MURUGESAN et al. 2016). No entanto, fatores microbiológicos também têm uma influência considerável na redução de EPS, proporcionando uma melhoria potencial no desaguamento.

Quantidades substanciais de enzimas protease, amilase, DNase e RNase são encontradas no EPS e, em casos de escassez de substrato, algumas delas podem degradar o EPS da mesma bactéria ou de bactérias de outras espécies para usá-lo como fonte de carbono e energia (FLEMMING & WINGENDER 2010; HUO et al. 2014; SHUKLA et al. 2019). Assim, estudos mostram um declínio nas concentrações de EPS nas fases estacionárias da curva de crescimento ou crescimento endógeno, devido à degradação de EPS (SHENG et al. 2006). ZHANG et al. apontam alta secreção enzimática no período do verão, onde temperaturas mais elevadas resultam em maior atividade microbiana, e dentre os componentes degradados de EPS, destacam-se os polissacarídeos, por serem altamente biodegradáveis (ZHANG et al. 2015a). WU et al. investigaram as proteínas do lodo por análise proteômica de quantificação relativa e

absoluta (iTRAQ) e identificaram 209 proteínas no lodo, sendo que as proteínas identificadas como tendo maior influência no desaguamento do lodo são as da membrana (por exemplo a proteína ribossômica 30S, S13 do domínio de ligação ao FAD *P. syringae*), cuja ruptura resulta em perda de células adesão (WU et al. 2017).

Uma maior abundância de *Acidithiobacillus* foi identificada com a maior concentração de oxigênio dissolvido, bem como uma maior abundância do filo Firmicutes, bactérias acetogênicas e sintróficas conhecidas por produzir endósporos, que podem degradar ácidos graxos voláteis e outros compostos análogos (LI et al. 2021). Huang et al. propuseram uma correlação entre a abundância do filo Firmicutes e a degradação da matéria orgânica em EPS (HUANG et al. 2020). LI et al. também relatam outros gêneros, como *Metallibacterium*, *Alicyclobacillus*, *Acidibacter*, *Acidocella* e *Luteococcus*, que influenciam a biodegradação de EPS e consequente melhora na capacidade de desaguamento do lodo (LI et al. 2021).

Vários estudos sobre a diversidade microbiana após o processo de biolixiviação apontam para alterações na comunidade bacteriana, que por sua vez interferem na produção ou remoção de EPS no lodo. A adição de *A. ferrooxidans* no lodo digerido para melhorar a capacidade de desaguamento inibiu o crescimento de outros microrganismos e, portanto, houve redução no índice de Shannon. Ao analisar o sequenciamento do gene 16S rRNA, observou-se maior abundância relativa de *Acidithiobacillus* e *Acidocella* e redução da abundância relativa de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* 48 horas após a adição de *Acidithiobacillus* (CAI et al. 2021).

Uma redução no índice de Shannon também foi observada em lodos ativados. Além de aumentar a abundância de *Acidithiobacillus* e *Acidocella*, a redução do pH inibiu o crescimento de patógenos, como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, e aumentou a biolixiviação. A ação combinada de *Acidithiobacillus* e *Acidocella* foi identificada como causadora de alterações na estrutura do lodo e EPS, levando a melhorias no desaguamento (HUANG et al. 2020). As análises de diversidade microbiana indicaram os gêneros *Acidocella*, *Nitrospira*, *Alicyclobacillus* e *Rhodanobacter* como dominantes nos flocos de lodo, e a remoção de proteínas em EPS foi identificada como um fator chave no desaguamento do lodo, pois possui alta capacidade de retenção de água, devido à hidrofiliabilidade, e consequentemente maior contribuição para o desaguamento (XIAO et al. 2019).

Estudos atribuem a redução de EPS à substituição de bactérias heterotróficas por bactérias autotróficas acidófilas (MOHAMMADI et al. 2017). A inoculação de *A. ferrooxidans* na biolixiviação aumenta sua concentração de 7,48% para 26,49% e causa uma redução de 94,42 para 76% no teor de proteínas e polissacarídeos em EPS (LIU et al. 2016). Um estudo recente por meio de análise de diversidade microbiana (sequenciamento de alto rendimento do

gene 16S rRNA) revelou uma importante contribuição de outros microrganismos tolerantes a ácidos na melhoria do desaguamento, como *Acidocella*, *Thiomonas* e *Metallibacterium*, e a simbiose desses microrganismos com *Acidithiobacillus* resultou em uma redução no pH e na concentração de proteínas, alteração da composição do EPS e degradação da matéria orgânica dissolvida, promovendo a liberação de água da fração ligada (LI et al. 2022b). HUANG et al. também observaram que com o aumento da abundância do filo Firmicutes houve maior degradação da matéria orgânica em EPS (HUANG et al. 2020). Assim, o desaguamento do lodo durante o processo de biolixiviação pode estar relacionado a um efeito sinérgico de vários microrganismos acidófilos com ação sobre a estrutura e composição do EPS.

No entanto, ainda existem controvérsias quanto à redução de EPS e melhoramento do desaguamento, o que sugere que não há linearidade nessa correlação. Durante o processo de biolixiviação, ZHENG et al. observaram que ocorreu uma rápida melhoria na capacidade de desaguamento nas primeiras 48 horas, mas que depois deteriorou-se lentamente nas 144 horas seguintes. A rápida melhoria no desaguamento, bem como a posterior deterioração, foi atribuída à remoção e posterior geração de EPS no lodo devido à excreção metabólica ou lise de células microbianas, sob a hipótese de que após 48 horas de biolixiviação o ambiente torna-se extremo para microrganismos que secretam mais EPS como um mecanismo de proteção (ZHENG et al. 2016b).

As diferenças identificadas entre remoção de EPS e desaguamento podem ser atribuídas às diferentes fontes de lodo utilizadas, desde diferentes tratamentos de esgoto e tratamento de efluentes com composições complexas e únicas, até o uso de lodo digerido e não digerido, o que afeta consideravelmente o potencial de desaguamento, e o método de extração de EPS, que pode variar desde ultrassom/centrifugação (YU et al. 2008) a tratamentos térmicos (LI & YANG 2007) ou alcalinos (SHENG et al. 2005), nos quais os agentes mais agressivos podem causar lise celular. Outra possível razão para a deterioração do potencial de desaguamento é que os principais métodos de mensuração, SRF e TTF, utilizam membranas, que com teor excessivo de EPS podem resultar em uma camada de incrustação, prejudicando o processo de filtração.

Embora ainda não haja consenso sobre como o EPS afeta o desaguamento do lodo, a existência de uma relação entre potencial de desaguamento, a composição e quantidade de EPS é comumente aceita. Além disso, uma clara correlação entre a composição de EPS e a estrutura das comunidades microbianas foi observada nos estudos, e alterações na diversidade dessas comunidades afetam diretamente o potencial de desaguamento. É de fundamental importância estudar o aspecto microbiológico do desaguamento do lodo, pois ainda não está totalmente claro

como os microrganismos desempenham esse papel. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar essas controvérsias e ampliar a aplicabilidade do desaguamento do lodo durante os processos de biolixiviação, cuja importância se estende desde a destinação adequada do lodo até seu potencial reaproveitamento.

1.8. PERSPECTIVAS FUTURAS DE DESAGUAMENTO DE LODO VIA BIOLIXIVIAÇÃO

Compreender a correlação detalhada entre EPS do lodo, o potencial de desaguamento e a diversidade microbiana envolvida neste processo é essencial para otimizar as condições de biolixiviação do lodo e aumentar o desaguamento. Com base na revisão de literatura realizada, foram identificadas as seguintes perspectivas de desenvolvimento futuro:

- Realização de pesquisas envolvendo o aspecto microbiológico do desaguamento de lodo, tanto por biolixiviação quanto por processos físico-químicos, pois ainda não está totalmente claro como os microrganismos se relacionam com um melhor desaguamento. Alguns estudos apontam para a quebra e redução dos níveis da proteína de EPS por alguns microrganismos específicos, mas o mecanismo detalhado ainda não foi descrito;
- Desenvolvimento de métodos e protocolos mais precisos para mensurar o desaguamento, pois os métodos mais citados na literatura (CST, TTF e SRF) são empíricos e requerem maior precisão. Os processos de extração de EPS também precisam de melhorias para preservar ao máximo a estrutura de EPS durante o processo de separação das frações. O desenvolvimento de técnicas de microscopia e espectrofotometria juntamente com genômica, proteômica e glicômica podem ajudar a elucidar aspectos microscópicos, estruturais e microbiológicos de EPS em lodo;
- Aplicação de tecnologias combinadas envolvendo processos físico-químicos e biolixiviação, para mitigar as limitações da biolixiviação para aplicação em maior escala (por exemplo, taxa de reação) e redução a um valor mínimo sustentável de consumo de energia e adição de produtos químicos. Nesse aspecto, a combinação de AOP com biolixiviação começou a ser explorada e estudos preliminares apontam resultados promissores da combinação das duas tecnologias. Entretanto, o custo operacional e os riscos de poluição dos subprodutos precisam ser melhor avaliados, pois impactam diretamente na ampliação da aplicabilidade em larga escala e no reaproveitamento do lodo final;

- Combinação de técnicas de desaguamento existentes e de novos processos devem ser vinculados ao potencial de reutilização final do lodo. Portanto, técnicas que promovam o tratamento simultâneo de poluentes como metais (e seu possível reaproveitamento), compostos orgânicos persistentes e substâncias hormonais devem ser priorizadas. Espera-se que os esforços e inovações na área de desaguamento não se concentrem apenas na redução do volume de lodo, mas na recuperação de energia e recursos.

1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desaguamento de lodo de esgoto via biolixiviação tem sido considerado uma abordagem adequada, tanto em termos de eficiência quanto de economia e meio ambiente. Assim, a biolixiviação pode ser usada no tratamento de lodo como um processo de dupla finalidade. Embora pesquisas demonstrem resultados promissores no desaguamento de lodo via biolixiviação, foi observada uma forte influência de EPS, e o conhecimento sobre os mecanismos de desaguamento desses compostos complexos ainda não foi totalmente elucidado.

Em relação às frações de EPS, observou-se que reduções no LB-EPS influenciam favorecendo a floculação, pois seu teor excessivo aumenta a estabilidade dos flocos soltos na água e favorece maior retenção intersticial de água. O TB-EPS foi relatado como difícil de quebrar devido à predominância de fortes ligações químicas, mas uma vez consolidado, permite a liberação de água intersticial. Além disso, o maior teor de proteína foi relacionado à fração TB-EPS, que devido à sua alta hidrofiliabilidade afeta negativamente o desaguamento. No entanto, as proteínas também podem contribuir positivamente para a forma enzimática, pois vários estudos indicam seu papel na degradação de EPS.

Em relação à microbiologia, houve estreita relação entre o desaguamento e as alterações na diversidade microbiana, ocasionando principalmente a substituição de bactérias heterotróficas por bactérias autotróficas acidófilas. Estudos têm apontado para um aumento na abundância dos filos Firmicutes e Proteobacteria, deste último, bactérias acidófilas como *Acidithiobacillus* e *Acidocella*, que podem promover a degradação da matéria orgânica em EPS.

Finalmente, alguns estudos demonstram uma redução de EPS durante a biolixiviação, mas com o tempo o teor de EPS aumenta novamente. Essas inconsistências podem encorajar mais pesquisas. Além disso, os estudos descrevem a redução no teor de EPS e consequente melhoria no desaguamento como uma “destruição” de EPS, mas mecanismos físico-químicos ou biológicos mais detalhados ainda não foram completamente estudados.

1.10. REFERÊNCIAS

- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.
- CAI, G.; EBRAHIMI, M.; ZHENG, G.; KAKSONEN, A. H.; MORRIS, C.; O'HARA, I. M.; ZHANG, Z. Effect of ferrous iron loading on dewaterability, heavy metal removal and bacterial community of digested sludge by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113114, 2021.
- CAMARGO, F. P.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Removal of Toxic Metals from Sewage Sludge Through Chemical, Physical, and Biological Treatments - a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, p. 433, 2016.
- CAMARGO, F. P.; PRADO, P. F.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Bioleaching of toxic metals from sewage sludge by co-inoculation of *Acidithiobacillus* and the biosurfactant-producing yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Journal of environmental management**, v. 211, p. 28-35, 2018.
- CAO, B.; ZHANG, T.; ZHANG, W.; WANG, D. Enhanced technology based for sewage sludge deep dewatering: A critical review. **Water Research**, v. 189, p. 116650, 2021.
- CHEN, Z.; ZHANG, W.; WANG, D.; MA, T.; BAI, R. Enhancement of activated sludge dewatering performance by combined composite enzymatic lysis and chemical re-flocculation with inorganic coagulants: Kinetics of enzymatic reaction and re-flocculation morphology. **Water Research**, v. 83, p. 367-376, 2015.
- COLIN, F.; GAZBAR, S. Distribution of water in sludges in relation to their mechanical dewatering. **Water Resource**, v. 29, p. 2000-2005, 1995.
- DAI, Q.; MA, L.; REN, N.; NING, P.; GUO, Z.; XIE, L.; GAO, H. Investigation on extracellular polymeric substances, sludge flocs morphology, bound water release and dewatering performance of sewage sludge under pretreatment with modified phosphogypsum. **Water Research**, v. 142, p. 337-346, 2018.
- DENG, X.; CHAI, L.; YANG, Z.; TANG, C.; WANG, Y.; SHI, Y. Bioleaching mechanism of heavy metals in the mixture of contaminated soil and slag by using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248-249, p.107-114, 2013.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

- FONTI, V.; DELL'ANNO, A.; BEOLCHINI, F. Does bioleaching represent a biotechnological strategy for remediation of contaminated sediments? **Science of the Total Environment**, v. 563–564, p. 302–319, 2016.
- FONTMORIN, J-M.; SILLANPÄÄ, M. Bioleaching and combined bioleaching/Fenton-like processes for the treatment of urban anaerobically digested sludge: Removal of heavy metals and improvement of the sludge dewaterability. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 655-664, 2015.
- GAO, N.; DUAN, Y.; LI, Z.; QUAN, C.; YOSHIKAWA, K. Hydrothermal treatment combined with in-situ mechanical compression for floated oily sludge dewatering. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 124173, 2021.
- GE, D.; ZHANG, W.; YUAN, H.; ZHU, N. Enhanced waste activated sludge dewaterability by tannic acid conditioning: Efficacy, process parameters, role and mechanism studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 241, p.118287, 2019.
- GENG, H.; XU, Y.; ZHENG, L.; GONG, H.; DAI, L.; DAI, X. An overview of removing heavy metals from sewage sludge: Achievements and perspectives. **Environmental Pollution**, v. 266, p.115375, 2020.
- GONG, Y.; ZHAO, D.; WANG, Q. An overview of field-scale studies on remediation of soil contaminated with heavy metals and metalloids: Technical progress over the last decade. **Water Research**, v. 147, p. 440-460, 2018.
- GUAN, R.; YUAN, X.; WU, Z.; JIANG, L.; LI, Y.; ZENG, G. Principle and application of hydrogen peroxide based advanced oxidation processes in activated sludge treatment: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 339, p. 519-530, 2018.
- GUPTA, P.; DIWAN, B. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 58–71, 2017.
- HAKEEM, I. G.; HALDER, P.; MARZBALI, M. H.; PATEL, S.; RATHNAYAKE, N.; SURAPANENI, A.; SHORT, G.; PAZ-FERREIRO, J.; SHAH, K. Mild sulphuric acid pre-treatment for metals removal from biosolids and the fate of metals in the treated biosolids derived biochar. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, p. 107378, 2020.
- HE, D-Q.; WANG, L-F.; JIANG, H.; YU, H-Q. A Fenton-like process for the enhanced activated sludge dewatering. **Chemical Engineering Journal**, v. 272, p. 128-134, 2015.
- HE, X.; HE, L.; LIN, Z.; ZHOU, J.; SHI, S.; LIU, Y.; ZHOU, J. Deep dewatering of activated sludge using composite conditioners of surfactant, acid and flocculant: The mechanism and dosage model. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 150899, 2022.

- HOUGHTON, J. I.; STEPHENSON, T. Effect of influent organic content on digested sludge extracellular polymer content and dewaterability. **Water Resource**, v. 36, p. 3620-3628, 2002.
- HU, A.; ZHANG, W.; LIAO, G.; WANG, D.; PENG, Y. Interaction of nano-quantum dots (CdSe@ZnS) and extracellular proteins in activated sludge revealed by bio-nano science. **Environmental Science Nano**, v. 9, p. 1-41, 2020.
- HUANG, J.; LIANG, J.; YANG, X.; ZHOU, J.; LIAO, X.; LI, S.; ZHENG, L.; SUN, S. Ultrasonic coupled bioleaching pretreatment for enhancing sewage sludge dewatering: Simultaneously mitigating antibiotic resistant genes and changing microbial communities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 193, p. 110349, 2020.
- HUO, M.; ZHENG, G.; ZHOU, L. Enhancement of the dewaterability of sludge during bioleaching mainly controlled by microbial quantity change and the decrease of slime extracellular polymeric substances content. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 190–197, 2014.
- HYRYCZ, M.; OCHOWIAK, M.; KRUPIŃSKA, A.; WŁODARCZAK, S.; MATUSZAK, M. 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, p. 153328, 2022.
- JIANG, J.; GONG, C.; TIAN, S.; YANG, S.; ZHANG, Y. Impact of ultrasonic treatment on dewaterability of sludge during Fenton oxidation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 8081-8088, 2014.
- JIANG, X.; LI, Y.; TANG, X.; JIANG, J.; HE, Q.; XIONG, Z.; ZHENG, H. Biopolymer-based flocculants: a review of recent technologies. **Environmental Science and Pollution Resource**, v. 28, p. 46934-46963, 2021.
- KIM, I. S.; LEE, J. U.; JANG, A. Bioleaching of heavy metals from dewatered sludge by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 1339–1348, 2005.
- KURADE, M. B.; MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; YU, S-M.; WONG, J. W. C. 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.
- KURADE, M. B.; MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; YU, S-M.; WONG, J. W. C. Sludge conditioning using biogenic flocculant produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* for enhancement in dewaterability. **Bioresource Technology**, v. 217, p.179–185, 2016.

- LI, X.; YANG, S. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. **Water Research**, v. 41, p. 1022–1030, 2007.
- LI, Q.; LU, X.; GUO, H.; YANG, Z.; LI, Y.; ZHI, S.; ZHANG, K. Sewage sludge drying method combining pressurized electro-osmotic dewatering with subsequent bio-drying. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 94-102, 2018.
- LI, Y. B.; SONG, J. L.; YAO, Q. J.; CHEN, Z. X.; WEI, W.; LI, H. L.; WANG, M. X.; WANG, B. J.; ZHOU, J. M. Effects of dissolved oxygen on the sludge dewaterability and extracellular polymeric substances distribution by bioleaching. **Chemosphere**, v. 281, p. 130906, 2021.
- LI, Y.; LIU, L.; LI, X.; XIE, J.; GUAN, M.; WANG, E.; LU, D.; DONG, T.; ZHANG, X. Influence of alternating electric field on deep dewatering of municipal sludge and changes of extracellular polymeric substance during dewatering. **Science of the Total Environment**, v. 842, p. 156839, 2022a.
- LI, Y.; CHEN, Z.; LI, H.; YAO, Q.; WEI, Y.; WANG, X.; WANG, N.; CAO, X.; ZHENG, M.; L. V. J.; GUO, Z.; JIANG, J. Improving dewaterability of sewage sludge by inoculating acidified sludge and Fe²⁺: Performance and mechanisms. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 158, p. 210-220, 2022b.
- LIN, F.; ZHU, X.; LI, J.; YU, P.; LUO, Y.; LIU, M. Effect of extracellular polymeric substances (EPS) conditioned by combined lysozyme and cationic polyacrylamide on the dewatering performance of activated sludge. **Chemosphere**, v. 235, p. 679–689, 2019.
- LIN, W.; LIU, X.; DING, A.; NGO, H. H.; ZHANG, R.; NAN, J.; MA, J.; LI, G. Advanced oxidation processes (AOPs)-based sludge conditioning for enhanced sludge dewatering and micropollutants removal: A critical review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 45, p. 102468, 2022.
- LIPPERT, T.; BANDELIN, J.; XU, Y.; LIU, Y. C.; ROBLES, G. H.; DREWES, J. E.; KOCH, K. From pre-treatment to co-treatment - how successful is ultrasonication of digested sewage sludge in continuously operated anaerobic digesters? **Renewable Energy**, v. 166, p. 56–65, 2020.
- LIU, F.; ZHOU, L.; ZHOU, J.; SONG, X.; WANG, D. Improvement of sludge dewaterability and removal of sludge-borne metals by bioleaching at optimum pH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221–222, p. 170–177, 2012.
- LIU, C.; ZHANG, P.; ZENG, C.; ZENG, G.; XU, G.; HUANG, Y. Feasibility of bioleaching combined with Fenton oxidation to improve sewage sludge dewaterability. **Journal of Environmental Science**, v. 28, p. 37-42, 2015.

- LIU, H.; YANG, S.; SHI, J.; XU, X.; LIU, H.; FUA, B. Towards understanding the dewatering mechanism of sewage sludge improved by bioleaching processing. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 53–59, 2016.
- LIU, C.; CHEN, D.; CHEN, X.; WU, B. Application of zero-valent iron/sulfite system for aerobically digested sludge conditioning. **Chemical Engineering Journal**, v. 420, p. 127650, 2021.
- LIU, M.; YUAN, C.; RU, S.; LI, J.; LEI, Z.; ZHANG, Z.; SHIMIZU, K.; YUAN, T.; LI, F. Combined organic reagents for co-conditioning of sewage sludge: High performance in deep dewatering and significant contribution to the floc property. **Journal of Water Process Engineering**, v. 48, p. 102855, 2022.
- LO, I. M. C.; LAI, K. C. K.; CHEN, G. H. Salinity Effect on Mechanical Dewatering of Sludge with and without Chemical Conditioning. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 4691-4696, 2001.
- LU, J.; RAO, S.; LE, T.; MORA, S.; BANERJEE, S. Increasing cake solids of cellulosic sludge through enzyme-assisted dewatering. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 353-357, 2011.
- LU, Y.; WU, R.; ZHANG, J.; LIU, H.; DAI, Y. Effects of phase separation on dewaterability promotion and heavy metal removal of sewage sludge during bioleaching. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 13971–13982, 2021.
- MA, D.; LI, A.; ZHANG, L.; WANG, D.; JI, G. Mechanical compression assisted conductive drying of thin-film dewatered sewage sludge: Process performance, heat and mass transfer behavior. **Waste Management**, v. 126, p. 41-51, 2021.
- MAHMOUD, A.; OLIVIER, J.; VAXELAIRE, J.; HOADLEY, A. F. A. Electrical field: a historical review of its application and contributions in wastewater sludge dewatering. **Water Resource**, v. 44, p. 2381-2407, 2010.
- MAHMOUD, A.; OLIVIER, J.; VAXELAIRE, J.; HOADLEY, A. F. A. Electro-dewatering of wastewater sludge: influence of the operating conditions and their interactions effects. **Water Resource**, v. 45, p. 2795-2810, 2011.
- MAHMOUD, A.; HOADLEY, A. F. A.; CONRARDY, J. B.; OLIVIER, J.; VAXELAIRE, J. Influence of process operating parameters on dryness level and energy saving during wastewater sludge electro-dewatering. **Water Resource**, v. 103, p. 109-123, 2016.
- MASIHI, H.; GHOLIKANDI, B. G. Employing Electrochemical-Fenton process for conditioning and dewatering of anaerobically digested sludge: A novel approach. **Water Research**, v. 144, p. 373-382, 2018.

- MARCHENKO, O.; DEMCHENKO, V.; PSHINKO, G. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge with recirculation of the liquid phase: A mass balance model. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 429–435, 2018.
- MO, R.; HUANG, S.; DAI, W.; LIANG, J.; SUN, S. A rapid Fenton treatment technique for sewage sludge dewatering. **Chemical Engineering Journal**, v. 269, p. 391-398, 2015.
- MOBARAKI, M.; SEMKEN, R. S.; MIKKOLA, A.; PYRHÖNEN, J. Enhanced sludge dewatering based on the application of high-power ultrasonic vibration. **Ultrasonics**, v. 84, p. 438-445, 2018.
- MOHAMMADI, Z.; AZHDARPOOR, A.; DEHGHANI, M. Stabilization and dewatering of wastewater treatment plant sludge using combined bio/Fenton-like oxidation process. **Drying Technology**, v. 35, p. 545-552, 2017.
- MOLAEY, R.; YESIL, H.; CALLI, B.; TUGTAS, A. V. Enhanced heavy metal leaching from sewage sludge through anaerobic fermentation and air-assisted ultrasonication. **Chemosphere**, v. 279, p. 130548, 2021.
- MORE, T. T.; YADAV, J. S. S.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, v. 144, p. 1-25, 2014.
- MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; WONG, J. W. C. Flocculation and dewaterability of chemically enhanced primary treatment sludge by bioaugmentation with filamentous fungi. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 198–203, 2014.
- MURUGESAN, K.; RAVINDRAN, B.; SELVAM, A.; KURADE, M. B.; YU, S-M.; WONG, J. W. C. Fate of extracellular polymeric substances of anaerobically digested sewage sludge during pre-dewatering conditioning with *Acidithiobacillus ferrooxidans* culture. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 173–178, 2016.
- NEYENS, E.; BAEYENS, J.; DEWIL, R.; HEYDER, B. D. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. **Journal of Hazardous Materials**, v. 106B, p. 83–92, 2004.
- PATHAK, A.; DASTIDAR, M. G.; SREEKRISHNAN, T. R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 2343–2353, 2009.
- PRIESTER, J. H.; OLSON, S. G.; WEBB, S. M.; NEU, M. P.; HERSMAN, L. E.; HOLDEN, P. A. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1988-1996, 2006.

- RAO, B.; HUANG, G.; LU, X.; WAN, Y.; JIANG, Z.; CHEN, D.; LIU, X.; LIANG, A. An ultrahighpressure filtration and device design and optimize study on high dry dewatering of sludge. **Process Safety Environmental Protection**, v. 106, p. 129-137, 2017.
- RAO, B.; SU, J.; XU, J.; XU, S.; PANG, H.; ZHANG, Y.; XU, P.; WU, B.; LIAN, J.; DENG, L. Coupling mechanism and parameter optimization of sewage sludge dewatering jointly assisted by electric field and mechanical pressure. **Science of the Total Environment**, v. 817, p. 152939, 2022.
- RASTEGAR, S. O.; MOUSAVI, S. M.; SHOJAOSADATI, S. A. Cr and Ni recovery during bioleaching of dewatered metal-plating sludge using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 61-68, 2014.
- RODRIGUEZ, S.; SANTOS, A.; ROMERO, A. Effectiveness of AOP's on abatement of emerging pollutants and their oxidation intermediates: Nicotine removal with Fenton's Reagent. **Desalination**, v. 280, p. 108-113, 2011.
- SGROI, M.; SNYDER, S. A.; ROCCARO, P. Comparison of AOPs at pilot scale: Energy costs for micro-pollutants oxidation, disinfection by-products formation and pathogens inactivation. **Chemosphere**, v. 273, p. 128527, 2021.
- SHAO, L.; HE, P.; YU, G.; HE, P. Effect of proteins, polysaccharides, and particle sizes on sludge dewaterability. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 83-88, 2009.
- SHENG, G-P.; YU, H-Q.; YU, Z. Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 125-130, 2005.
- SHENG, Y.; ZHANG, Q.; SHENG, Y.; LI, C.; WANG, H. Screening and flocculating properties of bioflocculant-producing microorganisms. **Journal of University of Science and Technology Beijing, Mineral, Metallurgy, Material**, v. 13, p. 289-292, 2006.
- SHENG G-P, YU H-Q, LI X-Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882-894, 2010.
- SHUKLA, A.; MEHTA, K.; PARMAR, J.; PANDYA, J.; SARAF, M. Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. **European Polymer Journal**, v. 119, p. 298–310, 2019.
- SONG, Y.; ZHENG, G.; HUO, M.; ZHAO, B.; ZHOU, L. Extracellular polymeric substances and bound water drastically affect bioleached sludge dewaterability at low temperature. **Environmental Technology**, v. 35, p. 2538-2545, 2014.

- SRICHANDAN, H.; MOHAPATRA, R. K.; PARHI, P. K.; MISHRA, S. Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: A critical review. **Hydrometallurgy**, v. 189, p. 105122, 2019.
- TAO, H.; DONGWEI, L. Presentation on mechanisms and applications of chalcopyrite and pyrite bioleaching in biohydrometallurgy - a presentation. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 107–119, 2014.
- UYSAL, A.; CELIK, E. Removal of metals and recovery of released nutrients from municipal and industrial sludge using different biosurfactants. **Desalination and Water Treatment**, v. 172, p. 37-45, 2019.
- VILLEGAS-GUZMANA, P.; SILVA, J.; SILVA-AGREDO, J.; FLOREZ, O.; GIRALDO-AGUIRRE, A. L.; PULGARIN, C.; TORRES-PALMA, R. A. Selecting the best AOP for isoxazolyl penicillins degradation as a function of water characteristics: Effects of pH, chemical nature of additives and pollutant concentration. **Journal of Environmental Management**, v. 190, p. 72-79, 2017.
- WANG, L-F.; QIAN, C.; JIANG, J-K.; YE, X-D.; YU, H-Q. Response of extracellular polymeric substances to thermal treatment in sludge dewatering process. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1-5, 2017.
- WANG, Z.; LIU, T.; DUAN, H.; SONG, Y.; LU, X.; HU, S.; YUAN, Z.; BATSTONE, D.; ZHENG, M. Post-treatment options for anaerobically digested sludge: Current status and future prospect. **Water Research**, v. 205, p. 117665, 2021.
- WEI H.; GAO, B.; REN, J.; LI, A.; YANG, H. Coagulation/flocculation in dewatering of sludge: A review. **Water Research**, v. 143, p. 608-631, 2018.
- WONG, J. W. C.; ZHOU, J.; KURADE, M. B.; MURUGESAN, K. Influence of ferrous ions on extracellular polymeric substances content and sludge dewaterability during bioleaching. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 78–83, 2015.
- WONG, J. W. C.; MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; RAVINDRAN, B.; KURADE, M. B.; YU, S-M. Dewatering of saline sewage sludge using iron-oxidizing bacteria: Effect of substrate concentration. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 31–38, 2016.
- WU, B.; SU, L.; SONG, L.; DAI, X.; CHAI, X. Exploring the potential of iTRAQ proteomics for tracking the transformation of extracellular proteins from enzyme-disintegrated waste activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 75-83, 2017.
- WU, B.; DAI, X.; CHAI, X. Critical review on dewatering of sewage sludge: Influential mechanism, conditioning technologies and implications to sludge reutilizations. **Water Research**, v. 180, p. 115912, 2020.

- YANG, Z.; ZHANG, Z.; CHAI, L.; WANG, Y.; LIU, Y.; XIAO, R. Bioleaching remediation of heavy metal-contaminated soils using *Burkholderia* sp. Z-90. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 145-152, 2016.
- YANG, Q.; YI, J.; LUO, K.; JING, X.; LI, X.; LIU, Y.; ZENG, G. Improving disintegration and acidification of waste activated sludge by combined alkaline and microwave pretreatment. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 91, p. 521-526, 2013.
- YANG, W.; ZENG, L.; ZHANG, W.; YANG, Q.; WANG, T.; XIONG, H. The influence of different sludge concentrations on its dewaterability during bioleaching. **Water Science & Technology**, v. 81, p. 2585–2598, 2020.
- YU, G-H.; HE, P-J.; SHAO, L-M.; HE, P-P. Stratification Structure of Sludge Flocs with Implications to Dewaterability. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 7944–7949, 2008.
- XIAO, J.; YUAN, H.; HUANG, X.; MA, J.; ZHU, N. Improvement of the sludge dewaterability conditioned by biological treatment coupling with electrochemical pretreatment. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 96, p. 453–462, 2019.
- XIONG, B.; LOSS, R. D.; SHIELDS, D.; PAWLIK, T.; HOCHREITER, R.; ZYDNEY, A. L.; KUMAR, M. Polyacrylamide degradation and its implications in environmental systems. **Npj Clean Water**, p. 1:17, 2018.
- XU, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, M.; RONG, H.; ZHANG, K.; CHEN, Q. Comparison of bioleaching and electrokinetic remediation processes for removal of heavy metals from wastewater treatment sludge. **Chemosphere**, v. 168, p. 1152-1157, 2017.
- XU, Q.; WANG, H.; WANG, Q.; ZHANG, W.; WANG, D. Characterization of changes in extracellular polymeric substances and heavy metal speciation of waste activated sludge during typical oxidation solubilization processes. **Journal of Environmental Science (China)**, v. 80, p. 146-158, 2019.
- ZHANG, W.; PENG, S.; XIAO, P.; HE, J.; YANG, P.; XU, S.; WANG, D. Understanding the evolution of stratified extracellular polymeric substances in full-scale activated sludges in relation to dewaterability. **RSC Advances**, v. 5, p. 1282-1294, 2015a.
- ZHANG, P.; GUO, J-S.; SHEN, Y.; YAN, P.; CHEN, Y-P.; WANG, H.; YANG, J-X.; FANG F.; LI, C. Microbial communities, extracellular proteomics and polysaccharides: a comparative investigation on biofilm and suspended sludge. **Bioresource and Technology**, v. 190, p. 21-28, 2015b.

- ZHANG, Q.; YANG, W.; YANG, Q.; WANG, T.; CHEN, S.; ZOU, M.; YANG, Z. Effect of using different proportions of inoculum during bioleaching on sludge dewaterability. **Water Science and Technology**, v. 2017, p. 802-811, 2018.
- ZHANG, Q.; CUI, G.; HE, X.; WANG, Z.; TANG, T.; ZHAO, Q.; LIU, Y. Effects of voltage and pressure on sludge electro-dewatering process and the dewatering mechanisms investigation. **Environmental Research**, v. 212, p. 113490, 2022a.
- ZHANG, X.; LI, J.; YANG, W.; CHEN, J.; WANG, X.; XING, D.; DONG, W.; WANG, H.; WANG, J. The combination of aerobic digestion and bioleaching for heavy metal removal from excess sludge. **Chemosphere**, v. 290, p. 133231, 2022b.
- ZHANG K.; YAO, J. Enhancing the deep dewatering performance of municipal sludge pretreated by microwave combined with biomass ash. **Environmental Technology & Innovation**, v. 28, p. 102625, 2022.
- ZHENG G.; ZHOU L.; WANG, S. An acid-tolerant heterotrophic microorganism role in improving tannery sludge bioleaching conducted in successive multibatch reaction systems. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 4151-4156, 2009.
- ZHENG, G.; WANG, Z.; WANG, D.; ZHOU, L. Enhancement of sludge dewaterability by sequential inoculation of filamentous fungus *Mucor circinelloides* ZG-3 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* LX5. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 216-223, 2016a.
- ZHENG, G.; HUO, M.; ZHOU, L. Extracellular Polymeric Substances Level Determines the Sludge Dewaterability in Bioleaching Process. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, p. 04015060, 2016b.
- ZHOU, J.; ZHENG, G.; ZHOU, L.; LIU, F.; ZHENG, C.; CUI, C. The role of heterotrophic microorganism *Galactomyces* sp. Z3 in improving pig slurry bioleaching. **Environmental Technology**, v. 34, p. 35-43, 2013.
- ZHOU, J.; ZHENG, G.; ZHANG, X.; ZHOU, L. Influences of Extracellular Polymeric Substances on the Dewaterability of Sewage Sludge during Bioleaching. **PLoS ONE**, v. 9, p. e102688, 2014.
- ZHOU, Q.; GAO, J.; LI, Y.; ZHU, S.; HE, L.; NIE, W.; ZHANG, R. Bioleaching in batch tests for improving sludge dewaterability and metal removal using *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* after cold acclimation. **Water Science and Technology**, v. 76, p. 1347–1359, 2017.
- ZHU, Y.; ZENG, G.; ZHANG, P.; ZHANG, C.; REN, M.; ZHANG, J.; CHEN, M. Feasibility of bioleaching combined with Fenton-like reaction to remove heavy metals from sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 530-534, 2013.

CAPÍTULO 2: MELHORAMENTO DO DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR MEIO DA INOCULAÇÃO DE *Rhodotorula mucilaginosa*

Resumo

Os biossurfactantes têm se destacado como possíveis substitutos de compostos produzidos por síntese química no desaguamento de lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), pois apresentam alta biodegradabilidade e capacidade de formar agregados moleculares. O presente estudo teve por objetivo definir a melhor concentração de inóculo de *Rhodotorula mucilaginosa* no processo de desaguamento de lodo de ETE e comparar o sobrenadante livre de células com dois surfactantes sintéticos: Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Brometo de cetil trimetil amônio (CTAB). O desaguamento foi analisado por ensaios de Tempo de Filtração (TTF), Resistência Específica a Filtração (SRF) e conteúdo de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS). Os resultados indicaram melhorias do desaguamento semelhantes com as três concentrações em volume de inóculo (5, 10 e 15%) avaliadas, mas o menor TTF ($1,1 \pm 0,2$ min) foi obtido com a menor concentração de inóculo (5%). Embora tenha ocorrido aumento significativo na concentração de proteínas totais em EPS, o percentual na fração ligada foi inferior a 10% nas três concentrações analisadas. A utilização do sobrenadante do cultivo de *R. mucilaginosa* resultou em TTF ($1,2 \pm 0,1$ min) semelhante ao obtido no ensaio com inóculo a 5% ($1,1 \pm 0,2$ min). Embora o uso do inóculo seja eficaz, o sobrenadante pode ser mais vantajoso ao permitir o reaproveitamento da biomassa fúngica como inóculo para novas fermentações ou extrações de bioativos. O ensaio com o sobrenadante foi aplicado em outro lodo de uma ETE diferente, durante 3 horas e embora também tenha se obtido desaguamento, o TTF foi de $7,1 \pm 0,4$ min, demonstrando forte influência da composição, características do esgoto e tipologia de tratamento. Os resultados de carboidratos e proteínas em EPS apresentaram comportamento semelhante ao ensaio anterior, mas com conversão menos eficiente de proteínas da fração ligada para a fração solúvel. Com os surfactantes sintéticos houve melhoria do tempo de filtração com $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de CTAB ($6,9 \pm 0,5$ min), mas deterioração com $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de SDS ($46,5 \pm 0,2$ min), tais resultados se relacionam com a concentração de proteínas ligadas em EPS. O sobrenadante resultou em TTF ($1,2 \pm 0,1$ min) aproximadamente seis vezes menor que o CTAB ($6,9 \pm 0,5$ min) indicando vantagem do uso do sobrenadante da levedura em relação aos surfactantes comerciais avaliados.

Palavras-chave: Biosurfactante, substâncias poliméricas extracelulares, proteínas.

Abstract

Biosurfactants have been highlighted as possible substitutes for compounds produced by chemical synthesis in the dewatering of sludge from Sewage Treatment Plants (STPs), as they present high biodegradability and ability to form molecular aggregates. The present study aimed to define the best inoculum concentration of *Rhodotorula mucilaginosa* in the process of dewatering of STP sludge and to compare the cell-free supernatant with two synthetic surfactants: Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). The dewatering was analyzed by Filtration Time (TTF), Specific Filtration Resistance (SRF), and content and composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) tests. The results indicated similar improvements in dewatering with the three inoculum concentrations (5, 10 and 15%) evaluated, but the lowest TTF (1.1 ± 0.2 min) was obtained with the lowest inoculum concentration (5%) and although there was a significant increase in the concentration of total proteins in EPS, the percentage in the bound fraction was less than 10% in the three concentrations analyzed. The use of the supernatant from the *R. mucilaginosa* culture resulted in a TTF (1.2 ± 0.1 min) similar to that obtained in the assay with 5% inoculum (1.1 ± 0.2 min). Although the use of the inoculum is effective, the supernatant may be more advantageous by allowing the reuse of fungal biomass as inoculum for new fermentations or bioactive extractions. The test with the supernatant was applied to another sludge from a different STP for 3 hours and although dewatering was also obtained, the TTF was 7.1 ± 0.4 min, demonstrating a strong influence of the composition, sewage characteristics and treatment type. The results of carbohydrates and proteins in EPS showed similar behavior to the previous test, but with less efficient conversion of proteins from the bound fraction to the soluble fraction. With the synthetic surfactants, there was an improvement in the filtration time with 1 g L^{-1} of CTAB (6.9 ± 0.5 min), but deterioration with 1 g L^{-1} of SDS (46.5 ± 0.2 min); these results are related to the concentration of bound proteins in EPS. The supernatant resulted in a TTF (1.2 ± 0.1 min) approximately six times lower than CTAB (6.9 ± 0.5 min), indicating the advantage of the yeast supernatant in relation to the commercial surfactants evaluated.

Keywords: Biosurfactant, extracellular polymeric substances, proteins.

2.1 INTRODUÇÃO

O processo de lodos ativados desempenha um papel importante no tratamento biológico do esgoto sanitário e industrial, mas neste processo são geradas grandes quantidades de lodo residual, cuja destinação ambientalmente correta é um desafio na atualidade, haja vista o seu conteúdo de substâncias nocivas, como metais potencialmente tóxicos, agentes patogênicos e micropoluentes, bem como o seu eficiente desaguamento, pois para reduzir o volume e o custo de destinação, o desaguamento é uma etapa indispensável. No entanto, o desaguamento do lodo ainda é o processo mais caro e pouco compreendido no tratamento de esgoto, podendo atingir até 50% do custo operacional total da ETE, sendo o consumo de produtos químicos uma das principais despesas (NEYENS et al. 2004).

Floculantes comerciais à base de polímeros sintéticos são comumente utilizados como condicionadores de lodo em ETE, mas além de possuírem custo elevado, há riscos relacionados a poluições secundárias, por exemplo, os derivados poliméricos de poliácridamida, conhecidos como recalitrantes e cujos resíduos de degradação são compostos cancerígenos e/ou fortemente odoríferos (WONG et al. 2016; CHANG et al. 2005).

Portanto, além do custo do desaguamento com produtos químicos, atualmente as preocupações ambientais sinalizam atenção para o desenvolvimento de compostos que não degradem o meio ambiente e os bioprodutos surgem como uma tendência em diversos segmentos. Neste aspecto, os biossurfactantes têm se destacado como possíveis substituintes de compostos produzidos por síntese química. Os biossurfactantes são definidos como biomoléculas que apresentam propriedades surfactantes, produzidas por diferentes microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), e devido à síntese ser essencialmente biológica, apresentam importantes vantagens comparado com surfactantes químicos: menor toxicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade com diversos substratos, biodisponibilidade, aplicabilidade em um amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, propriedades antibacterianas e antitumorais, podem se ligar a metais potencialmente tóxicos, além da conhecida capacidade de formar agregados moleculares (BEZZA & CHIRWA, 2015; ALMEIDA et al., 2016; GIRI et al., 2019; SANTOS et al. 2021).

A eficácia dos biossurfactantes comparável com surfactantes sintéticos demonstra redução da tensão superficial alcançada em concentrações micelares críticas mais baixas do que as dos surfactantes sintéticos e os principais impactos ambientais relacionados ao uso de surfactantes sintéticos são seus altos níveis de toxicidade, baixa biodegradabilidade, podem

prejudicar populações microbianas aquáticas, peixes e outras formas de vida, além de reduzirem a eficiência de conversão de energia fotoquímica das plantas (JOHNSON et al. 2021).

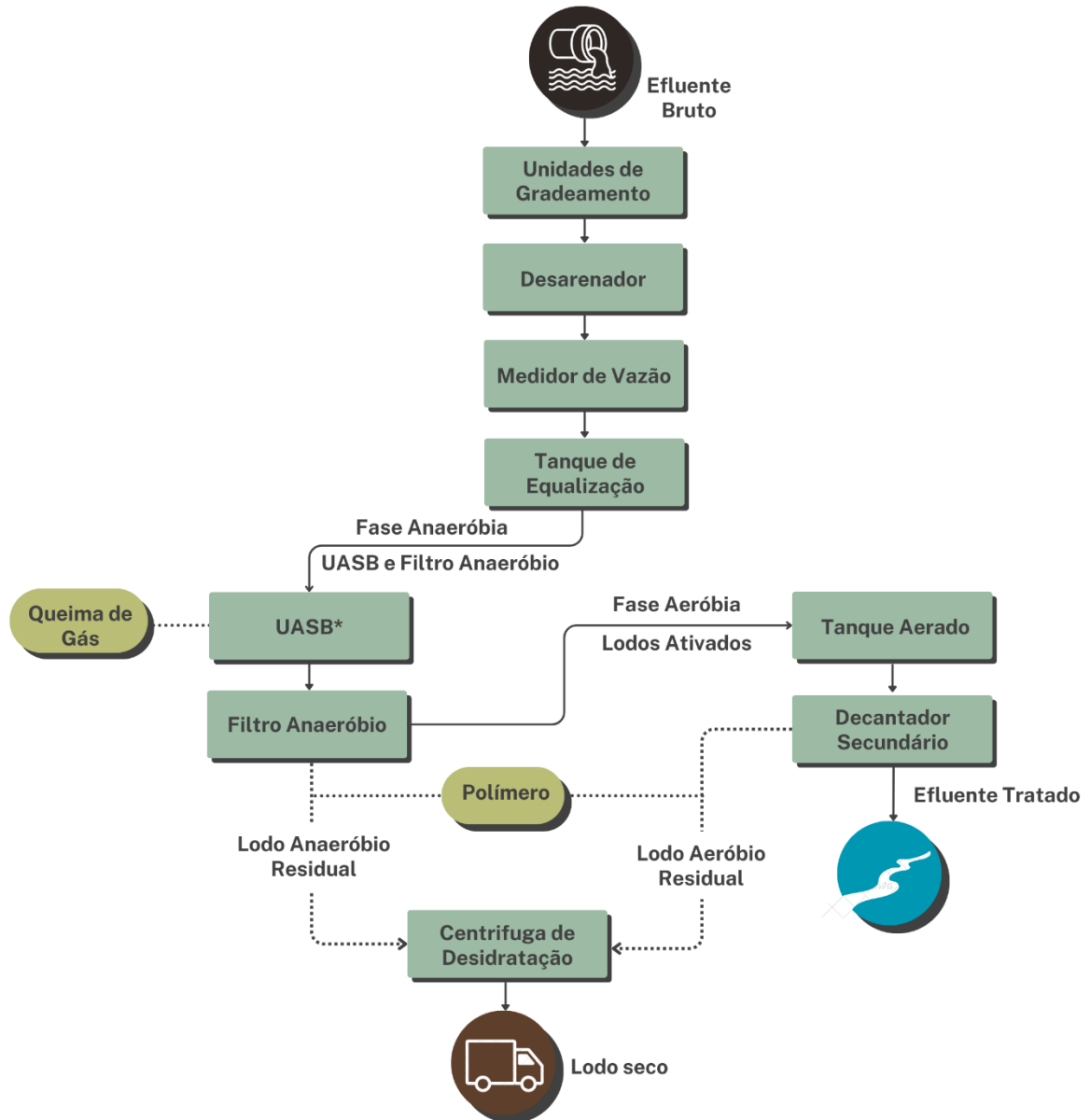
O desaguamento de lodos residuais de esgoto por meio da adição de biossurfactantes quando comparados as demais estratégias de desaguamento é uma abordagem inovadora, principalmente envolvendo leveduras. Os biossurfactantes produzidos por leveduras possuem a vantagem de geralmente serem produzidos por microrganismos não patogênicos (BOGAERT & SAERENS, 2007). Portanto, o presente estudo avaliou o desaguamento de lodo residual de ETE utilizando a levedura produtora de biosurfactante *R. mucilaginosa* em três concentrações distintas, estabelecendo um comparativo entre o uso do inóculo e o sobrenadante da levedura livre de células de cultivo. Os resultados de desaguamento biológico foram ainda comparados com dois surfactantes sintéticos, SDS e CTAB, a fim de avaliar a vantagem do uso da levedura e seu sobrenadante frente a surfactantes comerciais.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1. Coleta, preservação e caracterização do lodo de Estação de Tratamento de Esgoto

A amostra de lodo aeróbio foi coletada no período da manhã do dia 23 de fevereiro de 2023 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE1) localizada no interior do Estado de São Paulo. A estação de tratamento possui duas fases de tratamento biológico, uma fase anaeróbia por reatores Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (UASB) seguido de filtros anaeróbios e uma fase aeróbia por lodos ativados (Figura 2.1). Os lodos residuais gerados são tratados com o floculante catiônico Praestol® 851 BC em seguida centrifugados, com destinação final em aterro sanitário. O lodo ativado desta pesquisa foi coletado no decantador secundário da fase de tratamento biológico aeróbio. As amostras foram coletadas em garrafas de polietileno com capacidade de 1 litro. A metodologia de coleta e armazenamento foi realizada de acordo com as recomendações de coleta e preservação de amostras do método 1060 (APHA, 2012). As propriedades físico-químicas iniciais foram caracterizadas de acordo com os métodos apresentados na Tabela 2.1.

Figura 2.1 Fluxograma da ETE1 na qual foi realizada a primeira coleta de lodo



* UASB: Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente

Fonte: Autor (2023).

Tabela 2.1. Parâmetros físico-químicos e métodos utilizados para caracterização inicial do lodo da ETE1

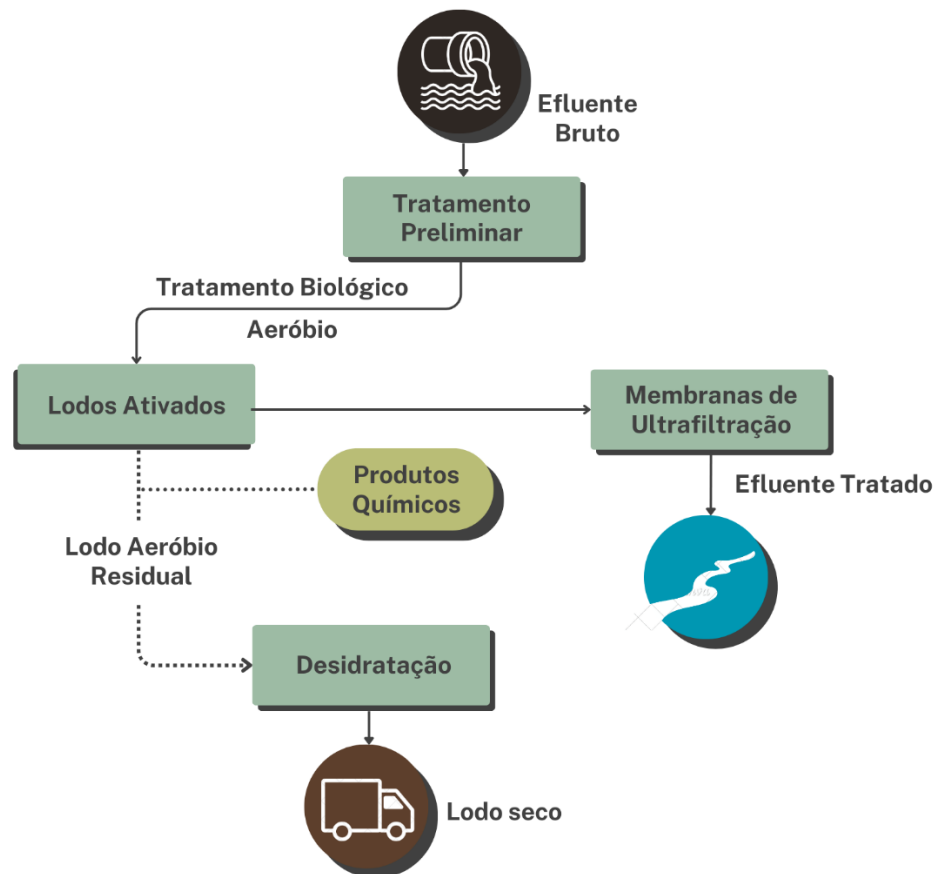
Parâmetros	Análises	Métodos
Físico-químicos	pH	9040C (APHA, 2012)
	Sólidos Totais (ST)	2540B (APHA, 2012)
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	2540E (APHA, 2012)

Fonte: Autor (2023).

Uma segunda coleta de lodo foi realizada em outra estação de tratamento para avaliar o tratamento com melhor resultado obtido na etapa anterior (sobrenadante da levedura) em tratamento de menor duração (3 horas). A nova amostra de lodo foi coletada no período da manhã do dia 25 de junho de 2024 em ETE também localizada no interior do Estado de São Paulo. Diferentemente da ETE1, esta ETE2 possui fase única de tratamento biológico, aeróbia por lodos ativados, seguida por membranas de ultrafiltração para produção de água de reuso (Figura 2.2). Os lodos residuais gerados são tratados com produtos químicos.

A amostra foi coletada na saída de lodo ativado residual e foi coletada em galão de polietileno com capacidade de 20 litros, posteriormente fracionado em garrafas de polietileno de 1 litro. A metodologia de coleta e armazenamento foi realizada de acordo com as recomendações de coleta e preservação de amostras do método 1060 (APHA, 2012). As propriedades físico-químicas iniciais também foram caracterizadas de acordo com os métodos apresentados na Tabela 2.1.

Figura 2.2 Fluxograma da ETE2 na qual foi realizada a segunda coleta de lodo



Fonte: Autor (2024).

2.2.2. Análises de desaguamento

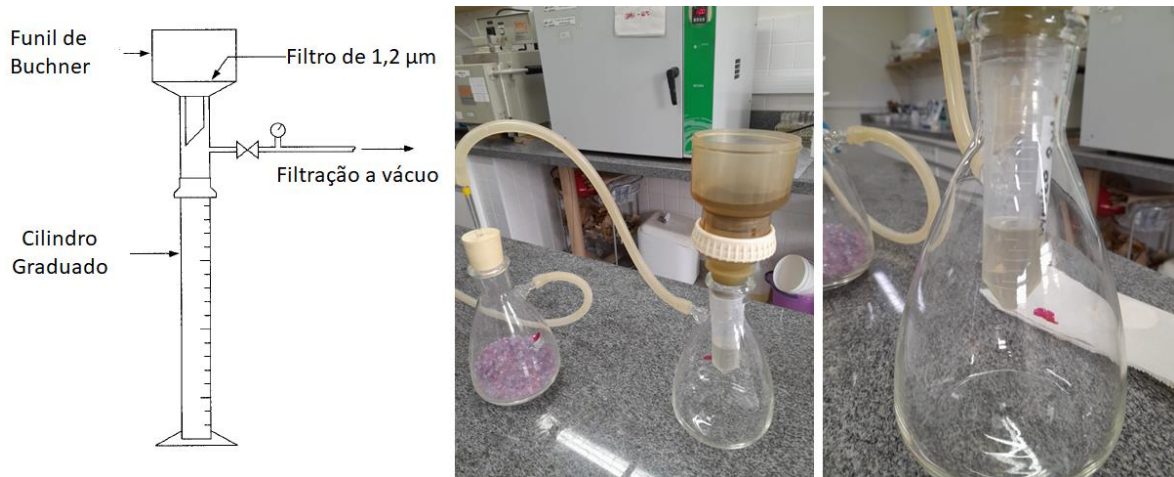
O desaguamento do lodo foi avaliado pelo Ensaio de Tempo de Filtração (TTF, do inglês *Time to Filter*) e pela Resistência Específica a Filtração (SRF, do inglês *Specific Resistance to Filtration*). O Ensaio de TTF (Figura 2.3) foi adaptado do método descrito em APHA (2012) quanto ao aparato experimental e correlaciona o tempo de filtração com o tempo de sucção capilar. O experimento consistiu em inserir 50 mL de amostra de lodo em funil de Buchner com filtro (1,2 µm), sob vácuo constante de 51 kPa e mensurar o tempo necessário para obtenção de 25 mL de filtrado (50% do volume original da amostra). A SRF é determinada pela Equação 2.1 conforme ARHAN et al. (1996) e os parâmetros são mensurados pelo Teste de Funil de Buchner (WISNIEWSKI & GRASMICK, 1998).

$$SRF = \frac{2bPA^2}{\mu c}$$

Equação 2.1

Onde P é a pressão aplicada ($\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$); A é a área de filtração (m^2); μ é a viscosidade dinâmica ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$); c é a concentração de sólidos/unidade de volume filtrado ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) = $1/C_i/(100 - C_i) - C_f/(100 - C_f)$; C_i é a umidade inicial (%); C_f é a umidade final (%); b é o coeficiente angular da curva t/v vs. v ; v é o volume filtrado (m^3); e t é o tempo de filtração (s).

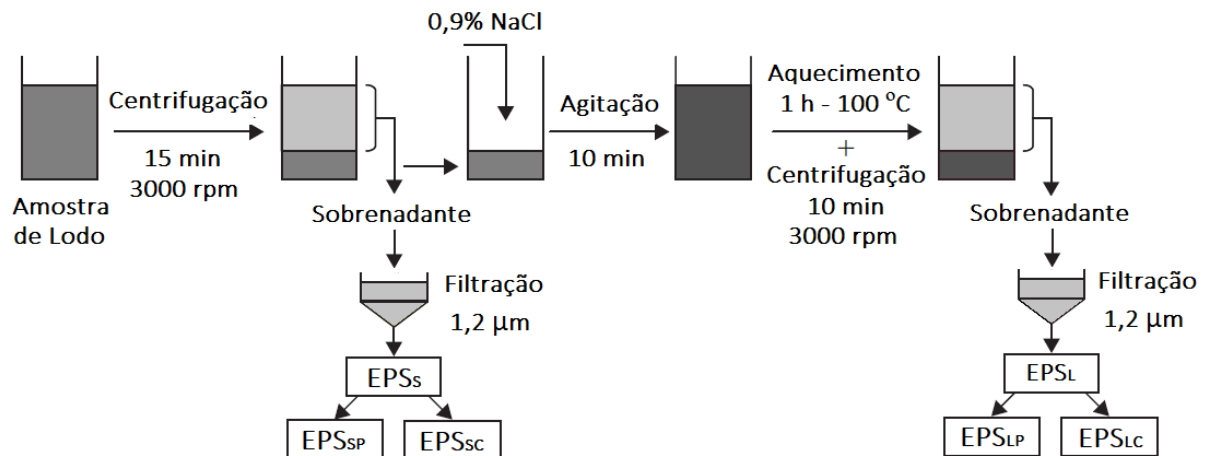
Figura 2.3. Ensaio de Tempo de Filtração do lodo



Fonte: Adaptado de APHA (2012).

O quantitativo de EPS no lodo foi extraído de acordo com método desenvolvido por MORGAN et al. (1990) e detalhadamente descrito por JUDD (2006) (Figura 2.4). O EPS extraído foi quantificado quanto a proteínas (LOWRY-FOLIN, 1951) e carboidratos (DUBOIS et al, 1956). Na extração do EPS, após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi filtrado e obtido o EPS solúvel (EPS_S), que foi caracterizado quanto as proteínas (EPS_{SP}) e carboidratos (EPS_{SC}). O precipitado foi ressuspensionado em solução salina, submetido a aquecimento (100°C) por 1 hora e novamente centrifugado. O sobrenadante foi filtrado e obtido o EPS ligado (EPS_L), que foi caracterizado quanto as proteínas (EPS_{LP}) e carboidratos (EPS_{LC}).

Figura 2.4. Extração de EPS do lodo



Fonte: Autor (2023).

2.2.3. Preparo do inóculo da levedura

A levedura *R. mucilaginosa*, extremófila, identificada molecularmente por MOURA et al. (2021). Os cultivos subsequentes foram realizados em ágar Sabouraud. As leveduras foram coletadas com a alça de inoculação de 10 µL e transferidas para meio de enriquecimento conforme proposto por KITAMOTO et al. (2001) e permaneceram em incubadora com agitação de 120 rpm e temperatura controlada a 30°C por 48 horas. Para os ensaios de desaguamento, alíquotas dos inóculos foram centrifugadas durante 10 minutos a 7830 rpm e 25°C, o sobrenadante foi reservado e as células foram ressuspendidas em solução salina estéril. O inóculo foi padronizado no comprimento de onda de 600nm, para absorbância próxima de 1, o equivalente a 10^7 UFC·mL⁻¹ (MARCELINO et al., 2019). A diluição da amostra para padronização foi realizada também com solução salina estéril.

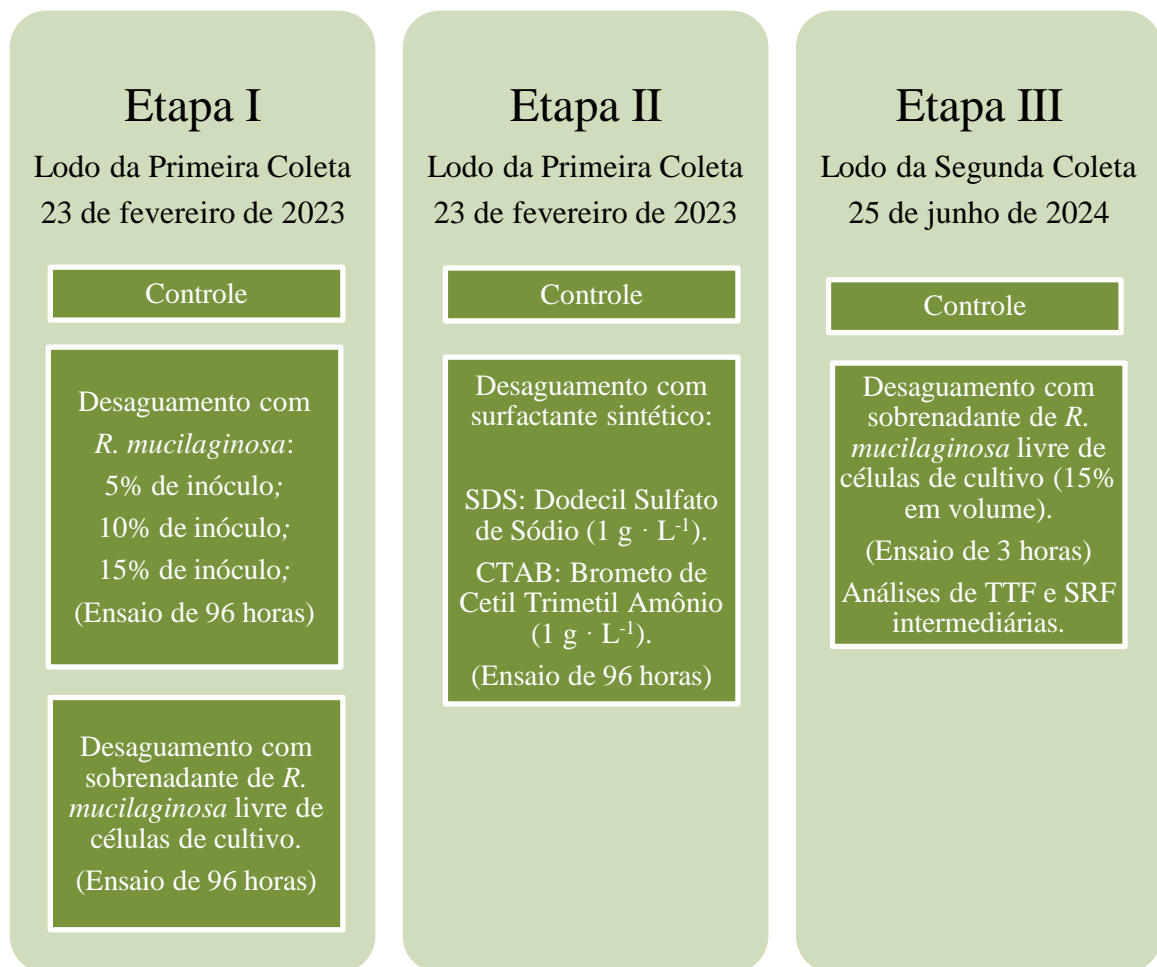
2.2.4. Experimentos de desaguamento do lodo

Para o desenvolvimento dos experimentos de desaguamento, os ensaios foram divididos em três etapas (Figura 2.5): Etapa I, que compreende ensaios com três concentrações de inóculo da levedura *R. mucilaginosa* (5, 10 e 15%), bem como ensaio com seu sobrenadante, livre de células de cultivo prévio de *R. mucilaginosa*. Nos ensaios da etapa I foram realizados monitoramento diário do pH e análises de desaguamento somente no final do tratamento (após 96 horas); Etapa 2 que compreende ensaio de desaguamento com surfactantes sintéticos, a fim

de avaliar a vantagem do uso da levedura e seu sobrenadante frente a surfactantes comerciais. No ensaio da etapa II, também foram realizados monitoramento diário do pH e análises de desaguamento somente no final do tratamento (após 96 horas); Etapa III, que compreende a reprodução do ensaio com o sobrenadante da levedura (melhor resultado de desaguamento obtido nas etapas anteriores), porém utilizando o lodo residual da ETE2 e um menor tempo de tratamento (3 horas). No ensaio da etapa III foram realizados monitoramento do pH e análises de desaguamento intermediárias (a cada 1 hora de tratamento).

Os experimentos de desaguamento foram todos conduzidos em incubadora com agitação de 150 rpm e temperatura controlada a 30°C. Os frascos (erlenmeyer de 500 mL) foram fechados com tampão de algodão e gaze, de modo a garantir a entrada de oxigênio. As condições experimentais foram detalhadas na Tabela 2.2.

Figura 2.5. Experimentos de desaguamento, condições analisadas e parâmetros monitorados em cada etapa.



Fonte: Autor (2024).

Tabela 2.2. Condições experimentais de desaguamento do lodo

Ensaio	Lodo (mL)	Inóculo ou sobrenadante de <i>R. mucilaginosa</i> (mL)	Surfactante Sintético (g)	Água destilada (mL)
Controle	200	-	-	100
Etapa I				
Levedura	200	15 ⁽¹⁾	-	85
Levedura	200	30 ⁽²⁾	-	70
Levedura	200	45 ⁽³⁾	-	55
Sobrenadante	200	45	-	55
Etapa II				
SDS ⁽⁴⁾	200	-	0,3	100
CTAB ⁽⁵⁾	200	-	0,3	100
Etapa III				
Sobrenadante	200	45	-	55

⁽¹⁾ Equivalente a $1,5 \cdot 10^8$ células de *R. mucilaginosa* (10^7 células \cdot mL⁻¹)

⁽²⁾ Equivalente a $3,0 \cdot 10^8$ células de *R. mucilaginosa* (10^7 células \cdot mL⁻¹)

⁽³⁾ Equivalente a $4,5 \cdot 10^8$ células de *R. mucilaginosa* (10^7 células \cdot mL⁻¹)

⁽⁴⁾ SDS: Dodecil Sulfato de Sódio.

⁽⁵⁾ CTAB: Brometo de Cetil Trimetil Amônio.

Fonte: Autor (2024).

Os experimentos foram realizados em triplicatas, a partir dos quais foram calculadas as médias e desvio padrão em cada caso. A significância entre os resultados de TTF para as condições de desaguamento foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA, não paramétrico) no XLSTAT®, utilizado para testar se houve redução significativa do TTF dos diferentes tratamentos avaliados no nível de significância de 5%. No caso da existência de redução significativa, a probabilidade de significância (*p*-valor) é inferior a 0,05. Para identificar quais pares de condições possuem TTF significativamente diferentes foi realizado adicionalmente o teste *post-hoc* de Comparações Múltiplas de Dunn (Teste de Dunn, 1964) também no nível de significância de 5%. Para levar em conta o fato de que existem múltiplas comparações em *k* grupos, foi utilizada a correção de Bonferroni. Os testes de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn podem ser aplicados caso rejeitada a hipótese de distribuição normal dos dados. A normalidade dos dados foi avaliada e rejeitada pelos testes Shapiro-Wilk, Anderson-Darling e Lillifors.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1. Caracterização inicial do lodo

Após as coletas, conforme detalhado no item 2.2.1., o lodo bruto foi submetido a uma caracterização inicial (Tabela 2.3), que compreende parâmetros físico-químicos, como pH e sólidos e uma caracterização inicial dos parâmetros de desaguamento, como TTF, SRF e EPS.

Tabela 2.3. Caracterização inicial dos lodos em triplicatas: parâmetros físico-químicos e de desaguamento

Parâmetro	Análise	Resultado
ETE1 – Coleta realizada em 23 de fevereiro de 2023		
Físico-químicos	pH	7,1 ± 0,2
	Sólidos Totais (ST)	6.078,3 ± 108,7 mg · L ⁻¹
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	4.523,3 ± 368,9 mg · L ⁻¹
	TTF	22,8 ± 3,3 min
Desaguamento	SRF	5,1 · 10 ¹⁴ m · kg ⁻¹
	EPS solúvel	25,2 ± 1,4 mg de carboidratos · L ⁻¹
		40,1 ± 2,3 mg de proteínas · L ⁻¹
	EPS ligado	55,9 ± 3,1 mg de carboidratos · L ⁻¹
		52,8 ± 2,0 mg de proteínas · L ⁻¹
	ETE 2 – Coleta realizada em 25 de junho de 2024	
Físico-químicos	pH	6,8 ± 0,1
	Sólidos Totais (ST)	3.727,5 ± 104,6 mg · L ⁻¹
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	2.767,2 ± 91,2 mg · L ⁻¹
	TTF	10,5 ± 0,1 min
Desaguamento	SRF	8,3 · 10 ¹³ m · kg ⁻¹
	EPS solúvel	10,1 ± 1,1 mg de carboidratos · L ⁻¹
		98,2 ± 1,4 mg de proteínas · L ⁻¹
	EPS ligado	47,8 ± 0,3 mg de carboidratos · L ⁻¹
67,5 ± 4,8 mg de proteínas · L ⁻¹		

Fonte: Autor (2024).

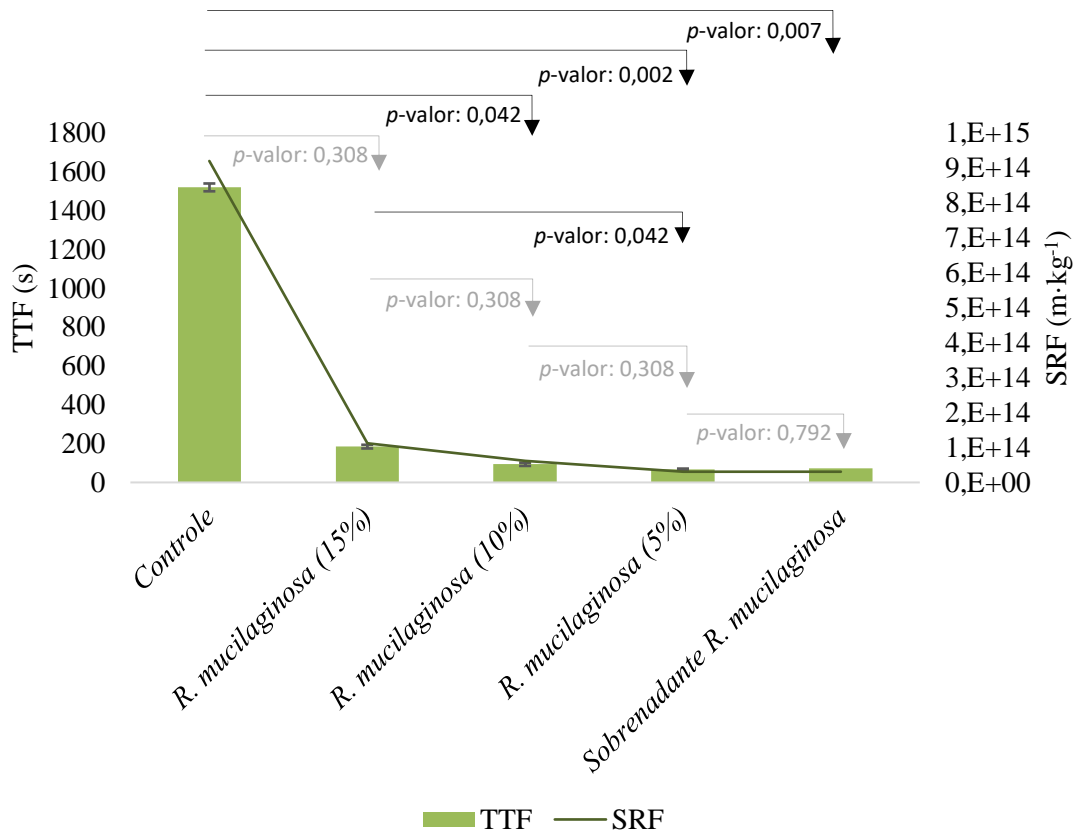
2.3.2. Experimentos de desaguamento do lodo – Primeira Coleta

O desaguamento do lodo nos ensaios avaliados foi mensurado pelo TTF e SRF, bem como caracterizado quanto o conteúdo de proteínas e carboidratos nas frações solúvel e ligada de EPS. Ao longo das 96 horas de tratamento foi realizado o monitoramento diário do pH das amostras. O tratamento do lodo com as três concentrações de inóculo da levedura (*R. mucilaginosa*) resultaram em redução do TTF e SRF (Figura 2.6, Tabela 2.4). No entanto, menores resultados de TTF ($1,1 \pm 0,2$ min) e SRF ($3,1 \cdot 10^{13}$ m · kg⁻¹) foram obtidos com a menor concentração de inóculo de *R. mucilaginosa*. Com o aumento das concentrações de inóculo houve redução do TTF em 95,5%, 93,8% e 87,8%, para as concentrações de 5%, 10% e 15% de inóculo respectivamente. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstraram que a redução no TTF foi significativa para as concentrações de 5% e 10% de inóculo de *R. mucilaginosa*, no nível de significância de 5%, e a redução mais significativa entre as três concentrações foi com 5% de inóculo (*p*-valor: 0,002).

Os resultados de TTF e SRF do tratamento do lodo com o sobrenadante do inóculo da levedura *R. mucilaginosa* demonstraram reduções de 95,3% ($1,2 \pm 0,1$ min) no TTF e 94,1% 95,8% ($3,1 \cdot 10^{13}$ m · kg⁻¹) no SRF, comparado com o TTF ($25,4 \pm 0,3$ min) e SRF ($9,2 \cdot 10^{14}$ m · kg⁻¹) do lodo controle (Figura 2.6, Tabela 2.4). Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstraram que a redução no TTF foi significativa entre o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa* e o lodo controle no nível de significância de 5% (*p*-valor: 0,007). Comparado o tratamento com 5% de inóculo da levedura ($1,1 \pm 0,2$ min) com o tratamento utilizando o sobrenadante TTF foi bastante semelhante ($1,2 \pm 0,1$ min), sem diferença significativa no nível de significância de 5%. Embora o tratamento com o inóculo da levedura seja eficaz, o uso de seu sobrenadante pode ser vantajoso pois a biomassa fúngica pode ser reaproveitada para extração de carotenoides e servir de inoculo para novas fermentações.

O monitoramento do pH evidenciou pequena redução ao longo das 96 horas de tratamento com as três concentrações de inóculo e com o sobrenadante (Figura 2.7. 2.7), e a partir de 72h foi observada pequena diferenciação entre as concentrações de 10% e 15% comparado com a concentração de 5%. Houve diferença no pH de partida entre os tratamentos com o inóculo e com o sobrenadante.

Figura 2.6. TTF e SRF médios do lodo durante o desaguamento com a levedura (*R. mucilaginosa*) e seu sobrenadante



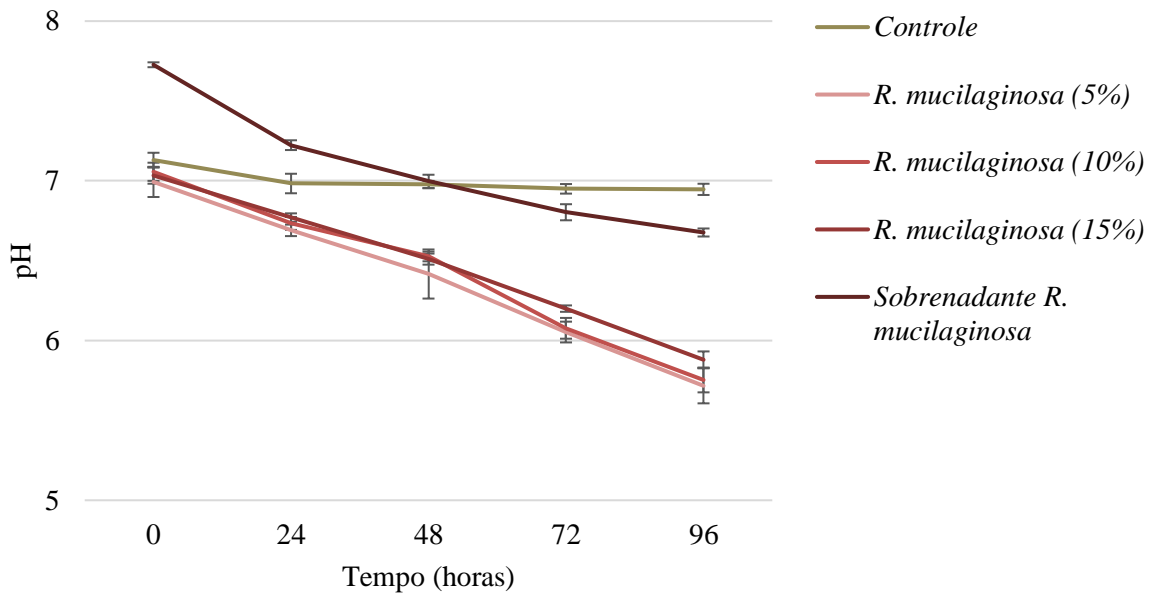
Fonte: Autor (2024).

Tabela 2.4. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com a levedura (*R. mucilaginosa*) e seu sobrenadante

Ensaio	TTF (min)	Variação %	SRF (m·kg ⁻¹)	Variação %
Controle	25,3 ± 0,3	-	9,2 · 10 ¹⁴	-
<i>R. mucilaginosa</i> (15%)	3,1 ± 0,2	↓ 87,9	1,1 · 10 ¹⁴	↓ 87,8
<i>R. mucilaginosa</i> (10%)	1,6 ± 0,1	↓ 93,8	6,1 · 10 ¹³	↓ 93,3
<i>R. mucilaginosa</i> (5%)	1,1 ± 0,1	↓ 95,5	3,1 · 10 ¹³	↓ 96,7
Sobrenadante <i>R. mucilaginosa</i>	1,2 ± 0,1	↓ 95,3	3,1 · 10 ¹³	↓ 96,7

Fonte: Autor (2024).

Figura 2.7. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com a levedura (*R. mucilaginosa*) e seu sobrenadante



Fonte: Autor (2024).

Com a caracterização de EPS, observou-se que os tratamentos com inóculo de *R. mucilaginosa* aumentaram as concentrações de carboidratos totais no EPS comparado com o lodo controle (Figura 2.8). No entanto, a proporção de carboidratos na fração ligada foi reduzida a 53,1%, 50,7% e 52,5%, para as concentrações de inóculo de 5%, 10% e 15%, respectivamente, em comparação com o lodo controle (68,9%).

Semelhante ao observado com a concentração de carboidratos totais, o desaguamento do lodo com *R. mucilaginosa* também aumentou as concentrações de proteínas totais no EPS (Figura 2.9). No entanto, o percentual de proteínas na fração ligada, nas três concentrações de inóculo de *R. mucilaginosa*, reduziu significativamente com o tratamento: 8,7%, 8,3% e 8,0%, para as concentrações de inóculo de 5%, 10% e 15%, respectivamente. Os resultados de concentração de proteínas na fração ligada de EPS não apresentaram grandes variações entre as três concentrações de inóculo de *R. mucilaginosa*.

Relacionando os resultados de filtração (TTF e SRF) com os resultados de caracterização de EPS, observou-se que com o aumento da concentração de inóculo, houve um aumento nas concentrações de carboidratos e proteínas totais em EPS. Embora não se tenha observado aumento significativo na concentração de proteínas ligadas.

O tratamento com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa* também resultou em um aumento nas concentrações de carboidratos totais, mas esse aumento foi mais significativo com

o sobrenadante da levedura do que com os inóculos (Figura 2.8). Em relação as concentrações de carboidratos nas frações de EPS, observou-se que no lodo controle, a maior parcela dos carboidratos encontra-se na fração ligada ($55,9 \pm 3,1$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 68,9% dos carboidratos totais ($81,1 \pm 4,5$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹). O tratamento do lodo com o sobrenadante proporcionou liberação dos carboidratos da fração ligada, resultando em um maior percentual de carboidratos na fração solúvel ($263,7 \pm 0,1$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 73,3% dos carboidratos totais.

Semelhantemente ao observado com a concentração de carboidratos totais, o tratamento do lodo com o sobrenadante também aumentou as concentrações de proteínas totais. Embora, neste caso, o aumento com o sobrenadante tenha sido semelhante ao aumento da concentração de proteínas com os inóculos (Figura 2.9). Este aumento da concentração de proteínas totais foi de aproximadamente cinco vezes em relação ao lodo controle.

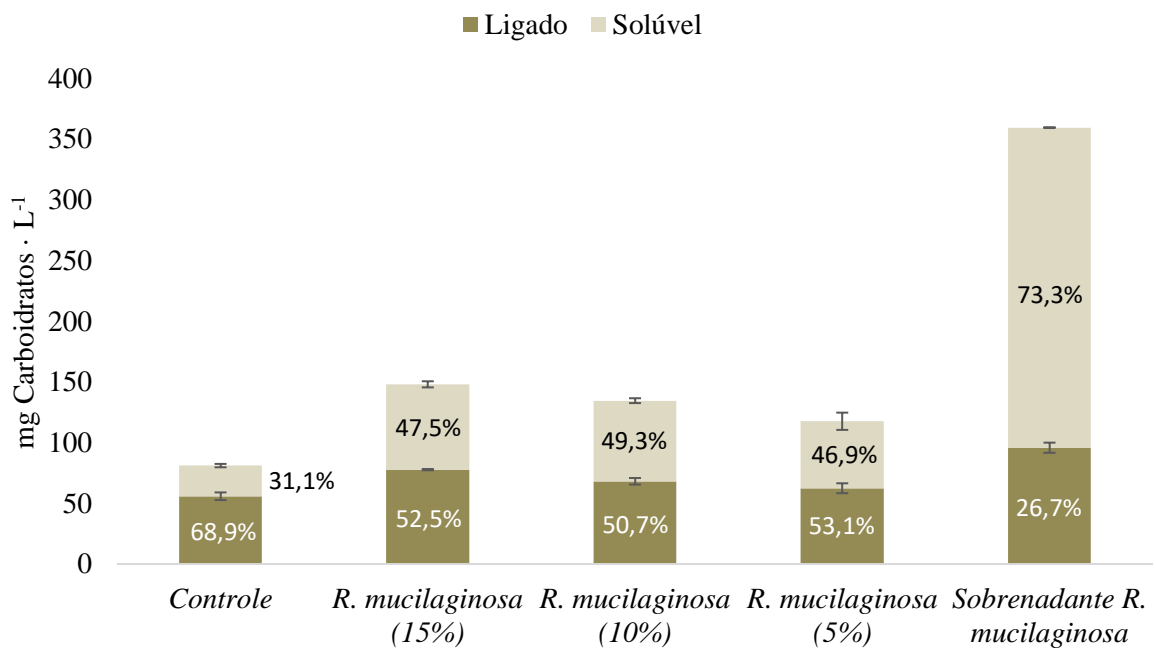
Referente as concentrações de proteínas nas frações de EPS, no tratamento do lodo com o sobrenadante da *R. mucilaginosa*, a maior parcela da concentração de proteínas, encontra-se na fração solúvel de EPS ($334,9 \pm 4,8$ mg de proteínas \cdot L⁻¹), equivalente a 92,5% das proteínas totais ($362,2 \pm 8,7$ mg de proteínas \cdot L⁻¹). Este resultado demonstra que, tanto para os inóculos quanto, para o sobrenadante houve uma conversão eficiente de proteínas da fração ligada para a fração solúvel do lodo em relação ao lodo controle.

Em um estudo semelhante, de KURADE et al. (2016), foi testado floculante biogênico produzido por *A. ferrooxidans* para condicionamento de lodo e melhoria do desaguamento. Os autores constataram que o floculante biogênico reduziu rapidamente o pH, diminuiu o CST e a SRF do lodo em 74% e 89%, respectivamente, em comparação com o lodo controle. Entre as justificativas de melhoria do desaguamento, os autores destacaram que como as partículas de lodo são carregadas negativamente, a força de repulsão entre as partículas impede com que se agreguem e sedimentem. Na análise da estrutura microscópica dos flocos de lodo, observaram que a morfologia dos flocos do controle era de flocos pequenos, totalmente dispersos na fase aquosa sem apresentar qualquer agregação/floculação, mas após o tratamento com o floculante biogênico exibiram limites entre os flocos individuais bastante claros e com conexões entre as partículas individuais muito mais baixas do que os flocos de lodo de controle. Além disso, o tamanho dos flocos formados foi maior, consistente e compacto, mostrando formação clara de flocos (KURADE et al. 2016).

Outro estudo também comparou desaguamento do lodo inoculado com cultura de *A. ferrooxidans* (células sem meio) com o filtrado da cultura sem células. Os resultados demonstraram melhoria efetiva do desaguamento do lodo, conforme evidenciado pela redução

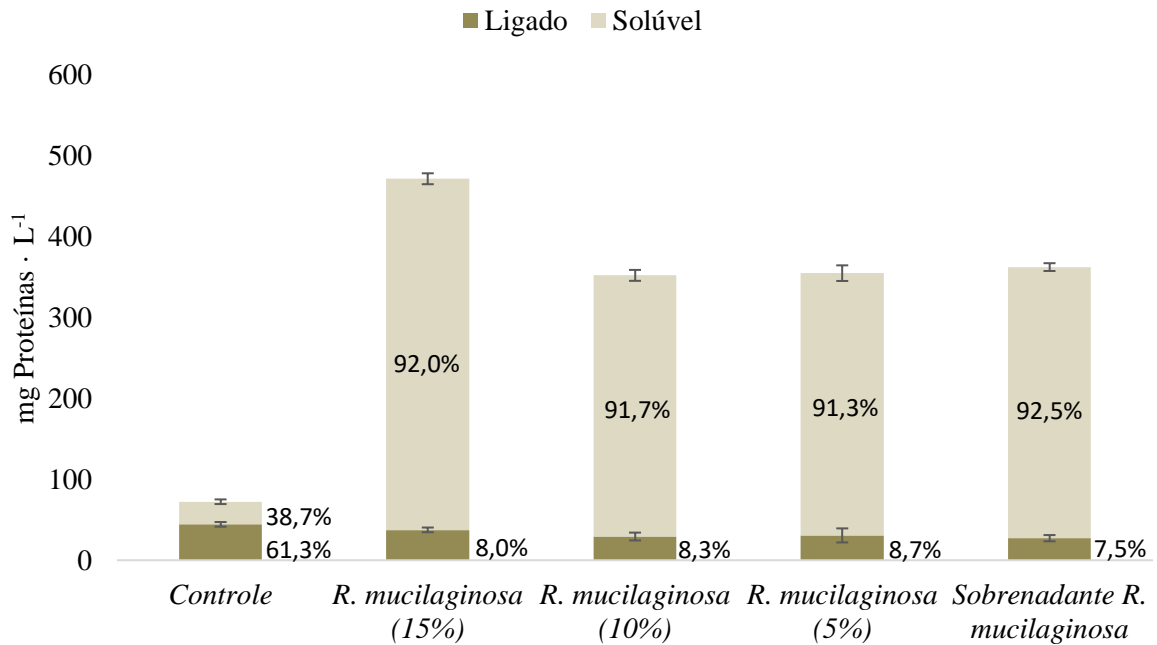
do CST para 20 segundos e SRF em 90% em um período de tratamento de 1 a 2 dias. O floculante biogênico produzido por *A. ferrooxidans*, por sua vez, diminuiu o CST e melhorou o desaguamento do lodo em apenas 4 horas. Este estudo demonstra eficiência da cultura e do sobrenadante da cultura de *A. ferrooxidans* na melhoria do desaguamento do lodo. No entanto, embora o inóculo seja eficaz, requer um tempo substancial para atingir o desaguamento, enquanto o sobrenadante pode ser usado como floculante sem a adição de fonte de energia aos microrganismos (neste caso Fe^{2+}), obtendo-se rápida floculação e desaguamento do lodo (WONG et al. 2016).

Figura 2.8. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a levedura (*R. mucilaginosa*) e seu sobrenadante



Fonte: Autor (2024).

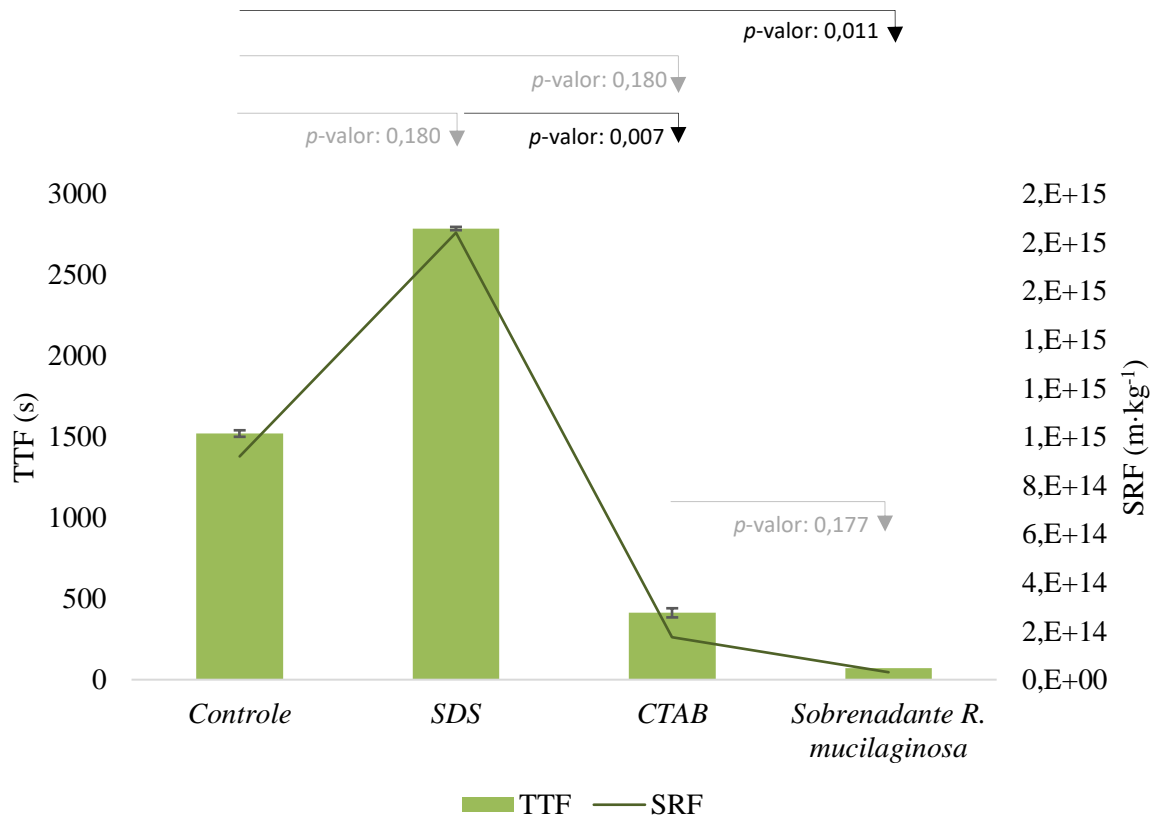
Figura 2.9. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a levedura (*R. mucilaginosa*) e seu sobrenadante



Fonte: Autor (2024).

Os resultados de TTF e SRF do tratamento do lodo com o surfactante sintético CTAB ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) demonstraram uma redução de 72,8% ($6,9 \pm 0,5 \text{ min}$) no TTF e 79,0% ($1,7 \cdot 10^{14} \text{ m} \cdot \text{kg}^{-1}$) na SRF, respectivamente, comparado com o TTF ($25,4 \pm 0,3 \text{ min}$) e SRF ($9,2 \cdot 10^{14} \text{ m} \cdot \text{kg}^{-1}$) do lodo controle. O tratamento do lodo com o surfactante sintético SDS ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) aumentou o TTF ($46,5 \pm 0,2 \text{ min}$) e SRF ($1,8 \cdot 10^{15} \text{ m} \cdot \text{kg}^{-1}$) em 83,2% e 116,5%, respectivamente, indicando uma deterioração da capacidade de desaguamento com a adição do SDS (Figura 2.10, Tabela 2.5). Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstraram que houve diferença significativa no TTF entre os surfactantes avaliados, no nível de significância de 5% (p -valor: 0,007). O desaguamento com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa* (TTF: $1,2 \pm 0,1 \text{ min}$; SRF: $3,1 \cdot 10^{13} \text{ m} \cdot \text{kg}^{-1}$) apresentou TTF aproximadamente seis vezes menor do que o desaguamento com o surfactante sintético CTAB ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). O monitoramento do pH evidenciou um incremento com os surfactantes sintéticos ao longo das 96 horas de lixiviação (Figura 2.11). Cabe ressaltar que os surfactantes CTAB e SDS são mais ativos em pH alcalino.

Figura 2.10. TTF e SRF médios do lodo durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa*



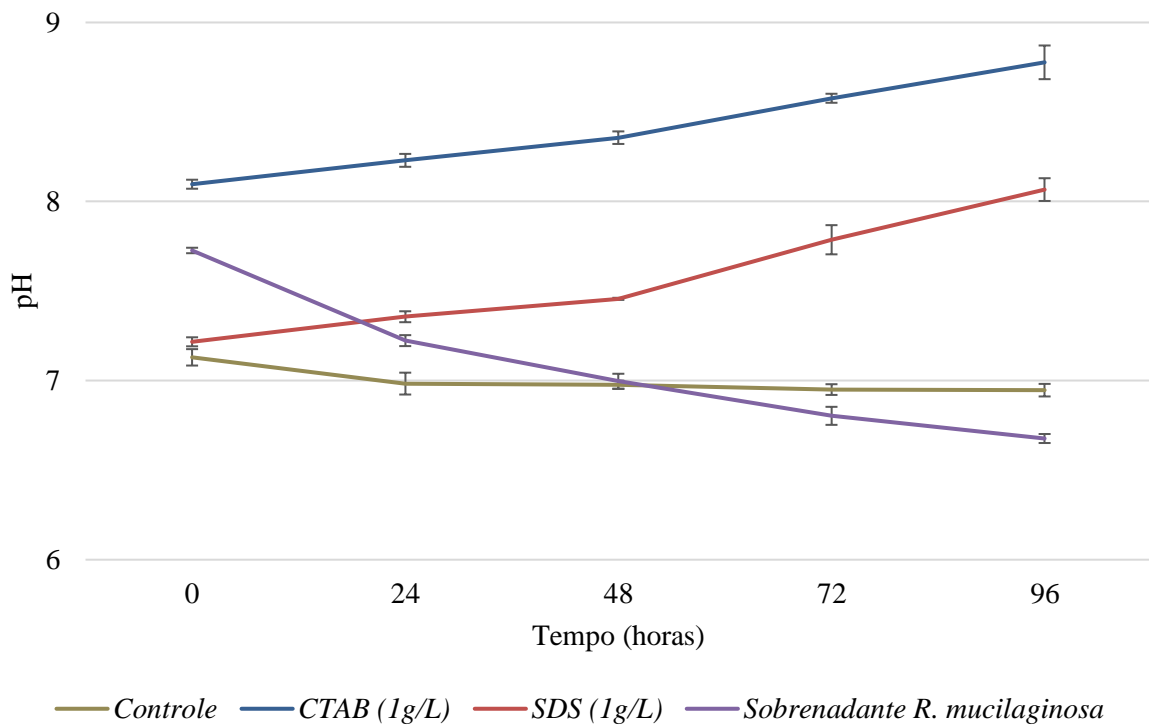
Fonte: Autor (2024).

Tabela 2.5. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos e sobrenadante levedura (*R. mucilaginosa*)

Ensaio	TTF (min)	Variação %	SRF (m·kg ⁻¹)	Variação %
Controle	25,3 ± 0,3	-	9,2 · 10 ¹⁴	-
SDS	46,5 ± 0,2	↑ 83,3	1,8 · 10 ¹⁵	↑ 100,0
CTAB	6,9 ± 0,5	↓ 72,8	1,7 · 10 ¹⁴	↓ 81,1
Sobrenadante <i>R. mucilaginosa</i>	1,2	↓ 95,3	3,1 · 10 ¹³	↓ 96,7

Fonte: Autor (2024).

Figura 2.11. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa*



Fonte: Autor (2024).

Em relação ao teor de EPS, os tratamentos do lodo com os surfactantes sintéticos não apresentaram grandes variações nas concentrações de carboidratos totais comparado com o lodo controle (Figura 2.12). Avaliando as concentrações de carboidratos nas frações de EPS, observa-se que no lodo controle, a maior parcela dos carboidratos encontra-se na fração ligada ($55,9 \pm 3,1$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), que equivale a 68,9% dos carboidratos totais ($81,1 \pm 4,5$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), e com o tratamento do lodo com o surfactante sintético CTAB (1 g \cdot L⁻¹) houve liberação dos carboidratos da fração ligada, resultando em um maior percentual de carboidratos na fração solúvel ($62,3 \pm 3,7$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 78,4% dos carboidratos totais ($79,4 \pm 6,7$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹). Resultado semelhante foi obtido com o surfactante sintético SDS (1 g \cdot L⁻¹), no entanto, a conversão do carboidrato ligado em carboidrato solúvel foi menos eficiente, resultando em um percentual de 60,5% de carboidratos na fração solúvel ($46,0 \pm 2,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹) comparado a 39,5% de carboidratos na fração ligada ($30,1 \pm 4,7$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹).

Diferentemente do observado com a concentração de carboidratos totais, o tratamento do lodo com os surfactantes sintéticos aumentou significativamente as concentrações de

proteínas totais comparado com o lodo controle (Figura 2.13). Este aumento da concentração de proteínas totais foi de aproximadamente seis vezes e meia para o tratamento do lodo com $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de CTAB ($467,3 \pm 8,7 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$) e onze vezes para o tratamento do lodo com $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de SDS ($783,1 \pm 7,7 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$). Avaliando as concentrações de proteínas nas frações de EPS, observou-se que com o tratamento do lodo com CTAB ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), a maior parcela da concentração de proteínas, encontra-se na fração solúvel ($438,6 \pm 4,8 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$), equivalente a 93,9% das proteínas totais ($467,3 \pm 8,7 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$). Enquanto no tratamento do lodo com SDS ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), essa proporção foi de 47,4% da concentração de proteínas na fração solúvel ($371,1 \pm 3,9 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$) e 52,6% na fração ligada ($412,0 \pm 3,9 \text{ mg de proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$), demonstrando que entre os dois tratamentos analisados, o CTAB ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) teve um incremento menor na concentração de proteínas totais e uma liberação mais eficiente de proteínas da fração ligada.

O CTAB é um surfactante catiônico e alguns de seus mecanismos de atuação são a lise celular e desnaturação de proteínas, a precipitação de ácidos nucleicos e a remoção de polissacarídeos da solução. Já o SDS é um surfactante aniônico cujo mecanismo de atuação é a solubilização e desnaturação de proteínas, lipídios e outras moléculas hidrofóbicas. Relacionando os resultados de TTF e SRF dos surfactantes sintéticos com os resultados de caracterização de EPS, observou-se que houve melhoria do desaguamento do lodo com o surfactante sintético CTAB podendo relacionar-se com a redução da concentração de proteínas da fração ligada. Com o surfactante SDS, entretanto, houve degradação do desaguamento e embora descrito na literatura como eficiente na solubilização e proteínas, neste estudo foi observado um incremento das proteínas em EPS.

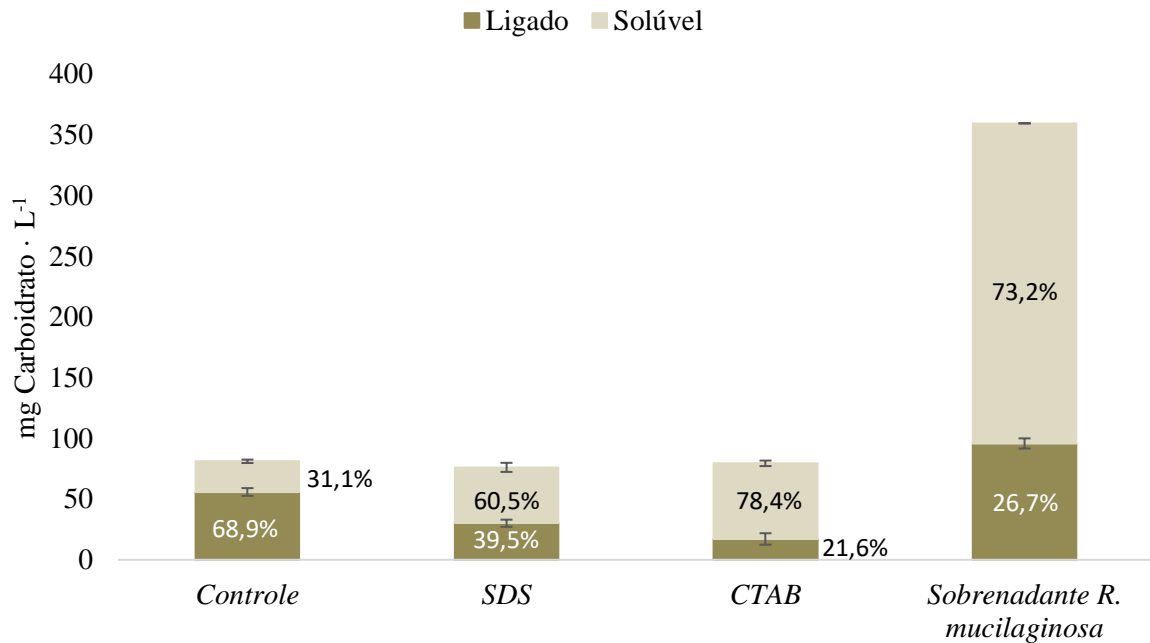
Cabe ressaltar que a principal diferença entre surfactantes catiônicos e aniônicos é a carga do grupo principal, de modo que os surfactantes catiônicos possuem carga positiva e, portanto, são atraídos por substâncias com carga negativa e os surfactantes aniônicos possuem carga negativa e, portanto, são atraídos por carga positiva. Conforme descrito no CAPÍTULO 1, os flocos de lodo têm uma carga de superfície negativa e um potencial zeta entre -30 e -10 mV (CAO et al. 2021). Desta forma, o condicionamento químico com CTAB também agiu neutralizando a carga na superfície do lodo, pois suas partículas adsorvem na superfície as partículas negativas do lodo, desestabilizando o sistema e promovendo a agregação dos flocos. A extensão de floculação ideal para melhorar o desaguamento depende fortemente do pH da solução, pois após o ponto isoelétrico ser atingido (carga elétrica líquida igual a zero) ocorre a reversão da carga superficial e quebra do agregado de floco de lodo (HYRYCZ et al. 2022).

Outros estudos também investigaram o desaguamento de lodos ativados por tensoativos catiônicos e reportaram uma melhoria no desaguamento com o uso do surfactante sintético CTAB ($1,042 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), atribuída aos efeitos integrados de neutralização eletrostática (diminuição da carga negativa dos flocos de lodo), maior compactação e liberação de EPS e água ligada (WANG et al. 2014^a). Neste mesmo estudo houve comparação do CTAB com o surfactante Brometo de Dodecil Trimetil Amônio (DTAB), e descobriram que o CTAB é mais eficaz que o DTAB na promoção do desaguamento do lodo devido à sua maior atividade superficial. Neste estudo, $1,042 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de CTAB, reduziu o SRF do lodo de 5,98 para $4,11 \cdot 10^{13} \text{ m} \cdot \text{kg}^{-1}$ e desaguamento aprimorado semelhante do lodo também foi observado por YUAN et al. (2011) com uma combinação de CTAB e pré-tratamento de eletrólise.

No estudo de YUAN et al. (2011) o SDS também apresentou efeito negativo no desaguamento do lodo com e sem eletrólise, enquanto o CTAB teve um efeito positivo. Com o tratamento do lodo com SDS, a SRF e CST apresentaram tendências crescentes. O aumento da concentração de EPS, a diminuição da viscosidade e do potencial zeta foram determinados como as principais razões para as alterações observadas no desaguamento do lodo.

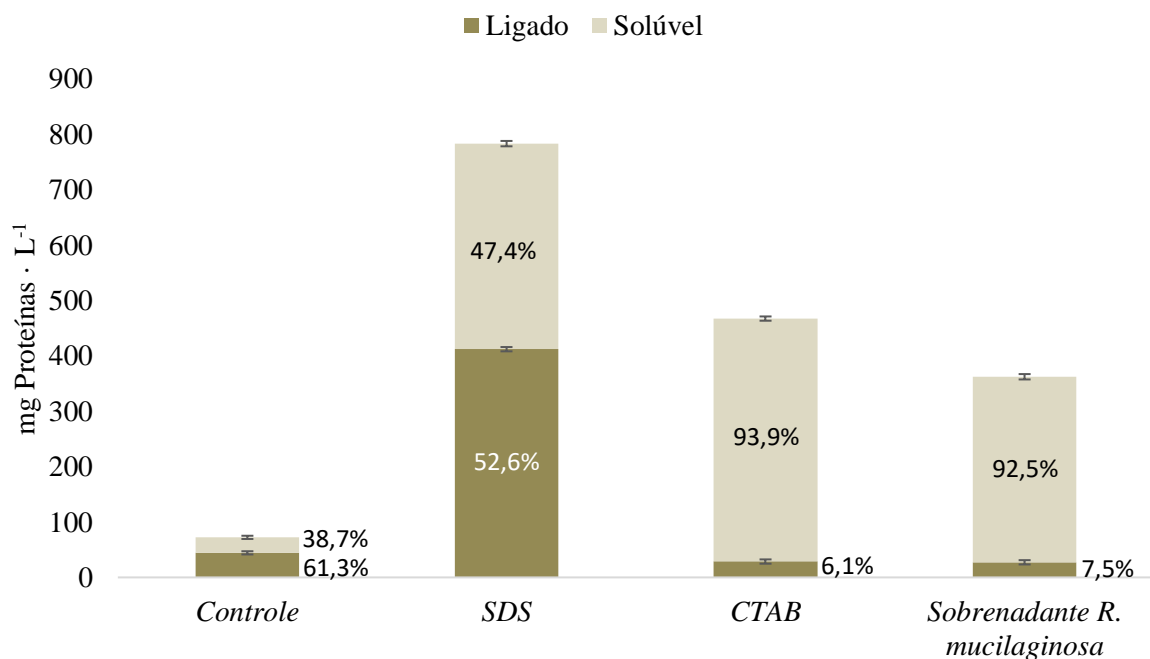
Em WANG et al (2014b), o desaguamento do lodo foi significativamente deteriorado na dosagem de $2,084 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de SDS e o CST e a SRF aumentaram 6,3 e 5,1 vezes, respectivamente, comparado ao lodo bruto. As correlações entre o teor de EPS e as propriedades do lodo foram avaliadas e papel significativo das proteínas na sedimentabilidade e desaguamento do lodo foram apontadas.

Figura 2.12. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa*



Fonte: Autor (2024).

Figura 2.13. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB, comparado com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa*



Fonte: Autor (2024).

2.3.3. Experimentos de desaguamento do lodo – Segunda Coleta

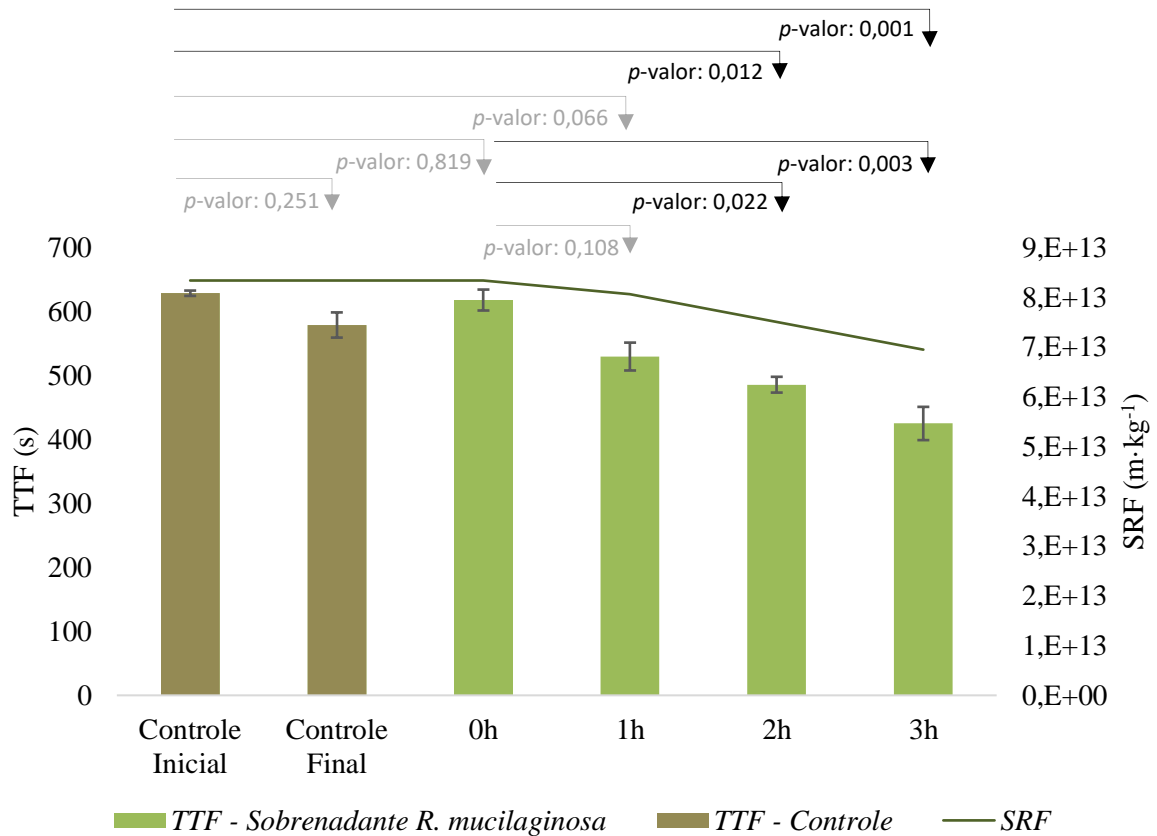
A fim de replicar o tratamento com melhor resultado obtido na etapa anterior (sobrenadante da levedura), uma segunda amostra de lodo foi coletada em outra estação de tratamento. O tratamento com o sobrenadante da levedura foi aplicado em ensaio de menor duração (3 horas) e com análises intermediárias de desaguamento, a cada 1 hora. O novo ensaio teve como objetivo testar a aplicabilidade do melhor resultado obtido na etapa anterior em outros tipos de lodo, bem como identificar, a partir das análises intermediárias, se o desaguamento pode ser obtido em menor tempo de tratamento, haja vista o sobrenadante, livre de células de cultivo, não necessitar do tempo de adaptação necessário quando utilizado o inóculo no tratamento.

O desaguamento do lodo também foi mensurado pelo TTF e SRF, bem como caracterizado quanto o conteúdo de proteínas e carboidratos nas frações solúvel e ligada de EPS. Os resultados, apresentados na Figura 3.14 e Tabela 2.6, indicam redução significativa do TTF (p -valor $< 0,05$) a partir de 1 hora de tratamento, atingindo TTF de $7,1 \pm 0,4$ minutos e SRF de $6,9 \cdot 10^{13} \text{ m} \cdot \text{kg}^{-1}$ em 3 horas (p -valor: 0,001), aproximadamente 32,4% de redução em relação ao controle inicial ($10,5 \pm 0,1$ min). No entanto, as reduções de TTF e SRF foram menos expressivas comparado aos resultados obtidos com o lodo avaliado anteriormente, demonstrando grande influência da composição, características físico-químicas do esgoto e tipologia de tratamento.

Embora os resultados de TTF e SRF da ETE2 sejam menos expressivos comparado aos resultados da ETE1, com o ensaio de menor duração com o sobrenadante da *R. mucilaginosa* foi possível identificar que o TTF variou em taxa inferior a 10% entre os tempos analisados, indicando que pode ser obtida estabilidade do TTF e conseqüentemente o desaguamento máximo em tempo inferior a quatro dias de tratamento.

O monitoramento do pH evidenciou baixa variação ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da *R. mucilaginosa* (Figura 2.15) e a partir de 1h foi observado pequeno aumento comparado ao lodo controle. Houve pequena diferença entre os pHs de partida do tratamento e do lodo controle.

Figura 2.14. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (*R. mucilaginosa*).



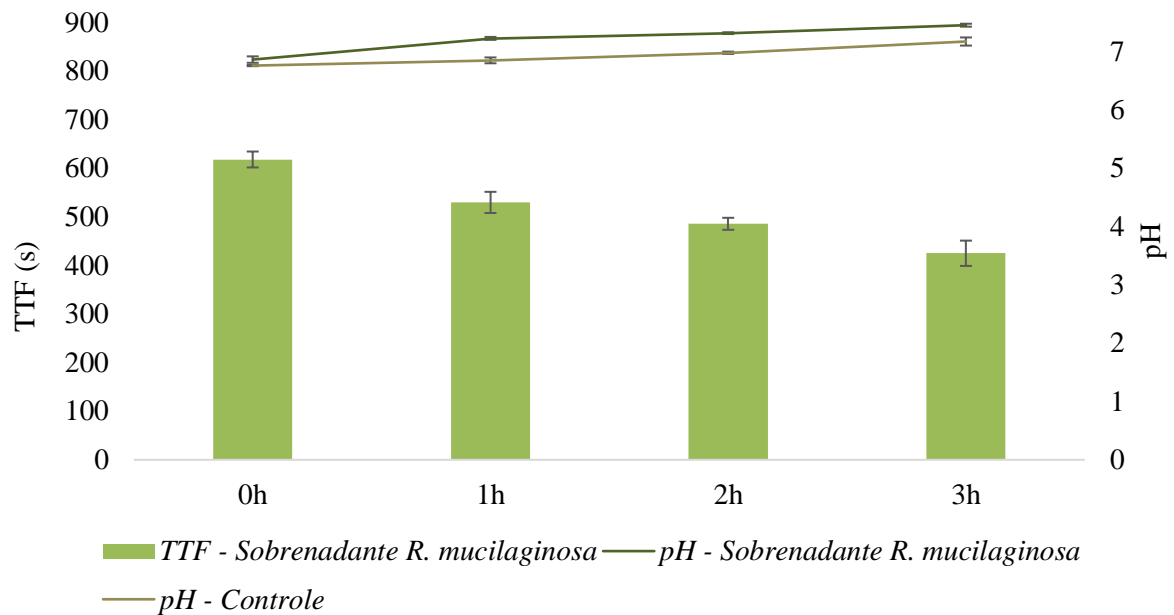
Fonte: Autor (2024).

Tabela 2.6. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com o sobrenadante da levedura (*R. mucilaginosa*)

Ensaio	TTF (min)	Variação %	SRF (m·kg ⁻¹)	Variação %
Controle inicial	10,5 ± 0,1	-	8,3 · 10 ¹³	-
0h	10,3 ± 0,3	↓ 1,7	8,3 · 10 ¹³	0
1h	8,8 ± 0,4	↓ 15,7	8,1 · 10 ¹³	↓ 3,3
2h	8,1 ± 0,2	↓ 22,7	7,5 · 10 ¹³	↓ 10,0
3h	7,1 ± 0,4	↓ 32,4	6,9 · 10 ¹³	↓ 16,7
Controle final	9,7 ± 0,3	-	8,3 · 10 ¹³	-

Fonte: Autor (2024).

Figura 2.15. Variação do pH do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (*R. mucilaginosa*)



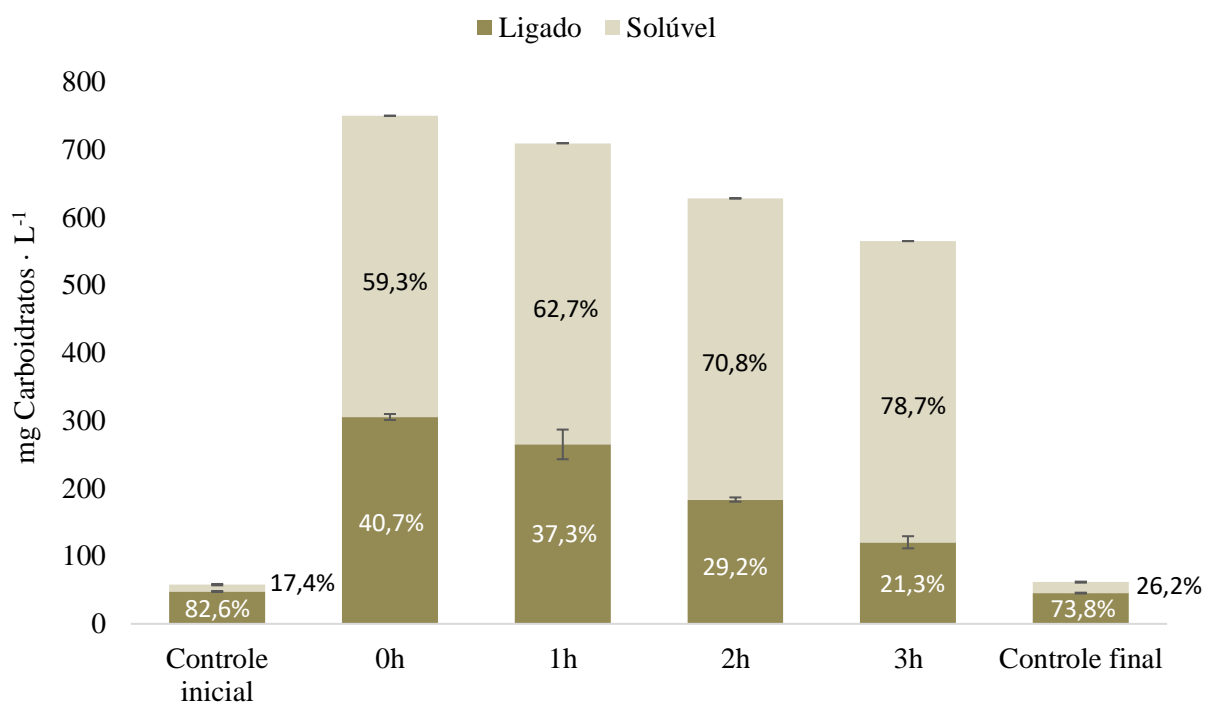
Fonte: Autor (2024).

Com a caracterização de EPS, observou-se que o tratamento com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa*, assim como com o lodo anterior, também resultou em um aumento nas concentrações de carboidratos totais, mas essas concentrações apresentaram comportamento de declínio ao longo das 3 horas de tratamento (Figura 2.16). Em relação as concentrações de carboidratos nas frações de EPS, observou-se que no lodo controle inicial, a maior parcela dos carboidratos também se encontra na fração ligada ($47,7 \pm 0,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 82,6% dos carboidratos totais ($57,8 \pm 1,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹). Assim como com o lodo da ETE 1 avaliada, o tratamento do lodo com o sobrenadante da *R. mucilaginosa* proporcionou liberação dos carboidratos da fração ligada, resultando em um maior percentual de carboidratos na fração solúvel ($444,3 \pm 0,1$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 78,7% dos carboidratos totais.

Semelhantemente ao observado com a concentração de carboidratos totais, o tratamento do lodo com o sobrenadante também aumentou as concentrações de proteínas totais, mas não de forma tão expressiva como com o lodo da ETE 1 (Figura 2.17), que fora aproximadamente cinco vezes em relação ao lodo controle. Em relação as concentrações de proteínas nas frações de EPS, no tratamento do lodo com o sobrenadante da *R. mucilaginosa*, neste caso, resultou em um pequeno aumento da concentração de proteínas na fração solúvel de EPS ($144,6 \pm 3,6$ mg

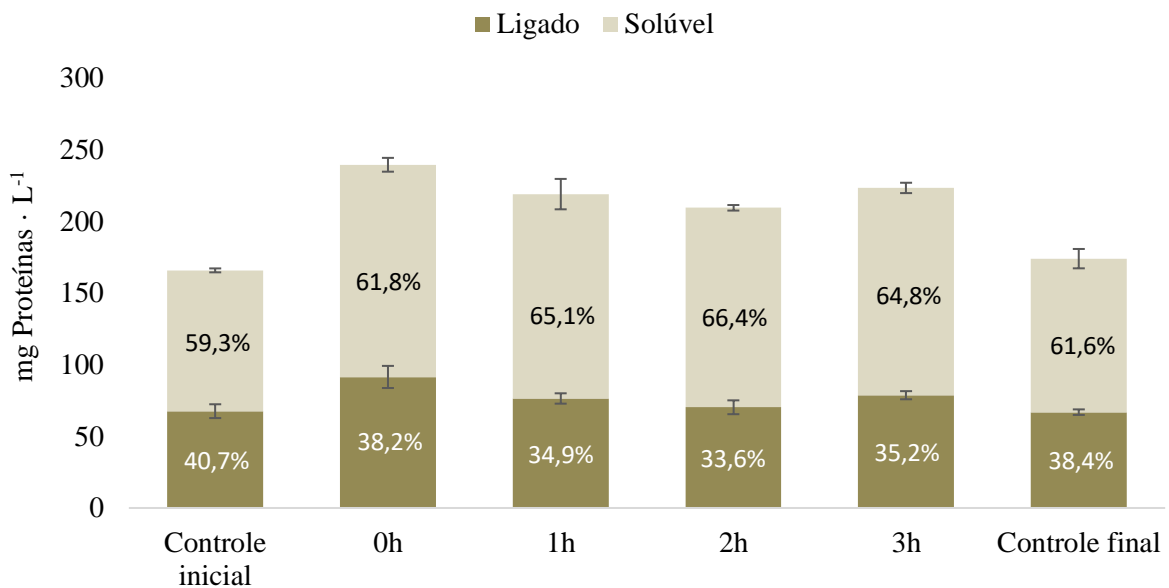
de proteínas · L⁻¹) em 3 horas de tratamento, equivalente a 64,8% das proteínas totais (223,3 ± 6,4 mg de proteínas · L⁻¹) e uma pequena diminuição da concentração de proteínas na fração ligada (78,7 ± 2,8 mg de proteínas · L⁻¹), equivalente a 35,2% das proteínas totais. Este resultado, em comparação com o lodo avaliado anteriormente, indica influência da concentração de proteínas no desaguamento, bem como a relação da redução do TTF com uma conversão eficiente de proteínas da fração ligada para a fração solúvel do lodo em relação ao lodo controle.

Figura 2.16. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (*R. mucilaginosa*)



Fonte: Autor (2024).

Figura 2.17. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da levedura (*R. mucilaginosa*)



Fonte: Autor (2024).

2.4. CONCLUSÃO

As concentrações de inóculo avaliadas apresentaram resultados de desaguamento semelhantes, mas melhor resultado de desaguamento foi obtido com a menor concentração de inóculo de *R. mucilaginosa*, com tempo de filtração aproximadamente 96% inferior ao lodo controle.

Embora a concentração de proteínas totais em EPS tenha aumentado com o tratamento utilizando inóculos, a proporção entre as frações ligadas e solúveis das proteínas foram modificadas, resultando em um percentual de proteínas na fração ligada inferior a 10% nas três concentrações analisadas. A melhoria no desaguamento relaciona-se com a redução da concentração de proteínas ligadas no EPS.

O tratamento com o sobrenadante da *R. mucilaginosa* (TTF = $1,2 \pm 0,1$ min) resultou em desempenho semelhante aos tratamentos de desaguamento com o inóculo da levedura (TTF = $1,1 \pm 0,2$ min), mas a concentração de proteínas na fração ligada foi reduzida comparado com o inóculo e com o lodo controle.

Embora o uso do inóculo seja eficaz, o uso de seu sobrenadante apresenta vantagens operacionais, pois a biomassa fúngica pode ser reaproveitada para extração de carotenoides e servir de inóculo para novas fermentações.

A reprodução dos resultados obtidos com o sobrenadante foi avaliada demonstrando grande influência da composição, características físico-químicas do esgoto e tipologia de tratamento. No entanto a utilização de sobrenadante do cultivo da levedura parece ser promissora. Os resultados de concentração de carboidratos e proteínas em EPS também apresentaram comportamento semelhante, com diferenciação em relação ao incremento da concentração de proteínas totais, que fora menor comparado ao lodo anterior, bem como uma conversão menos eficiente de proteínas da fração ligada para a fração solúvel do lodo.

Em relação aos surfactantes comerciais, houve melhoria do tempo de filtração com CTAB ($6,9 \pm 0,5$ min) comparado ao controle, mas deterioração do desaguamento com SDS ($46,5 \pm 0,2$ min). No entanto, ambos surfactantes comerciais apresentaram desempenho inferior aos tratamentos biológicos, tanto com o inóculo de *R. mucilaginosa* (TTF = $1,1 \pm 0,2$ min), quanto com o seu sobrenadante (TTF = $1,2 \pm 0,1$ min).

2.5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. G. DE; CÁSSIA, R. DE; DA, F. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Biosurfactants : Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. **American Public Health Association**, Washington, DC, 2012.
- ARHAN, Y., OZTURK, I., CIFCI, T. Settling and dewatering characteristics of sludge from baker's yeast production wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 459–467, 1996.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 168–178, 2015.
- BOGAERT, I. N. A.; SAERENS, K. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 23–34, 2007.
- CHANG, J.; ABU-ORF, M.; DENTEL, S. K. Alkylamine odors from degradation of flocculant polymers in sludges. **Water Resource**, v. 39, p. 3369–3375. 2005.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Norma Técnica nº L5.217. *Thiobacillus*: determinação do número mais provável pela técnica dos tubos múltiplos: método de ensaio. São Paulo, CETESB, 13p. 1991.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.
- GIRI, S. S.; RYU, E. C.; SUKUMARAN, V.; PARK, S. C. Antioxidant, antibacterial, and antiadhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. **Microbial Pthogenesis**, v. 132, p. 66–72, 2019.
- JOHNSON, P.; TRYBALA, A.; STAROV, V.; PINFIELD, V. J. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102340, 2021.
- JUDD, S. The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors, in water and wastewater treatment. **Elsevier**, 2006.
- KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T. ; SUZUKI, GT; SASAKI, A. ; TAKEYAMA, Y.; IDEMOTO, Y. ; KOURA, N. ; YANAGISHITA H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antarctica*). **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1709-1714, 2001.

- KURADE, M. B.; MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; YU, S-M.; WONG, J. W. C. Sludge conditioning using biogenic flocculant produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* for enhancement in dewaterability. **Bioresource Technology**, v. 217, p.179–185, 2016.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MARCELINO, P. R. F.; PERES, G. F. D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F. C.; ROSA, C. A.; LACERDA, T. M.; DOS SANTOS, J. C.; DA SILVA, S. S. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosichydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops e Products**, v. 129, p. 212-223, 2019.
- MORGAN, J.W., FORSTER, C.F., EVISON, L. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. **Water Resource**, v. 24, p. 743-750, 1990.
- MOURA, J. B.; DELFORNO, T. P.; DO PRADO, P. F.; DUARTE, I. C. S. Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panel sinatropical region. **Environmental Microbiology & Microbial Ecology**, v. 368, p. 16, 2021.
- NEYENS, E.; BAEYENS, J.; DEWIL, R.; HEYDER, B. D. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. **Journal of Hazardous Materials**, v. 106B, p. 83–9, 2004.
- SANTOS, C. V. M.; VIEIRA, I. M. M.; SANTOS, B. L. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P. Biosurfactante - conceitos gerais e perspectivas. **Ambiente & Sociedade: concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da natureza**, 1ª Ed., cap. 22, p. 320-342, 2021.
- WANG, L. F.; HE, D. Q.; TONG, Z. H.; LI, W. W.; YU, H. Q. Characterization of dewatering process of activated sludge assisted by cationic surfactants. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 174–178, 2014a.
- WANG, L. F.; WANG, L. L.; LI, W. W.; HE, D. Q.; JIANG, H.; YE, X. D. Surfactant mediated settleability and dewaterability of activated sludge. **Chemical Engineering Science**, v. 116, p. 228–234, 2014b.
- WISNIEWSKI, C., GRASMICK, A. Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. **Colloids and Surfaces A**, v. 138, p. 403–411, 1998.
- WONG, J. W. C.; MURUGESAN, K.; YU, S. M.; KURADE, M. B.; SELVAN, A. Improved dewatering of CEPT sludge by biogenic flocculant from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Water Science and Technology**, v. 73, p. 843-848, 2016.

YUAN, H.; ZHU, N.; SONG, F. Dewaterability characteristics of sludge conditioned with surfactants pretreatment by electrolysis. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2308–2315, 2011.

CAPÍTULO 3: DESAGUAMENTO DE LODO DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO USANDO COINOCULAÇÃO (*Acidithiobacillus thiooxidans* e *Rhodotorula mucilaginosa*) COMO CONDICIONADOR DE LODO

Resumo

A biolixiviação, embora eficaz no tratamento de metais e com potencial simultâneo de desaguamento de lodo de esgoto, é limitada pela presença de matéria orgânica dissolvida, pois inibe as bactérias quimiolitotróficas, como as *Acidithiobacillus*. Neste aspecto, a coinoculação com microrganismos capazes de metabolizar compostos orgânicos, pode melhorar a eficiência do processo. O presente estudo avaliou o desaguamento de lodo de duas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) via coinoculação de *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Os resultados de coinoculação foram comparados com a bactéria individualmente em três concentrações de inóculo (5%, 10% e 15%), bem como com seu sobrenadante livre de células do cultivo. O desaguamento foi analisado por ensaios de Tempo de Filtração (TTF), Resistência Específica a Filtração (SRF) e Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS). Em ensaio de 96 horas houve melhoria do desaguamento com o aumento da concentração de inóculo (TTF = $8,3 \pm 0,2$ min para concentração de 15%), resultado que se relaciona à redução de proteínas ligadas em EPS (71,3 %, em relação ao controle). O tratamento com o sobrenadante resultou em TTF de $1,5 \pm 0,1$ min, inferior ao tratamento com o inóculo na melhor concentração ($8,3 \pm 0,2$ min). Em ensaio de 3 horas com o sobrenadante foi possível identificar a possibilidade de desaguamento em menor tempo. O melhor resultado de desaguamento foi obtido com a coinoculação da *A. thiooxidans* (15%) e *R. mucilaginosa* (5%), atingindo TTF de 14 segundos em 96 horas, 98,7% inferior ao controle e concentração de $11,6 \pm 1,9$ mg de proteínas $\cdot L^{-1}$, 79% inferior ao controle. Análise de Correlação de Kendall reforçou a correlação positiva entre o TTF e as proteínas ligadas em EPS. Os sobrenadantes combinados da *A. thiooxidans* (15%) e *R. mucilaginosa* (15%), reduziram o TTF em 90,0% em relação ao controle, e embora apresente desempenho semelhante a coinoculação, sua aplicação prática pode ser vantajosa ao permitir o reaproveitamento da biomassa e potencial de desaguamento em menor tempo de tratamento.

Palavras-chave: *Rhodotorula*, *Acidithiobacillus*, substâncias poliméricas extracelulares, proteínas.

Abstract

Bioleaching, although effective in the treatment of metals and with simultaneous potential for dewatering sewage sludge, is limited by the presence of dissolved organic matter, as it inhibits chemolithoautotrophic bacteria, such as *Acidithiobacillus*. In this regard, co-inoculation with microorganisms capable of metabolizing organic compounds can improve the efficiency of the process. The present study evaluated the dewatering of sludge from two Sewage Treatment Plants (STP) via co-inoculation of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Rhodotorula mucilaginosa*. The co-inoculation results were compared with the bacteria individually at three inoculum concentrations (5%, 10% and 15%), as well as with their cell-free supernatant from the culture. Dewatering was analyzed by Filtration Time (TTF), Specific Filtration Resistance (SRF) and Extracellular Polymeric Substances (EPS) tests. In a 96-hour test, dewatering improved with increasing inoculum concentration (TTF = 8.3 ± 0.2 min for 15% concentration), a result that is related to the reduction of proteins bound in EPS (71.3%, in relation to the control). Treatment with the supernatant resulted in a TTF of 1.5 ± 0.1 min, lower than the treatment with the inoculum at the best concentration (8.3 ± 0.2 min). In a 3-hour test with the supernatant, it was possible to identify the possibility of dewatering in a shorter time. The best dewatering result was obtained with the co-inoculation of *A. thiooxidans* (15%) and *R. mucilaginosa* (5%), reaching a TTF of 14 seconds in 96 hours, 98.7% lower than the control, and a concentration of 11.6 ± 1.9 mg of proteins L-1, 79% lower than the control. Kendall's correlation analysis reinforced the positive correlation between TTF and EPS-bound proteins. The combined supernatants of *A. thiooxidans* (15%) and *R. mucilaginosa* (15%) reduced TTF by 90.0% compared to the control, and although it presents similar performance to co-inoculation, its practical application can be advantageous by allowing the reuse of biomass and dewatering potential in a shorter treatment time.

Keywords: *Rhodotorula*, *Acidithiobacillus*, Extracellular Polymeric Substances, proteins.

3.1 INTRODUÇÃO

A biolixiviação é uma alternativa tecnológica eficiente e ambientalmente segura para tratamento de metais e estudos recentes demonstram potencial simultâneo de desaguamento de lodo residual de ETE, mas a elevada concentração de matéria orgânica dissolvida presente no lodo possui toxicidade as bactérias quimiolitotróficas, comumente utilizadas no processo, como a *A. thiooxidans* e a *A. ferrooxidans* (PATHAK et al. 2009).

Em estudo com lodo de curtume, FANG & ZHOU (2006) identificaram que 150 mg · L⁻¹ de Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) causou inibição da oxidação do enxofre por *A. thiooxidans* em 70%. Em experimentos de biolixiviação com *A. ferrooxidans*, CHO et al. (2008) também observaram que a biolixiviação de Cu cessou completamente em uma alta concentração de sólidos, superior a 226 mg · L⁻¹ de Carbono Orgânico Total (TOC). Além disso, estudos indicam que espécies de *Acidithiobacillus* são sensíveis a vários tipos de compostos orgânicos, desde açúcares simples, aminoácidos e até ácidos orgânicos. GU & WONG (2004) observaram atraso nos períodos de biolixiviação de Cu e Cr em lodo de esgoto digerido anaerobicamente, de 6 e 7 dias, respectivamente, e pontuaram entre as causas a presença de ácidos acético e propiônico no lodo.

Entre as possíveis causas de toxicidade dos microrganismos quimiolitotróficos acidófilos aos ácidos orgânicos, como , o primeiro ponto a se considerar é que o pH interno dessas bactérias é aproximadamente 6,5, enquanto o pH do meio externo pode ser inferior a 2,5. O segundo ponto é que em ambiente com baixo pH, a maior parte do ácido orgânico está presente na forma indissociada, podendo difundir-se através da membrana citoplasmática. Desta forma, o ácido orgânico ao entrar no pH neutro no citoplasma se dissociará, causando acidificação do citosol, desestabilizando o gradiente de pH transmembranar, que é necessário ao crescimento e sobrevivência desses microrganismos em meios ácidos (VARDANYANA & VYRIDESB, 2019).

Como forma de mitigar esse efeito tóxico da matéria orgânica dissolvida em *Acidithiobacillus*, que afeta adversamente o processo de biolixiviação, alguns microrganismos heterotróficos ácido tolerantes, como *Rhodotorula sp.* (GU & WONG, 2007; WANG et al. 2010), *Brettanomyces sp.* (FANG & ZHOU, 2007), *Pichia spartinae* (ZHENG et al., 2009), entre outros, foram introduzidos no processo por serem capazes de metabolizar compostos orgânicos. Essa relação de mutualismo com as espécies de *Acidithiobacillus*, melhora a atividade das bactérias aumentando a eficiência da biolixiviação e possivelmente também o desaguamento de lodo.

Em experimento realizado em um reator *air-lift* com coinoculação da levedura *Brettanomyces* e bactéria *A. thiooxidans*, FANG & ZHOU (2007) constaram redução mais rápida do pH do lodo e aumento do Potencial de Oxidação/Redução (ORP), contribuindo para uma biolixiviação mais eficiente de Cr. Neste estudo, o tempo de biolixiviação para solubilização máxima do Cr pôde ser reduzido de 5 para 3 dias com a coinoculação, comparado com a biolixiviação sem a levedura *Brettanomyces*.

Em coinoculação de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* e *L. ferriphilum* com *Rhodotorula* e *Aspergillus niger*, o efeito tóxico da matéria orgânica dissolvida aos microrganismos acidófilos foi reduzida, atingindo eficiências de biolixiviação de Cd, Cu, Mn e Zn em 84,2, 90,9, 94,0 e 94,74%, respectivamente (GAN et al. 2016). Semelhantemente, WANG et al. (2010) também identificaram aprimoramento da biolixiviação em lodo de curtume com o coinoculação da levedura *R. mucilaginosa* e espécies de *Acidithiobacillus*. Identificaram que com a coinoculação houve um efeito sinérgico entre os microrganismos, que além de reduzir os compostos orgânicos dissolvidos tóxicos a *Acidithiobacillus*, resultou em aumento da concentração de CO₂ dissolvido (em até 3 vezes) na solução de biolixiviação, benéfica para o crescimento das bactérias biolixivantes.

As *Acidithiobacillus*, em especial *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, assimilam CO₂ através do ciclo de Calvin-Benson para suprir carbono para seu crescimento, bem como para oxidar ferro ou enxofre para atender aos requisitos de energia. A concentração de CO₂ disponível é um componente crítico para o crescimento e atividade das *Acidithiobacillus*. Foi identificada também uma redução no período de biolixiviação do Cr com a coinoculação de *Acidithiobacillus* com *R. mucilaginosa*, de 96 horas, redução do pH de 5,5 a 1,73 e solubilização de 94,5% do Cr do lodo na biolixiviação com apenas *Acidithiobacillus*, para 64 horas na biolixiviação em coinoculação com *R. mucilaginosa*, reduzindo o pH de 5,48 para 1,73 e solubilizando 95,5% do Cr presente originalmente no lodo (WANG et al. 2010).

Coinoculação de *Acidithiobacillus* e levedura produtora de biossurfactante *Meyerozyma guilliermondii* em biolixiviação de lodo de esgoto resultaram em solubilização de 9,8%, 9,8%, 22,0%, 59,8%, 7,1% e 76,5% de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn, respectivamente, após 10 dias de biolixiviação, demonstrando que o mutualismo com a levedura reduziu o tempo de biolixiviação do Cd de 240 para 96 horas (CAMARGO et al. 2018).

Pichia spartinae coinoculada com *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* para biolixiviação de lodo de curtume, demonstrou que o mutualismo entre os microrganismos resultou em aumento da biolixiviação em 33 e 12 vezes, respectivamente. Para aumentar a eficiência da

biolixiviação e aumentar a atividade das espécies de *Acidithiobacillus*, recomenda-se a adição periódica de *P. spartinae* em intervalos de lote (ZHENG et al. 2009).

Embora diversos estudos relatem melhorias na biolixiviação de metais com a coinoculação espécies de *Acidithiobacillus* e microrganismos heterotróficos ácido tolerantes, os aspectos relacionados ao desaguamento do lodo simultaneamente a biolixiviação ainda são pouco explorados e compreendidos. Especialmente em relação aos efeitos da coinoculação em Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*), sua composição e frações solúveis e ligadas, que são frequentemente associadas ao desempenho de desaguamento. Portanto, o estudo do presente capítulo avaliou o desaguamento de lodo de ETE via coinoculação de bactéria acidófila (*A. thiooxidans*) e levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*), analisando o processo de desaguamento sob a perspectiva de alterações nas frações e composição de EPS. Os resultados de coinoculação foram comparados com os desempenhos de desaguamento da bactéria acidófila (*A. thiooxidans*) individualmente em três diferentes concentrações de inóculo, bem como o desaguamento do lodo tratado com o sobrenadante da *A. thiooxidans*, livre de células de cultivo, a fim de avaliar a vantagem do uso da coinoculação frente as demais abordagens de biolixiviação e desaguamento.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1. Coleta, preservação e caracterização do lodo de Estação de Tratamento de Esgoto

A amostra de lodo aeróbio foi coletada no decantador secundário de sistema de lodos ativados em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE1) localizada no Estado de São Paulo. A metodologia de coleta e armazenamento foi realizada de acordo com as recomendações de coleta e preservação de amostras do método 1060 (APHA, 2012), em garrafas de polietileno com capacidade de 1 litro. As propriedades físico-químicas iniciais foram caracterizadas conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Parâmetros físico-químicos e métodos utilizados para caracterização inicial do lodo

Parâmetro	Análise	Método
Físico-químicos	pH	9040C (APHA, 2012)
	Sólidos Totais (ST)	2540B (APHA, 2012)
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	2540E (APHA, 2012)

Fonte: Autor (2024).

Uma segunda coleta de lodo foi realizada em outra estação de tratamento para avaliar o tratamento com melhor resultado obtido na etapa anterior. A segunda Estação de Tratamento de Esgoto (ETE2) também se localiza no interior do Estado de São Paulo, mas diferentemente da ETE1, possui fase única de tratamento biológico, aeróbia por lodos ativados, seguida por membranas de ultrafiltração para produção de água de reuso. Os lodos residuais gerados são tratados com produtos químicos. O sistema de lodos ativados avaliado nesta pesquisa é o lodo residual do tratamento biológico aeróbio. A amostra foi coletada em galão de polietileno com capacidade de 20 litros, posteriormente fracionado em garrafas de polietileno de 1 litro. A metodologia de coleta e armazenamento foi realizada de acordo com as recomendações de coleta e preservação de amostras do método 1060 (APHA, 2012) e as propriedades físico-químicas iniciais também foram caracterizadas de acordo com os métodos apresentados na Tabela 3.1.

3.2.2. Análises de desaguamento

O desaguamento do lodo foi avaliado pelo Ensaio de Tempo de Filtração (TTF), adaptado do método descrito em APHA (2012), e pela Resistência Específica a Filtração (SRF). O experimento consistiu em inserir amostra de lodo (50 mL) em funil de Buchner com filtro de 1,2 μm , sob pressão constante de 51 kPa. O TTF foi obtido ao mensurar o tempo necessário para obtenção de 50% do volume original da amostra (25 mL). A SRF foi calculada conforme a Equação 3.1 (ARHAN et al. 1996) e os parâmetros mensurados pelo Teste de Funil de Buchner (WISNIEWSKI & GRASMICK, 1998).

$$SRF = \frac{2bPA^2}{\mu c}$$

Equação 3.1.

Onde P é a pressão aplicada ($\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$); A é a área de filtração (m^2); μ é a viscosidade dinâmica ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$); c é a massa de sólidos/unidade de volume filtrado ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) = $1/C_i/(100 - C_i) - C_f/(100 - C_f)$; C_i é a umidade inicial (%); C_f é a umidade final (%); b é o coeficiente angular da curva t/v vs. v ; v é o volume filtrado (m^3); e t é o tempo de filtração (s).

As EPSs no lodo foram extraídas conforme descrito por JUDD (2006) e quantificadas quanto a concentração de proteínas (LOWRY-FOLIN, 1951) e carboidratos (DUBOIS et al, 1956). Na extração do EPS, após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi filtrado e obtido o EPS solúvel (EPS_S), que fora então caracterizado quanto as proteínas (EPS_{SP}) e carboidratos (EPS_{SC}). O precipitado foi ressuspensionado em solução salina, submetido a aquecimento (100°C) por 1 hora e novamente centrifugado. O sobrenadante foi filtrado e fora obtido o EPS ligado (EPS_L), também caracterizado quanto as proteínas (EPS_{LP}) e carboidratos (EPS_{LC}).

3.2.3. *Microrganismos e preparo dos inóculos*

A bactéria *A. thiooxidans* (ATCC 19377) foi cedida pelo Laboratório de Biohidrometalurgia do Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Araraquara e foi cultivada em meio 9K modificado ((NH_4)₂SO₄ 2,7g; KCl 0,09 g; K₂HPO₄ 0,45 g; MgSO₄·7H₂O 0,45 g; H₂O 1000 mL, pH 2.8), autoclavado a 121°C por 15 min e pH ajustado com H₂SO₄. Ao meio foi adicionado 10 g·L⁻¹ de enxofre elementar (esterilizado durante 60 minutos a 110°C) como fonte de energia (FANG et al., 2011).

O crescimento foi conduzido em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, acondicionado em incubadora com agitação de 150 rpm e temperatura controlada a 30°C, temperatura que apresentou melhor resultado em ensaios de biolixiviação (VILLAR, 2003; PATHAK et al. 2009). O meio foi mantido sob essas condições até que seu pH atingisse 0,8 aproximadamente. Os números de células de *A. thiooxidans* foram cerca de 10⁸ células·mL⁻¹ no final de sua fase exponencial de crescimento (cerca de 48 horas ou 15 dias após a inoculação) (ZHOU et al., 2013).

Para os ensaios de desaguamento, alíquotas dos inóculos foram centrifugadas durante 10 minutos a 7830 rpm e 25°C, o sobrenadante foi reservado e as células foram ressuspensionadas em água destilada estéril com pH 4,0 ajustado com H₂SO₄. As células ressuspensionadas foram padronizadas no comprimento de onda de 560 nm, para absorvância entre 0,400 e 0,500. A

diluição da amostra para padronização foi realizada também com água destilada em pH ajustado para 4,0 com H₂SO₄.

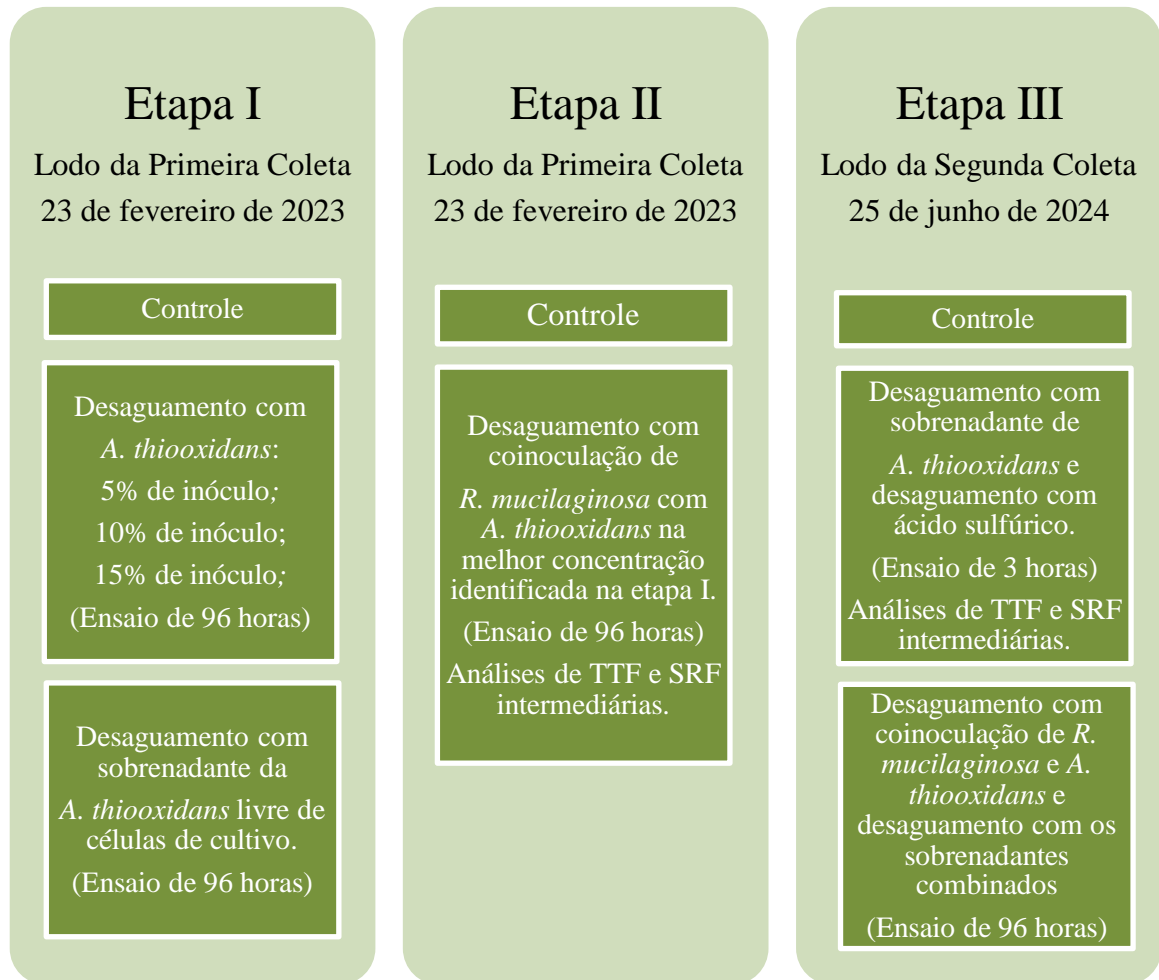
A levedura *R. mucilaginosa*, extremófila, identificada molecularmente por MOURA et al. (2021). Os cultivos subsequentes foram realizados em ágar Sabouraud. As leveduras foram coletadas com a alça de inoculação de 10 µL e transferidas para meio de enriquecimento conforme proposto por KITAMOTO et al. (2001) e permaneceram em incubadora com agitação de 120 rpm e temperatura controlada a 30°C por 48 horas. Para os ensaios de desaguamento, alíquotas dos inóculos foram centrifugadas durante 10 minutos a 7830 rpm e 25°C, o sobrenadante foi reservado e as células foram ressuspensas em solução salina estéril. O inóculo foi padronizado no comprimento de onda de 600nm, para absorvância próxima de 1, o equivalente a 10⁷ UFC·mL⁻¹ (MARCELINO et al., 2019). A diluição da amostra para padronização foi realizada também com solução salina estéril.

3.2.4. Experimentos de desaguamento do lodo

Para o desenvolvimento dos experimentos de desaguamento, os ensaios foram divididos em três etapas (Figura 3.1): Etapa I, compreende ensaios com três concentrações de inóculo da bactéria *A. thiooxidans* individualmente, (5, 10 e 15%), bem como ensaio com seu sobrenadante livre de células de cultivo prévio. Nos ensaios da Etapa I foram realizados monitoramento diário do pH e análises de desaguamento somente no final do tratamento (após 96 horas); Etapa 2 compreende ensaio de coinoculação da levedura *R. mucilaginosa* (5% de inóculo, concentração com melhores resultados de desaguamento conforme identificado no estudo do CAPÍTULO 2) com a bactéria *A. thiooxidans* na concentração de inóculo que obteve melhor resultado de desaguamento na etapa I. Nos ensaios da Etapa II, foram retiradas alíquotas intermediárias para análises de desaguamento, portanto, foi utilizado um volume maior (750 mL) de lodo e fracionamento da amostra em Erlenmeyer de mesmo volume da etapa anterior (500 mL), de modo a garantir as mesmas condições experimentais e evitar que a retirada de alíquotas comprometa o desempenho dos microrganismos; Etapa III compreende a reprodução do ensaio com o sobrenadante da bactéria, porém utilizando o lodo residual da ETE2 em menor tempo de tratamento (3 horas). Paralelamente fora conduzido ensaio comparativo utilizando apenas lodo com ácido sulfúrico. Nesses ensaios foram realizados monitoramento do pH e análises de desaguamento intermediárias (a cada 1 hora de tratamento). Ainda na Etapa III, o melhor resultado obtido na etapa I, coinoculação de *R. mucilaginosa* e *A. thiooxidans* foi reproduzido com o lodo da ETE2 e paralelamente também foi realizado ensaio de desaguamento com os

sobrenadantes da bactéria e levedura combinados (ambos ensaios de 96 horas). Os experimentos de desaguamento foram conduzidos em incubadora com agitação de 150 rpm e temperatura controlada a 30°C. As condições experimentais foram detalhadas na Tabela 3.2.

Figura 3.1. Experimentos de desaguamento, condições analisadas e parâmetros monitorados em cada etapa



Fonte: Autor (2024).

Tabela 3.2. Condições experimentais de desaguamento do lodo ETE

Ensaio	Lodo (mL)	Inóculo ou sobrenadante de <i>A. thiooxidans</i> (mL)	Inóculo ou sobrenadante de <i>R. mucilaginosa</i> (mL)	S ₀ (g)	Água destilada (mL)
Controle	200	-	-	0,6	100
Etapa I					
Bactéria	200	15 ⁽¹⁾	-	0,6	85
Bactéria	200	30 ⁽²⁾	-	0,6	70
Bactéria	200	45 ⁽³⁾	-	0,6	55
Sobrenadante	200	45	-	-	55
Etapa II					
Coinoculação	200	45	15	0,6	40
Etapa III					
Sobrenadante H ₂ SO ₄ (até pH = sobrenadante)	200	45	-	-	55
Coinoculação Sobrenadantes combinados	200	-	-	-	100
Coinoculação	200	45	15	0,6	40
Sobrenadantes combinados	200	45	45	-	10

⁽¹⁾ Equivalente a $1,5 \cdot 10^9$ células de *A. thiooxidans* (10^8 células·mL⁻¹)

⁽²⁾ Equivalente a $3,0 \cdot 10^9$ células de *A. thiooxidans* (10^8 células·mL⁻¹)

⁽³⁾ Equivalente a $4,5 \cdot 10^9$ células de *A. thiooxidans* (10^8 células·mL⁻¹)

Fonte: Autor (2024).

Os experimentos foram realizados em triplicatas, das quais foram calculadas as médias e desvio padrão em cada caso. A significância entre os resultados de TTF para as condições de desaguamento foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA, não paramétrico) no XLSTAT®, utilizado para testar se houve redução significativa do TTF dos diferentes tratamentos avaliados no nível de significância de 5%. No caso da existência de redução significativa, a probabilidade de significância (*p*-valor) é inferior a 0,05. Para identificar quais pares de condições possuem TTF significativamente diferentes foi realizado adicionalmente o teste *post-hoc* de Comparações Múltiplas de Dunn (Teste de Dunn, 1964) também no nível de significância de 5%. Para levar em conta o fato de que existem múltiplas comparações em *k* grupos, foi utilizada a correção de Bonferroni. Os testes de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn podem ser aplicados caso rejeitada a hipótese de distribuição normal dos dados. A normalidade dos dados foi avaliada e rejeitada pelos testes Shapiro-Wilk, Anderson-Darling e Lillifors.

Os melhores resultados de TTF e frações de EPS foram submetidos a análises de Correlação de Kendall a fim de identificar a associação entre pares de variáveis. A Correlação

de Kendall é um teste não-paramétrico, e, portanto, pode ser usado quando não há distribuição normal dos dados, hipótese verificada anteriormente, e pode ser usado para testar relações não-lineares entre as variáveis. Coeficiente de Correlação de Kendall (representado pela letra grega τ – tau), varia de -1 a +1, sendo que valores próximos a esses extremos indicam uma correlação forte e valores próximos de 0 implicam em correlações mais fracas ou inexistentes. O valor de τ positivo ou negativo indica a direção da relação entre as variáveis, caso positivo significa que o aumento de uma variável implica no aumento da outra e caso negativo indicam que o aumento de uma variável implica na diminuição de outra.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. Caracterização inicial do lodo

Após as coletas, conforme detalhado no item 3.2.1., o lodo bruto foi submetido a uma caracterização inicial (Tabela 3.3), que compreende parâmetros físico-químicos, como pH e sólidos e uma caracterização inicial dos parâmetros de desaguamento, como TTF, SRF e EPS.

Tabela 3.3. Caracterização inicial dos lodos: parâmetros físico-químicos e de desaguamento

Parâmetro	Análise	Resultado
ETE 1– Coleta realizada em 23 de fevereiro de 2023		
Físico-químicos	pH	7,1 ± 0,2
	Sólidos Totais (ST)	6.078,3 ± 108,7 mg · L ⁻¹
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	4.523,3 ± 368,9 mg · L ⁻¹
	TTF	22,8 ± 3,3 min
	SRF	5,1 · 10 ¹⁴ m · kg ⁻¹
Desaguamento	EPS solúvel	25,2 ± 1,4 mg de carboidratos · L ⁻¹
		40,1 ± 2,3 mg de proteínas · L ⁻¹
	EPS ligado	55,9 ± 3,1 mg de carboidratos · L ⁻¹
		52,8 ± 2,0 mg de proteínas · L ⁻¹
ETE2 – Coleta realizada em 25 de junho de 2024		
Físico-químicos	pH	6,8 ± 0,1
	Sólidos Totais (ST)	3.727,5 ± 104,6 mg · L ⁻¹
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	2.767,2 ± 91,2 mg · L ⁻¹
	TTF	10,5 ± 0,1 min
	SRF	8,3 · 10 ¹³ m · kg ⁻¹
Desaguamento	EPS solúvel	10,1 ± 1,1 mg de carboidratos · L ⁻¹
		98,2 ± 1,4 mg de proteínas · L ⁻¹
	EPS ligado	47,8 ± 0,3 mg de carboidratos · L ⁻¹
		67,5 ± 4,8 mg de proteínas · L ⁻¹

Fonte: Autor (2024).

3.3.2. Experimentos de desaguamento do lodo – Primeira Coleta

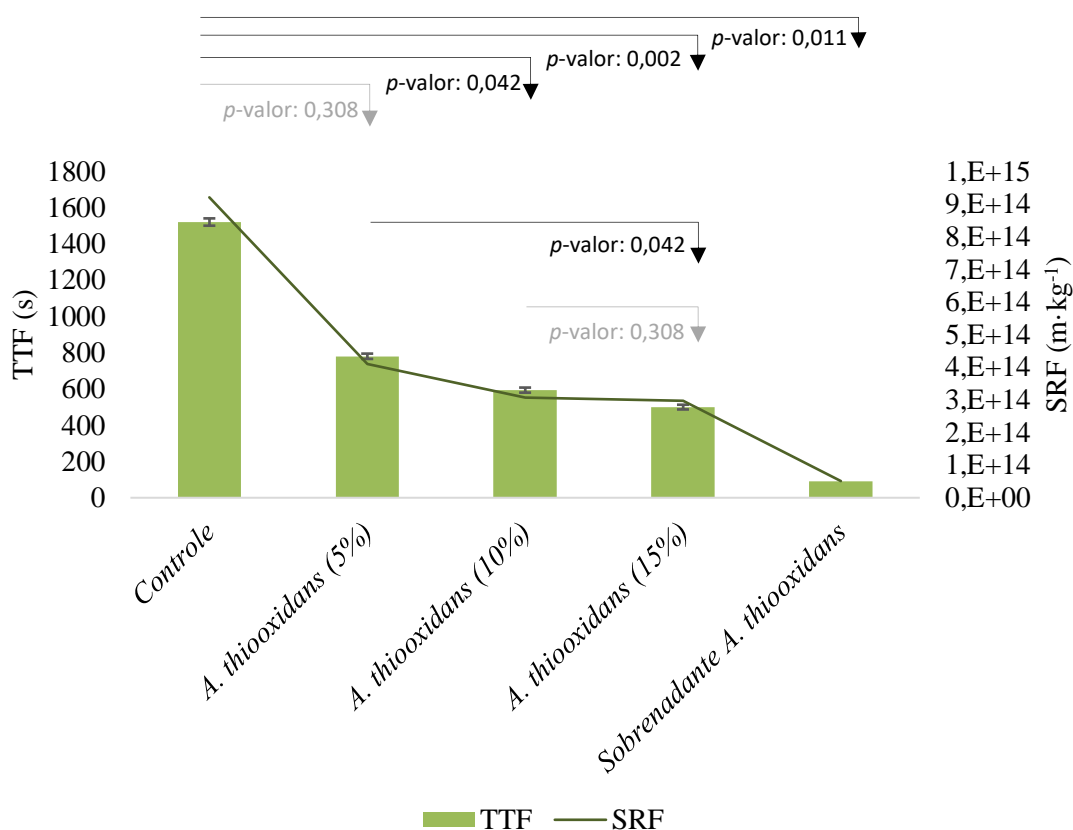
O desaguamento do lodo nos ensaios avaliados foi mensurado pelo TTF e SRF, bem como caracterizado quanto o conteúdo de proteínas e carboidratos nas frações solúvel e ligada de EPS. Ao longo das 96 horas de tratamento foi realizado o monitoramento diário do pH das amostras. O tratamento do lodo com as três concentrações de inóculo da bactéria *A. thiooxidans* resultou em redução do TTF e SRF (Figura 3.2 e Tabela 3.4). Menores valores de TTF (8,3 ± 0,2 min) e SRF (3,0 · 10¹⁴ m · kg⁻¹) foram obtidos com a concentração de 15% de inóculo de *A. thiooxidans*, aproximadamente três vezes inferior do que o lodo controle (25,4 ± 0,3 min; 9,2 · 10¹⁴ m · kg⁻¹). Com o aumento das concentrações de inóculo de *A. thiooxidans* houve redução do TTF em 48,7%, 60,9% e 67,1%, para as concentrações de 5%, 10% e 15% de inóculo respectivamente. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstraram que, comparado ao controle, a redução no TTF foi significativa para as

concentrações de 10% e 15% de inóculo de *A. thiooxidans*, no nível de significância de 5%, e a redução mais significativa foi com a concentração de 15% entre as três concentrações de inóculo avaliadas.

Os resultados de TTF e SRF do tratamento do lodo com o sobrenadante do inóculo da bactéria *A. thiooxidans* demonstraram reduções de 94,1% ($1,5 \pm 0,1$ min) no TTF e 94,1% ($5,1 \cdot 10^{13}$ m · kg⁻¹) no SRF, respectivamente, comparado com o TTF ($25,4 \pm 0,3$ min) e SRF ($9,2 \cdot 10^{14}$ m · kg⁻¹) do lodo controle (Figura 3.2 e Tabela 3.4). Comparado com a melhor concentração de inóculo, o sobrenadante apresentou TTF 82,1% inferior ao inóculo. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstram que a redução foi significativa no nível de significância de 5%.

O monitoramento do pH evidenciou redução ao longo das 96 horas nos ensaios com os inóculos (Figura 3.3), demonstrando maior atividade das bactérias acidófilas no final do período de tratamento. Embora tenha ocorrido redução do pH para todas as concentrações de inóculo de *A. thiooxidans*, a partir de 72h foi observada uma diferenciação entre os tratamentos avaliados, de modo que o menor pH observado (pH = 4,4) foi relacionado com a maior concentração de inóculo (15%) e menores TTF e SRF obtidos. O monitoramento do pH do ensaio com o sobrenadante da *A. thiooxidans* evidenciou diferença significativa no pH de partida entre os tratamentos, ou seja, o pH do sobrenadante iniciou em 1,5 comparado com o pH inicial de 6,6 do tratamento com 15% de inóculo de *A. thiooxidans*, mas não houve grandes variações ao longo das 96 horas de tratamento.

Figura 3.2. TTF e SRF médios do lodo durante o desaguamento com a bactéria acidófila (*A. thiooxidans*) e seu sobrenadante



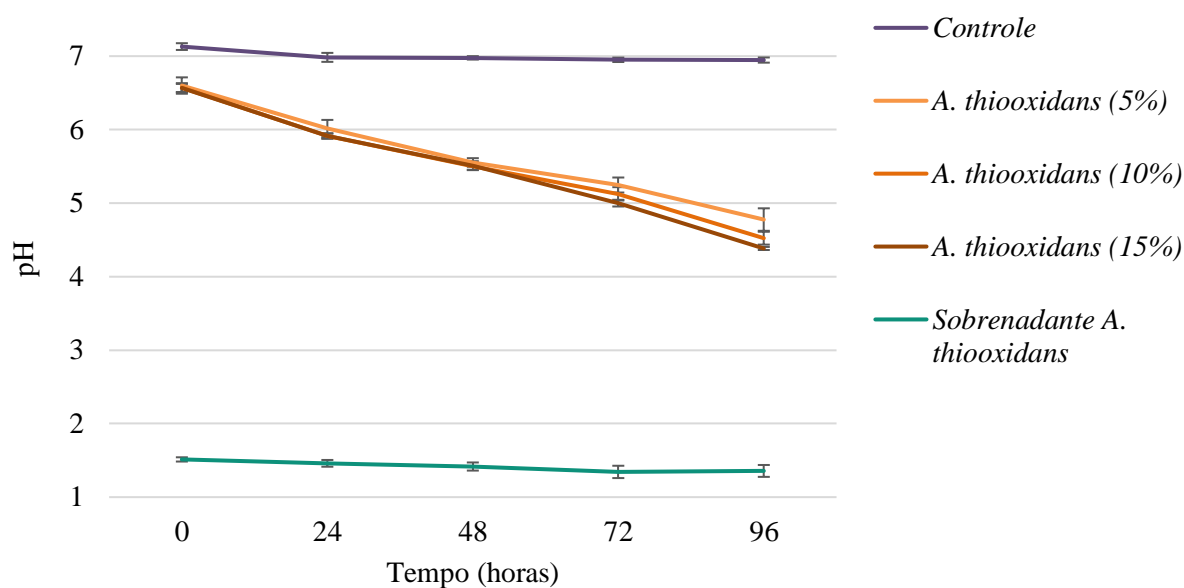
Fonte: Autor (2024).

Tabela 3.4. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com a bactéria (*A. thiooxidans*) e seu sobrenadante

Ensaio	TTF (min)	Varição %	SRF (m·kg ⁻¹)	Varição %
Controle	25,3 ± 0,3	-	9,2 · 10 ¹⁴ m·kg ⁻¹	-
<i>A. thiooxidans</i> (5%)	13,0 ± 0,2	↓ 48,7	4,1 · 10 ¹⁴ m·kg ⁻¹	↓ 56,6
<i>A. thiooxidans</i> (10%)	9,9 ± 0,2	↓ 61,0	3,1 · 10 ¹⁴ m·kg ⁻¹	↓ 66,7
<i>A. thiooxidans</i> (15%)	8,3 ± 0,2	↓ 67,1	3,0 · 10 ¹⁴ m·kg ⁻¹	↓ 67,8
Sobrenadante <i>A. thiooxidans</i>	1,5 ± 0,1	↓ 94,1	5,1 · 10 ¹³ m·kg ⁻¹	↓ 94,4

Fonte: Autor (2024).

Figura 3.3. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com a bactéria acidófila (*A. thiooxidans*) e seu sobrenadante



Fonte: Autor (2024).

Com a caracterização de EPS, observou-se que os tratamentos de desaguamento com *A. thiooxidans* não apresentaram grandes variações nas concentrações de carboidratos totais comparado com o lodo controle (Figura 3.4), mas avaliando as concentrações de carboidratos nas frações de EPS, observou-se que com o aumento das concentrações de inóculo de *A. thiooxidans*, houve liberação dos carboidratos da fração ligada, resultando em um maior percentual de carboidratos na fração solúvel, 54,3% ($40,6 \pm 0,5$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), 59,9% ($46,2 \pm 3,9$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹) e 58,1% ($53,8 \pm 4,9$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), para as concentrações de 5%, 10% e 15% de inóculo, respectivamente. A concentração de carboidratos solúveis no lodo controle foi de 31,1% ($25,2 \pm 1,4$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹) e 68,9% de carboidratos na fração ligada ($55,9 \pm 3,1$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹).

Diferentemente do observado com a concentração de carboidratos totais, o tratamento do lodo com os inóculos de *A. thiooxidans* reduziram as concentrações de proteínas totais comparado com o lodo controle (Figura 3.5), mas não houve grandes variações na concentração de proteínas totais entre as três concentrações de inóculo de *A. thiooxidans* avaliadas. Com relação as concentrações de proteínas nas frações de EPS, observou-se que com o aumento da concentração de inóculo, houve redução no percentual de proteínas na fração ligada, resultado no melhor caso, maior concentração de inóculo de *A. thiooxidans*, uma concentração de $12,7 \pm 1,6$ mg de proteínas \cdot L⁻¹, que equivale a 37,6% da concentração de proteínas totais ($33,9 \pm 2,5$

mg de proteínas · L⁻¹). O tratamento de desaguamento com 15% de inóculo de *A. thiooxidans*, resultou, em uma concentração de proteína ligada três vezes e meia menor do que a concentração de proteína ligada do lodo controle ($44,3 \pm 2,9$ mg de proteínas · L⁻¹).

Relacionando os resultados de filtração (TTF e SRF) com os resultados de caracterização de EPS, houve melhoria do desaguamento do lodo com o aumento da concentração de inóculo de *A. thiooxidans*, e tal aprimoramento no desaguamento relaciona-se com a redução da concentração de proteínas em EPS, em especial a concentração de proteínas na fração ligada.

Estudos anteriores também testaram bactérias oxidantes de enxofre no processo de desaguamento para tratamento de lodo, e o lodo biolixiviado apresentou diferença significativa em relação ao lodo controle, como uma redução considerável do pH (para 3,92) e menor SRF, que reduziu para $5,31 \cdot 10^{10}$ m · kg⁻¹ após 72 horas de tratamento (LIU et al. 2016). Segundo LIU et al. (2016), EPS no lodo biolixiviado diminuíram consideravelmente, com proteínas e polissacarídeos reduzidos em 97,4% e 76,0%, respectivamente, e entre as causas para melhoria do desaguamento, os autores apontaram como fator decisivo a diminuição de EPS.

No estudo de ZHOU et al. (2014), com coinoculação de *A. thiooxidans* e *A. ferrooxidans*, o teor de EPS no lodo impactou significativamente no desaguamento, e reduções nos teores de proteínas e polissacarídeos na fração ligada de EPS contribuíram, segundo os autores, para o aprimoramento do desaguamento. Segundo DAI et al. (2018), a fração ligada de EPS pode conter até 70% de biopolímeros, incluindo proteínas e carboidratos, cuja liberação de proteínas, característica predominantemente hidrofílica, pode enfraquecer sua capacidade de se ligar à água e conseqüentemente melhorar a capacidade de desaguamento.

HUO et al. (2014) investigaram as taxas de contribuição dos fatores que controlam o desaguamento do lodo durante a biolixiviação, como pH do lodo, quantidade microbiana, EPS etc., e entre esses fatores, a quantidade microbiana, o teor de água ligada e o teor de EPS do lodo foram apontados como os fatores dominantes, e suas taxas de contribuição na melhoria do desaguamento foram de 32,5%, 24,2% e 22,4%, respectivamente. Portanto, o aumento do desaguamento do lodo durante a biolixiviação foi relacionado principalmente pela alteração da comunidade microbiana e pela diminuição do teor de água ligada e EPS do lodo. YANG et al. (2020), também observaram que a relação entre as frações solúvel e ligada de EPS afetou significativamente o desaguamento do lodo, e por análise de componentes principais e análise de correlação de *Pearson* forneceram evidências de que reduções na fração ligada de EPS correlaciona-se positivamente com o desaguamento do lodo.

O sobrenadante da bactéria *A. thiooxidans*, por sua vez, resultou em um aumento nas concentrações de carboidratos totais comparado com o lodo controle (Figura 3.4). Avaliando as concentrações de carboidratos nas frações de EPS, houve liberação dos carboidratos da fração ligada, resultando em um maior percentual de carboidratos na fração solúvel ($93,4 \pm 6,4$ mg de carboidratos $\cdot L^{-1}$), equivalente a 77,7% dos carboidratos totais ($120,2 \pm 7,9$ mg de carboidratos $\cdot L^{-1}$).

Semelhantemente ao observado com a concentração de carboidratos totais, o tratamento do lodo com o sobrenadante também aumentou as concentrações de proteínas totais comparado com o lodo controle (Figura 3.5). Este aumento da concentração de proteínas totais foi de aproximadamente dez vezes comparado ao lodo controle. Ao analisar as concentrações de proteínas nas frações de EPS, 54,8% da concentração de proteínas encontra-se na fração solúvel ($410,6 \pm 5,8$ mg de proteínas $\cdot L^{-1}$) e 45,2% na fração ligada ($339,0 \pm 6,8$ mg de proteínas $\cdot L^{-1}$). No caso do sobrenadante, observa-se que o conteúdo de proteínas na fração ligada não foi o fator determinante na promoção do desaguamento, embora, os resultados de TTF e SRF obtidos sejam menores do que os obtidos com os inóculos da bactéria. Logo, no tratamento com o sobrenadante do inóculo, outros fatores, como a carga superficial dos flocos e mecanismos de floculação podem ter influenciado mais fortemente para a promoção do desaguamento.

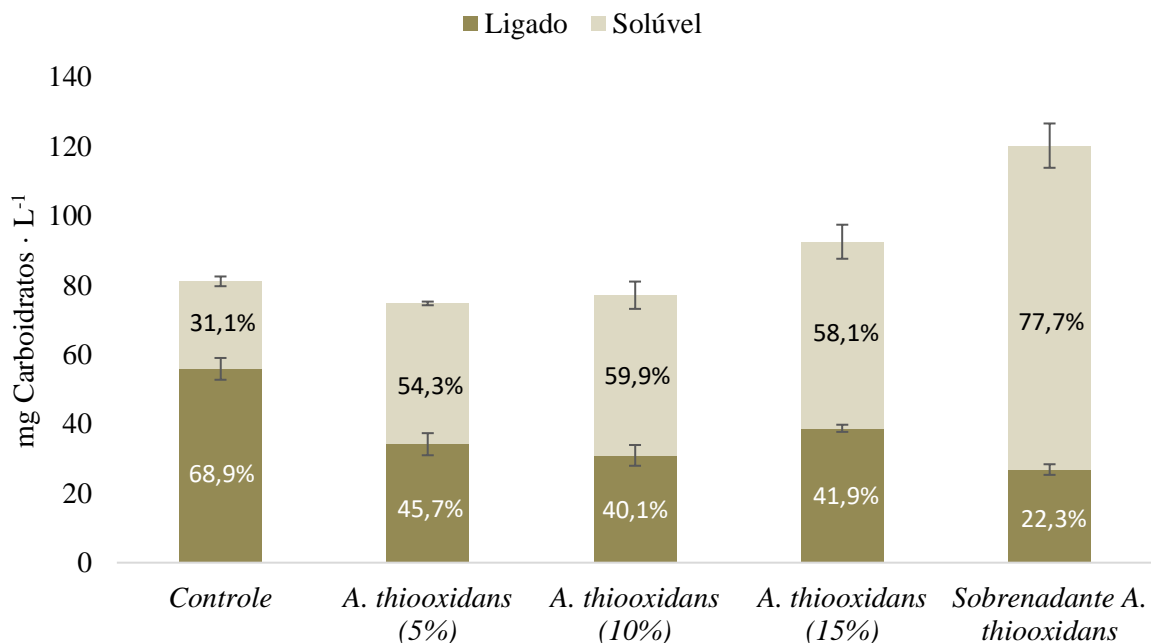
Este aumento da concentração de proteínas totais foi de aproximadamente dez vezes comparado ao lodo controle. Ao analisar as concentrações de proteínas nas frações de EPS, 54,8% da concentração de proteínas encontra-se na fração solúvel ($410,6 \pm 5,8$ mg de proteínas $\cdot L^{-1}$) e 45,2% na fração ligada ($339,0 \pm 6,8$ mg de proteínas $\cdot L^{-1}$). No caso do sobrenadante, observa-se que o conteúdo de proteínas na fração ligada não foi o fator determinante na promoção do desaguamento, embora, os resultados de TTF e SRF obtidos sejam menores do que os obtidos com os inóculos da bactéria. Logo, no tratamento com o sobrenadante do inóculo, outros fatores, como a carga superficial dos flocos e mecanismos de floculação podem ter influenciado mais fortemente para a promoção do desaguamento.

Estudo anterior avaliou flocculante biogênico produzido por *A. ferrooxidans* para condicionamento de lodo e melhoria do desaguamento, e constatou que o flocculante biogênico reduziu rapidamente o pH, diminuiu o CST e a SRF do lodo em 74% e 89%, respectivamente, em comparação com o lodo controle (KURADE et al. 2016). Entre as justificativas de melhoria do desaguamento, os autores destacaram que como as partículas de lodo são carregadas negativamente, a força de repulsão entre as partículas impede com que se agreguem e sedimentem, e ao analisarem a estrutura microscópica dos flocos de lodo, observaram que a morfologia dos flocos do controle era de flocos pequenos, totalmente dispersos na fase aquosa

sem apresentar qualquer agregação/floculação, mas após o tratamento com o floculante biogênico exibiram limites entre os flocos individuais bastante claros e com conexões entre as partículas individuais muito mais baixas do que os flocos de lodo de controle. Além disso, o tamanho dos flocos formados foi maior, consistente e compacto, mostrando formação clara de flocos (KURADE et al. 2016).

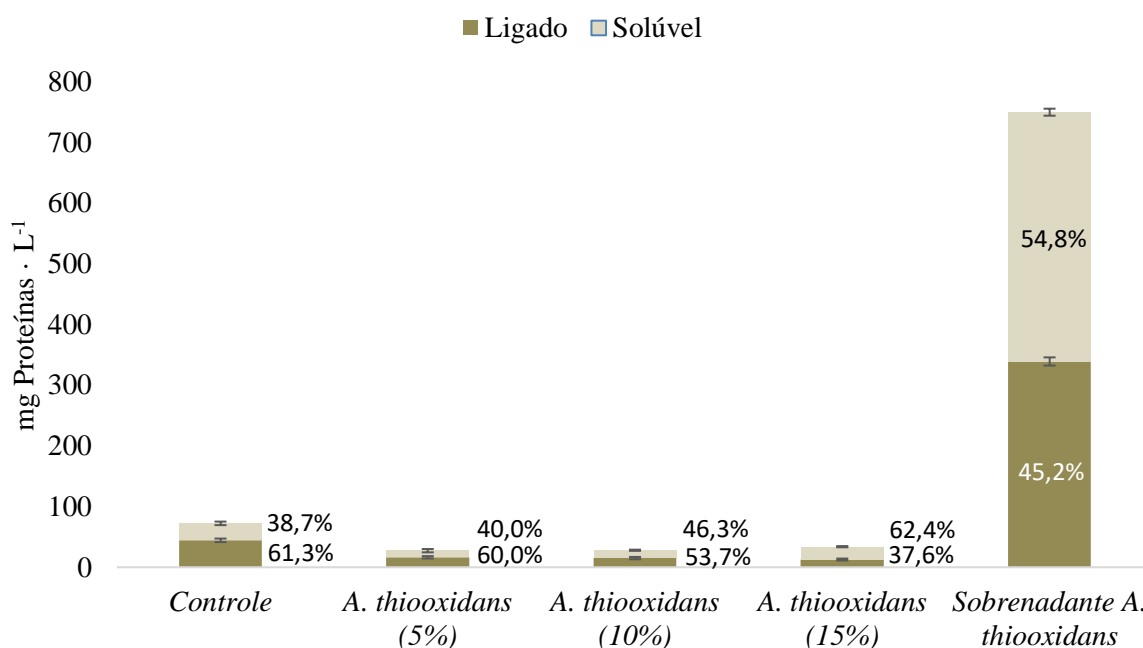
Outro estudo comparou o desaguamento do lodo inoculado com cultura de *A. ferrooxidans* (células sem meio) com o filtrado da cultura sem células e demonstrou melhoria efetiva do desaguamento do lodo, conforme evidenciado pela redução do CST para 20 segundos e SRF em 90%, no entanto, necessitou um período de tratamento de 1 a 2 dias, já o floculante biogênico produzido por *A. ferrooxidans*, por sua vez, diminuiu o CST e melhorou o desaguamento do lodo em apenas 4 horas (WONG et al. 2016). Este estudo demonstra eficiência da cultura e do sobrenadante da cultura de *A. ferrooxidans* na melhoria do desaguamento do lodo, mas, embora o inóculo seja eficaz, requer um tempo substancial para atingir o desaguamento, enquanto o sobrenadante pode ser usado como floculante sem a adição de fonte de energia aos microrganismos (neste caso Fe^{2+}), obtendo-se rápida floculação e desaguamento do lodo.

Figura 3.4. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a bactéria acidófila (*A. thiooxidans*) e seu sobrenadante



Fonte: Autor (2024).

Figura 3.5. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com a bactéria acidófila (*A. thiooxidans*) e seu sobrenadante



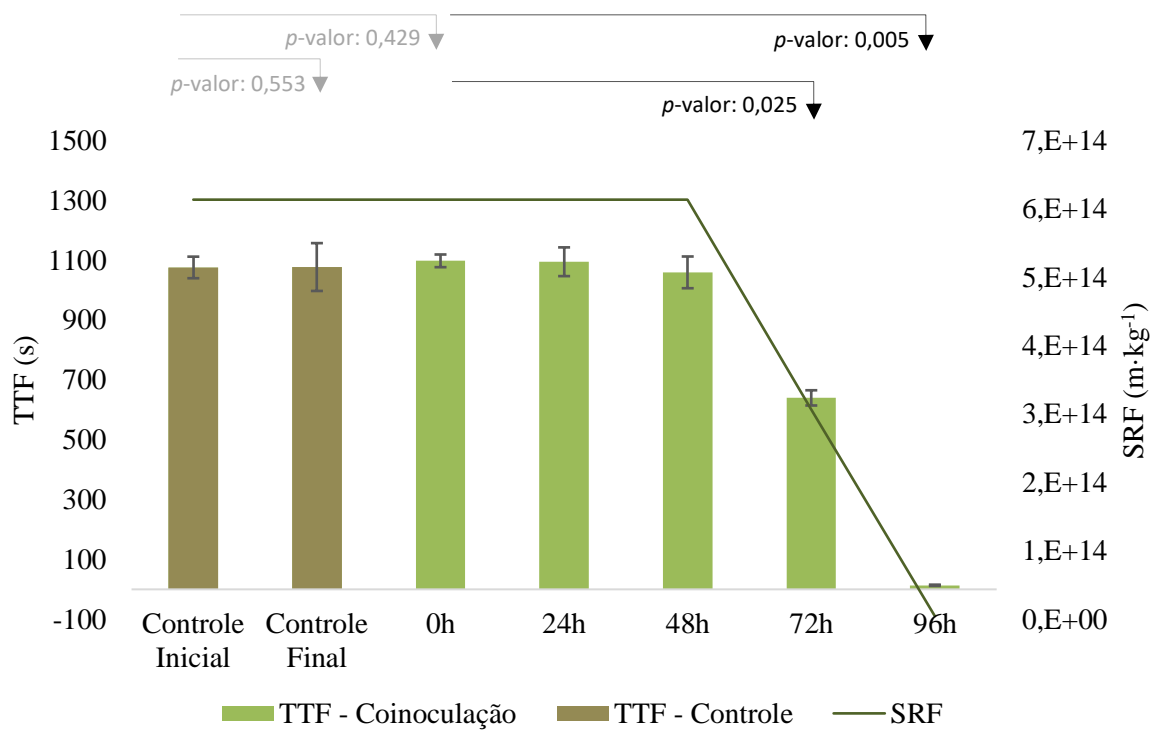
Fonte: Autor (2024).

A concentração de inóculo de 15% de *A. thiooxidans* foi escolhida para o experimento de coinoculação com a levedura *R. mucilaginosa*. Os resultados, apresentados na Figura 3.6 e Tabela 3.5, indicam que a redução do TTF foi significativa (p -valor $< 0,05$) a partir de 72 horas de tratamento ($10,7 \pm 0,42$ min; p -valor: 0,025), atingindo o mínimo de 14 segundos em 96 horas ($0,23 \pm 0,04$ min; p -valor: 0,005), aproximadamente 98,7% de redução em relação ao controle ($17,9 \pm 0,6$ min) e 84,7% de redução em relação ao sobrenadante da *A. thiooxidans* ($1,5 \pm 0,1$ min). Os resultados de SRF acompanharam o padrão de redução do TTF, com reduções mais acentuadas a partir de 72h de tratamento ($3,1 \cdot 10^{14}$ m · kg⁻¹), atingindo seu mínimo em 96h ($4,6 \cdot 10^{12}$ m · kg⁻¹), o que representa uma redução de 99,3% em relação ao SRF do lodo controle ($6,1 \cdot 10^{14}$ m · kg⁻¹). Os testes estatísticos apontaram que não houve diferença significativa entre o lodo controle inicial e o lodo controle final (p -valor: 0,553), e não houve diferença significativa entre os controles e os tempos 0h, 24h e 48h de desaguamento, em todos os casos os testes estatísticos indicaram p -valor $> 0,05$.

No ensaio de coinoculação foi possível estabelecer a correlação entre o TTF e o pH ao longo das 96 horas de (Figura 3.7), evidenciando que a redução do TTF possui um padrão de diminuição bastante semelhante a diminuição do pH ao longo do tempo, ou seja, a partir de 72 horas iniciou uma redução do pH mais acentuada comparado ao lodo controle, atingindo o pH

de 2,7 no final do ensaio. Os resultados permitem inferir maior atividade das bactérias acidófilas e leveduras consorciadas em 96 horas de tratamento. Na Figura 3.8 é possível observar a diferença visual entre o lodo controle e o tratamento do lodo com a coinoculação após 96 horas, resultando em um sobrenadante mais clarificado e um lodo decantado com aspecto de flocos maiores.

Figura 3.6. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa*.



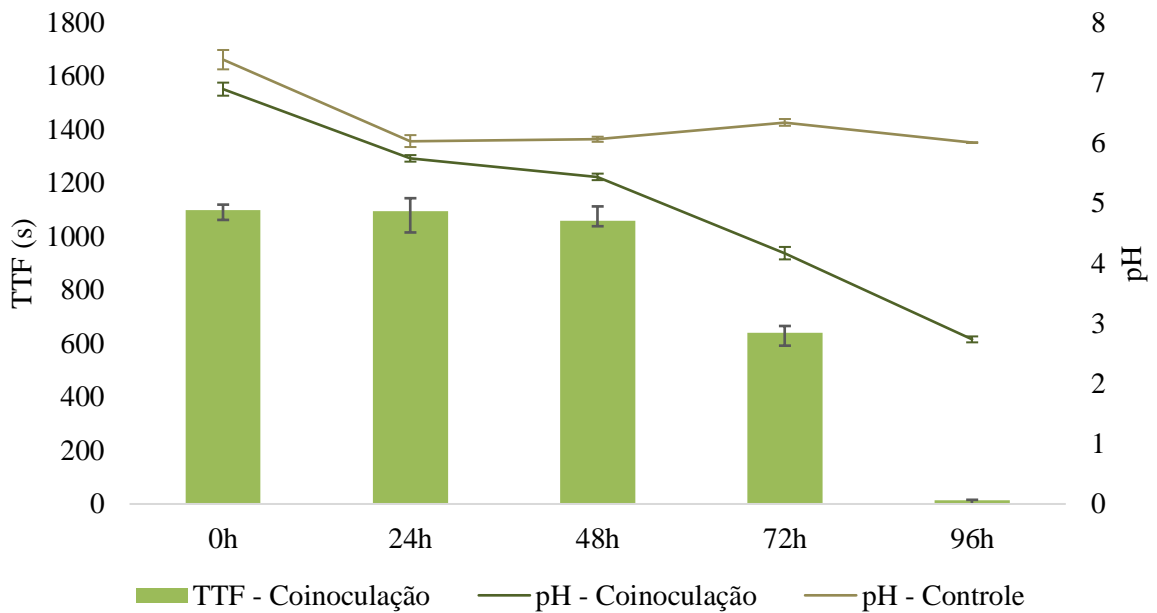
Fonte: Autor (2024).

Tabela 3.5. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*)

Ensaio	TTF (min)	Variação %	SRF ($\text{m}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Variação %
Controle inicial	$17,9 \pm 0,6$	-	$6,1 \cdot 10^{14} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	-
0h	$18,3 \pm 0,4$	↑ 2,0	$6,1 \cdot 10^{14} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	0
24h	$18,3 \pm 0,8$	↑ 1,8	$6,1 \cdot 10^{14} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	0
48h	$17,7 \pm 0,9$	↓ 1,5	$6,1 \cdot 10^{14} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	0
72h	$10,7 \pm 0,4$	↓ 40,5	$3,1 \cdot 10^{14} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	↓ 50,0
96h	$0,2 \pm 0,1$	↓ 98,7	$4,6 \cdot 10^{12} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	↓ 99,3
Controle final	$18,0 \pm 1,3$	-	$6,1 \cdot 10^{14} \text{ m}\cdot\text{kg}^{-1}$	-

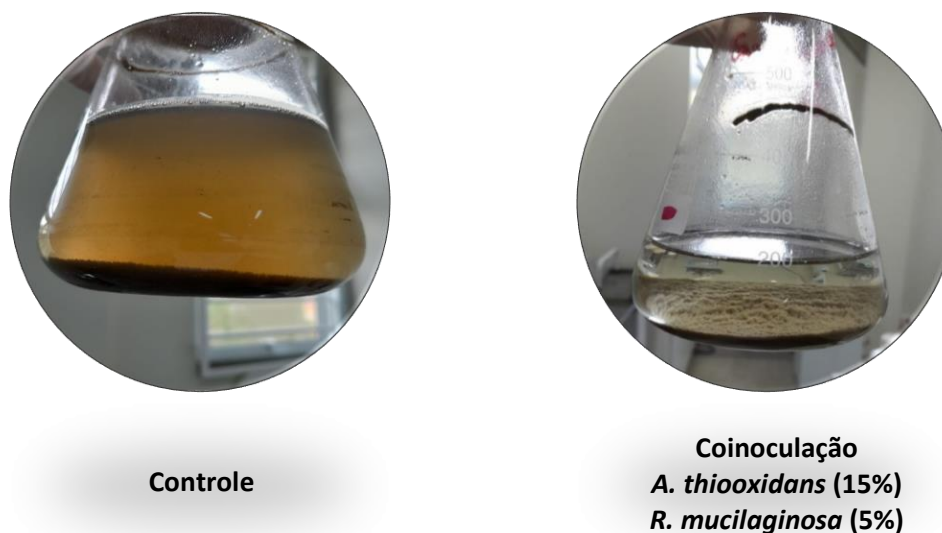
Fonte: Autor (2024).

Figura 3.7. Variação do pH do lodo ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa*



Fonte: Autor (2024).

Figura 3.8. Diferença visual entre o lodo controle (esquerda) e o tratamento do lodo com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa* (direita) após 96h de tratamento



Fonte: Autor (2024).

Em relação a EPS (Figura 3.9), nas primeiras 24 horas a concentração de carboidratos duplicou em comparação com o lodo controle, no entanto, a proporção de carboidratos nesta fase foi predominantemente na fração solúvel (80,8%). Nas horas seguintes de desaguentamento a concentração de carboidratos totais voltou a diminuir, até atingir a concentração de $91,0 \pm 5,5$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹, bastante próximo a concentração final do lodo controle ($95,3 \pm 4,9$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹). A proporção de carboidratos nas frações solúvel e ligada, após 96 horas foi de 60,6% ($55,1 \pm 1,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹) e 39,4% ($35,9 \pm 4,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), respectivamente.

Semelhantemente ao carboidrato total, nas primeiras 24 horas de tratamento houve um aumento na concentração de proteínas totais em comparação com lodo controle, atingindo aproximadamente o dobro da concentração (Figura 3.10). No entanto, a proporção de proteínas nas frações ligadas e solúvel não variou significativamente nas primeiras 24 horas. Nas horas seguintes de ensaio a concentração de proteínas totais voltou a diminuir, e a partir de 72 horas foi acentuada a redução da concentração de proteínas na fração ligada, atingindo no final do período ensaio a concentração de proteínas totais de $52,5 \pm 2,9$ mg de proteínas \cdot L⁻¹, das quais apenas 22,1% correspondem a fração ligada.

Uma limitação importante do uso das *Acidithiobacillus* consiste na sua toxicidade à matéria orgânica dissolvida presente no lodo. Por essa razão, para minimizar esses efeitos negativos e aumentar a eficiência do processo, cepas de levedura tolerantes a ácidos têm sido empregadas na biolixiviação. ZHENG et al. (2016) utilizaram *Mucor circinelloides* ZG-3, um fungo filamentosos, para melhorar o desaguamento do lodo durante processo de biolixiviação, e observaram que a degradação da matéria orgânica dissolvida do lodo pelo fungo reduziu o tempo de tratamento de 11 dias para apenas 4 dias, além de aprimorar o desaguamento do lodo em 8,1 vezes. A coinoculação do fungo com *A. ferrooxidans* foi associada a uma SRF do lodo 25,9% menor do que a SRF em biolixiviação convencional, bactéria sozinha.

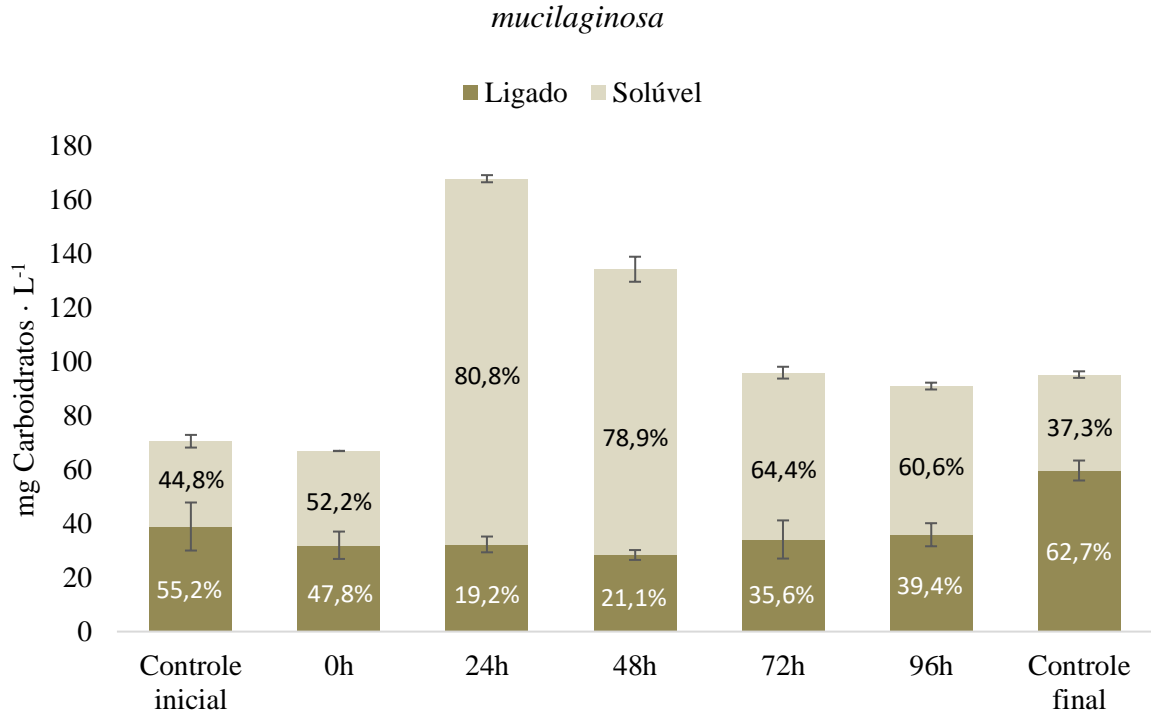
Em estudo semelhante, foi avaliada a coinoculação de *R. mucilaginosa* e *Acidithiobacillus* no tratamento de lodo de curtume e identificado que além da remoção de matéria orgânica dissolvida, a levedura aprimorou a biolixiviação do lodo através da elevação dos níveis de CO₂ dissolvido (WANG et al. 2010). Os pesquisadores identificaram que a concentração de CO₂ dissolvido na solução de biolixiviação foi elevada de 0,23 e 0,54 mg·L⁻¹ para 0,76 e 1,01 mg·L⁻¹ em comparação ao controle inoculado apenas com espécies de *Acidithiobacillus*, e foi demonstrado experimentalmente que o acúmulo de CO₂ aumentou significativamente o crescimento de *A. thiooxidans*, reduzindo o pH do meio. A melhoria da biolixiviação de lodo foi atribuída ao efeito combinado de elevação dos níveis de CO₂ dissolvido e redução de matéria orgânica dissolvida tóxica para espécies de *Acidithiobacillus* relatadas em estudos anteriores (WANG et al. 2010).

WANG et al. (2010) avaliaram a coinoculação de *R. mucilaginosa* e *Acidithiobacillus* na biolixiviação de lodo de curtume e identificaram que além da remoção de matéria orgânica dissolvida, a levedura aprimorou a biolixiviação do lodo através da elevação dos níveis de CO₂ dissolvido. Neste estudo, os pesquisadores identificaram que a concentração de CO₂ dissolvido na solução de biolixiviação foi elevada de 0,23 e 0,54 mg·L⁻¹ para 0,76 e 1,01 mg·L⁻¹ em comparação ao controle inoculado apenas com espécies de *Acidithiobacillus*, e foi demonstrado experimentalmente que o acúmulo de CO₂ aumentou significativamente o crescimento de *A. thiooxidans*, reduzindo o pH do meio. A melhoria da biolixiviação de lodo foi atribuída ao efeito combinado de elevação dos níveis de CO₂ dissolvido e redução de matéria orgânica dissolvida tóxica para espécies de *Acidithiobacillus* relatadas em estudos anteriores.

O aumento do teor de EPS nas primeiras horas de biolixiviação e posterior redução pode ter contribuído para a otimização do processo de biolixiviação e desaguamento, pois conforme discutido no estudo de WANG et al. (2010), além da remoção de matéria orgânica dissolvida, a levedura *R. mucilaginosa* é capaz de melhorar a biolixiviação do lodo elevando os níveis de

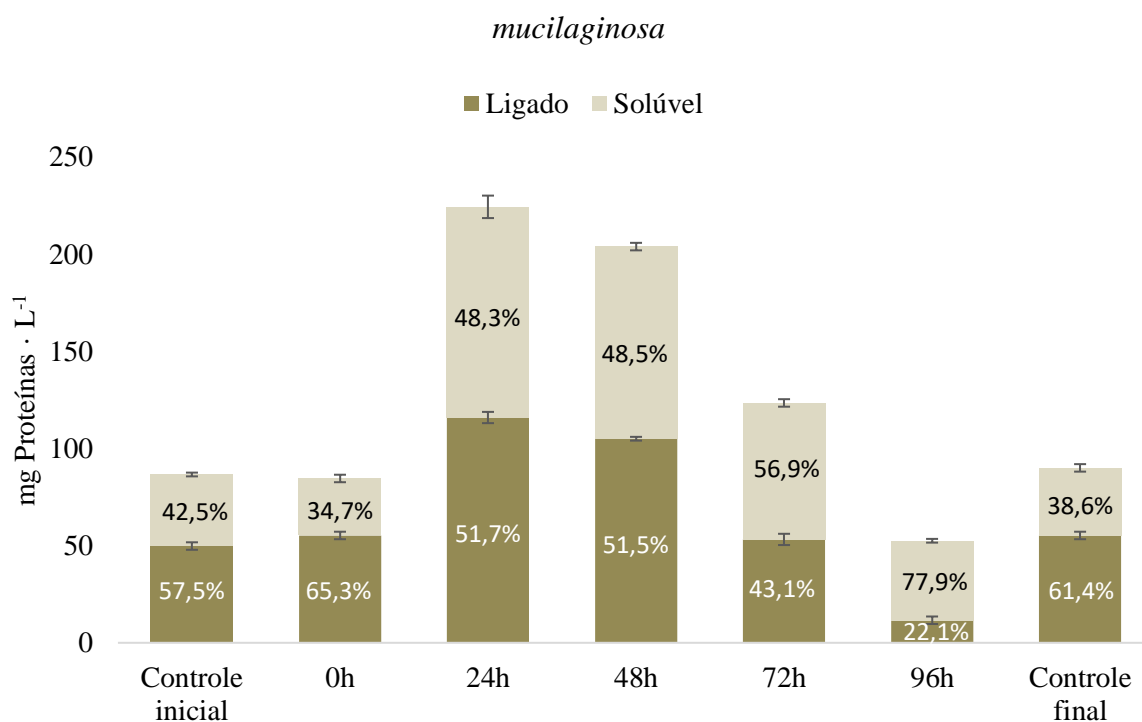
CO₂ dissolvido e os níveis de EPS na solução de biolixiviação. Os autores sugeriram que EPS derivado da *R. mucilaginosa* ao formar complexos solúveis na solução de biolixiviação, pode aumentar a eficiência da biolixiviação, mas tais mecanismos precisam ser melhor explorados.

Figura 3.9. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R.*



Fonte: Autor (2024).

Figura 3.10. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 96 horas de tratamento com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa*



Fonte: Autor (2024).

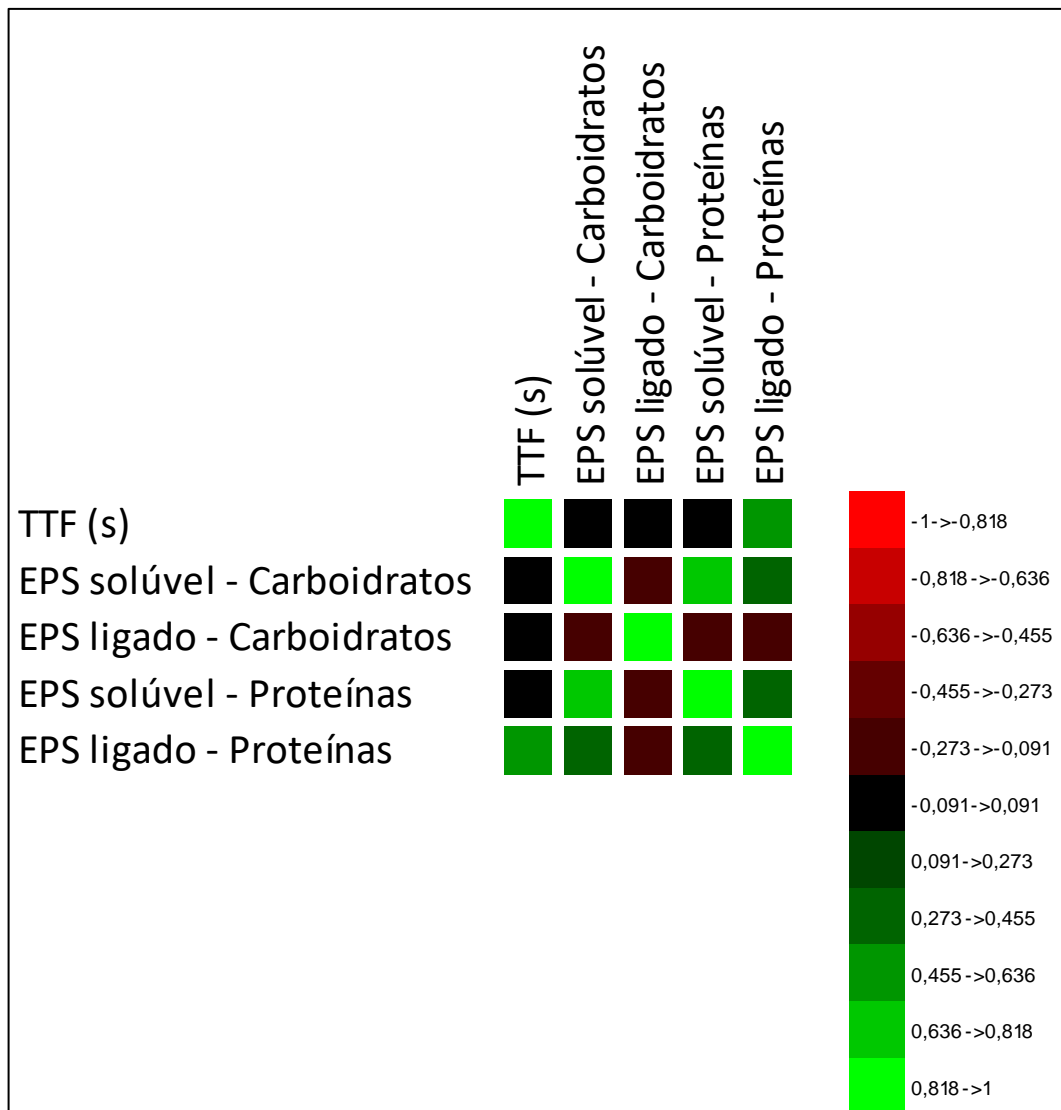
Os resultados do ensaio de coinoculação, identificado como melhor desaguamento entre os ensaios avaliados, foram submetidos a análises de Correlação de Kendall a fim de identificar a correlação entre as variáveis TTF, e concentrações de proteínas e carboidratos nas frações solúvel e ligada de EPS. A matriz de Correlação de Kendall é apresentada na Tabela 3.6 e Figura 3.11 e sinaliza alta correlação positiva entre a concentração de carboidratos e proteínas na fração solúvel de EPS ($\tau = 0,751$), indicando quando há um aumento na concentração de carboidratos na fração solúvel, a concentração de proteínas na fração solúvel também aumenta. No entanto, a correlação entre ambas as variáveis e o TTF são próximas de zero, ou seja, possuem baixa correlação com o aumento ou diminuição do tempo de filtração. A concentração de proteínas na fração ligada no EPS, por sua vez, possui a maior magnitude de correlação com o TTF ($\tau = 0,469$) entre as variáveis analisadas, e por se tratar de uma correlação positiva, indica que quando há um aumento da concentração de proteínas ligadas em EPS, há um aumento do TTF, fator que afeta negativamente o desaguamento. A análise de Correlação de Kendall reforça a hipótese anterior de que uma conversão eficiente das proteínas ligadas em EPS para proteínas solúveis favorece o desaguamento, mensurado neste experimento pelo TTF.

Tabela 3.6. Matriz de Correlação de Kendall: TTF e concentrações de carboidratos e proteínas nas frações solúvel e ligada de EPS

Variáveis	TTF (s)	EPS _S	EPS _L	EPS _S	EPS _L
		Carboidratos	Carboidratos	Proteínas	Proteínas
TTF (s)	1				
EPS _S Carboidratos	-0,055	1			
EPS _L Carboidratos	-0,011	-0,231	1		
EPS _S Proteínas	-0,044	0,751	-0,221	1	
EPS _L Proteínas	0,469	0,402	-0,246	0,303	1

Fonte: Autor (2024).

Figura 3.11. Gráfico de Correlação de Kendall: TTF e concentrações de carboidratos e proteínas nas frações solúvel e ligada de EPS



Fonte: Autor (2024).

3.3.3. Experimentos de desaguamento do lodo – Segunda Coleta

A fim de replicar o tratamento com melhor resultado obtido na etapa anterior (coinoculação da bactéria e levedura), uma segunda amostra de lodo foi coletada em outra estação de tratamento. Além disso, o tratamento com o sobrenadante da bactéria também fora aplicado em ensaio de menor duração (3 horas) e com análises intermediárias de desaguamento, a cada 1 hora. Simultaneamente ao ensaio com o sobrenadante foi realizado ensaio com lodo acidificado com ácido sulfúrico (H_2SO_4) até pH próximo ao do lodo com o sobrenadante.

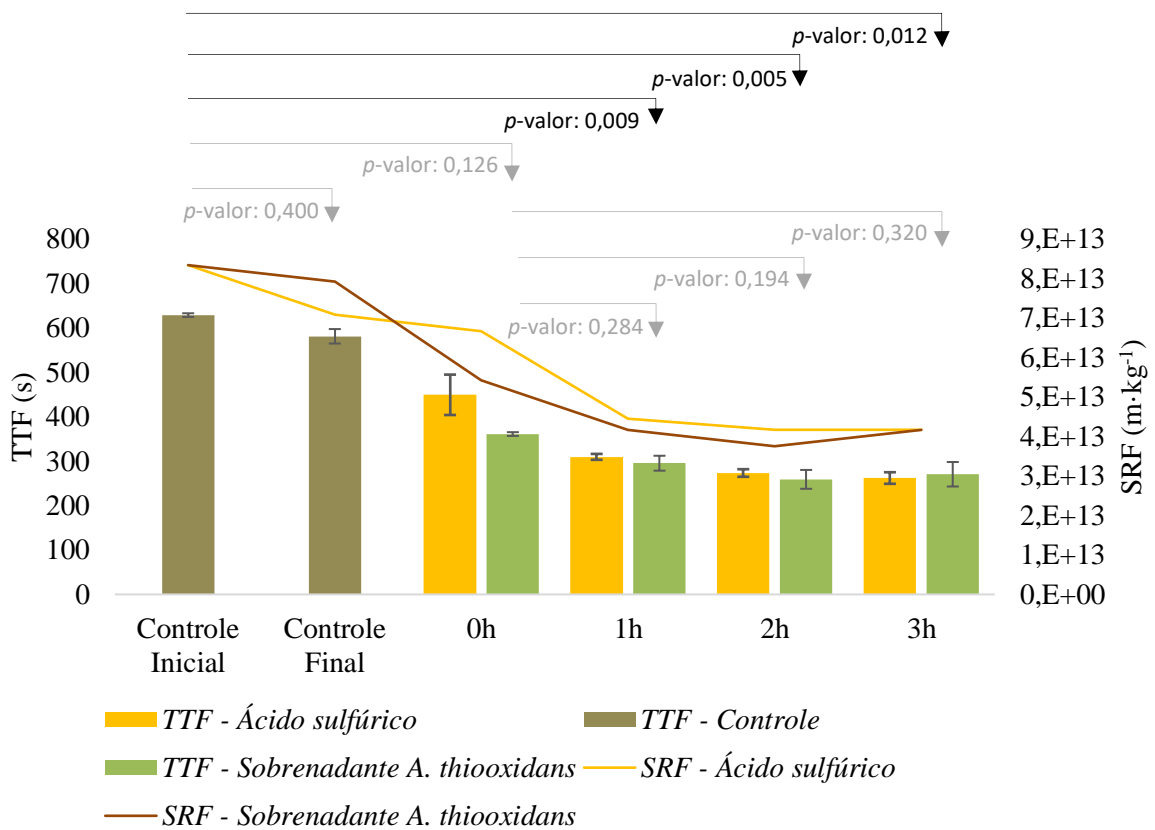
Os novos ensaios tiveram como objetivo testar a aplicabilidade do melhor resultado obtido na etapa anterior em outros tipos de lodo, bem como identificar para o sobrenadante da bactéria, a partir das análises intermediárias, se o desaguamento pode ser obtido em menor tempo de tratamento, haja vista o sobrenadante, livre de células de cultivo, não necessitar do tempo de adaptação necessário quando utilizado o inóculo no tratamento. O lodo acidificado com ácido sulfúrico foi utilizado na comparação do sobrenadante com o intuito de identificar a influência do ácido presente no sobrenadante no desaguamento do lodo, uma vez que é conhecida a capacidade de bactérias *A. thiooxidans* oxidar enxofre (enxofre elementar ou compostos de enxofre) a ácido sulfúrico e tornar o meio ácido, condição que é favorável no processo de biolixiviação.

O desaguamento do lodo também foi mensurado pelo TTF e SRF, bem como caracterizado quanto o conteúdo de proteínas e carboidratos nas frações solúvel e ligada de EPS. Os resultados do sobrenadante da *A. thiooxidans* e ensaio comparativo com ácido sulfúrico são apresentados na Figura 3.12 e Tabela 3.7 e indicam que a redução do TTF foi significativa (p -valor $< 0,05$) a partir de 1 hora de tratamento, tanto para o tratamento com o sobrenadante ($4,9 \pm 0,3$ min), quanto para o tratamento com o ácido sulfúrico ($5,2 \pm 0,1$ min), refletindo em ambas as resistências a filtração. Após 3 horas de tratamento o sobrenadante reduziu o TTF a $4,5 \pm 0,5$ minutos (p -valor: 0,012), aproximadamente 57,0% de redução em relação ao controle ($10,5 \pm 0,1$ min). O ácido sulfúrico após 3 horas de tratamento obteve redução semelhante ao sobrenadante, isto é, 58,3% ($4,4 \pm 0,2$ min). Esses resultados indicam influência do ácido sulfúrico presente no sobrenadante na redução do tempo de filtração, redução da resistência a filtração e melhoria do desaguamento do lodo.

Embora as reduções de TTF e SRF sejam menos expressivas comparado aos resultados obtidos com o lodo avaliado anteriormente, foi possível verificar a aplicabilidade do tratamento a outros tipos de lodo, ainda que possa existir variações na eficácia devido a influência da composição, características físico-químicas do esgoto e tipologia de tratamento na ETE.

Além disso, com o ensaio de menor duração com o sobrenadante foi possível identificar que o TTF variou em taxa inferior a 5% entre os tempos analisados, indicando que pode ser obtida estabilidade do TTF e consequentemente o desaguamento máximo em tempo inferior a quatro dias de tratamento. O monitoramento do pH evidenciou baixa variação ao longo das 3 horas em ambos os tratamentos (Figura 3.13) e foi observado pequeno aumento no pH do lodo controle.

Figura 3.12. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (*A. thiooxidans*) e comparativo com ácido sulfúrico



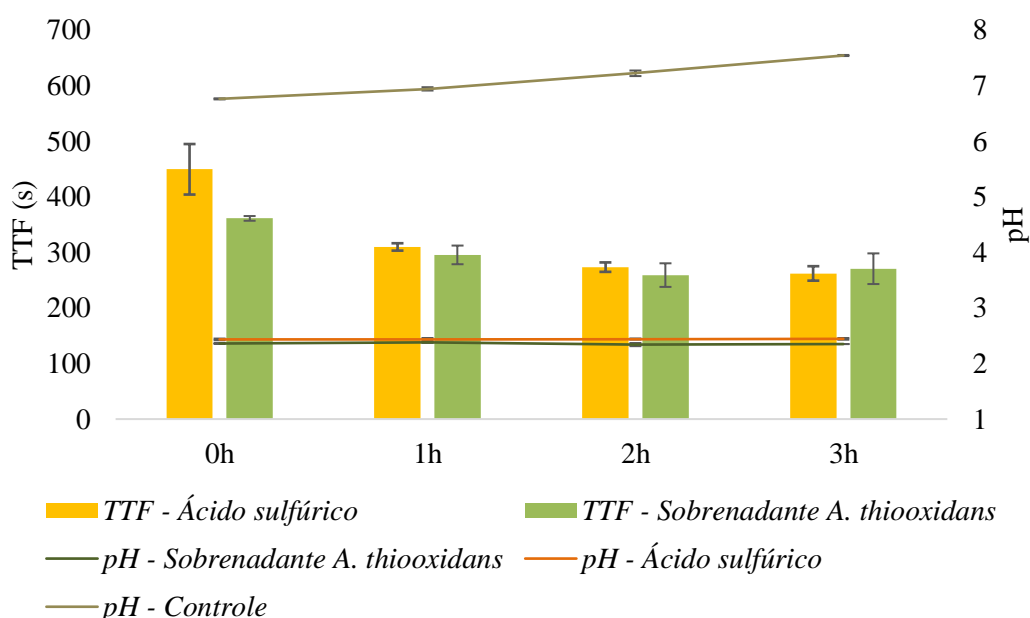
Fonte: Autor (2024).

Tabela 3.7. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com o sobrenadante da bactéria (*A. thiooxidans*) e comparativo com ácido sulfúrico

Ensaio	Sobrenadante <i>A. thiooxidans</i>		Ácido sulfúrico	
	TTF (min)	Variação %	TTF (min)	Variação %
Controle inicial	10,5 ± 0,1	-	10,5 ± 0,1	-
0h	6,0 ± 0,1	↓ 42,6	7,5 ± 0,8	↓ 28,5
1h	4,9 ± 0,3	↓ 53,0	5,2 ± 0,1	↓ 50,7
2h	4,3 ± 0,4	↓ 58,8	4,6 ± 0,1	↓ 56,5
3h	4,5 ± 0,5	↓ 57,0	4,4 ± 0,2	↓ 58,3
Controle final	9,7 ± 0,3	-	9,7 ± 0,3	-

Fonte: Autor (2024).

Figura 3.13. Variação do pH do lodo ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (*A. thiooxidans*) e comparativo com ácido sulfúrico



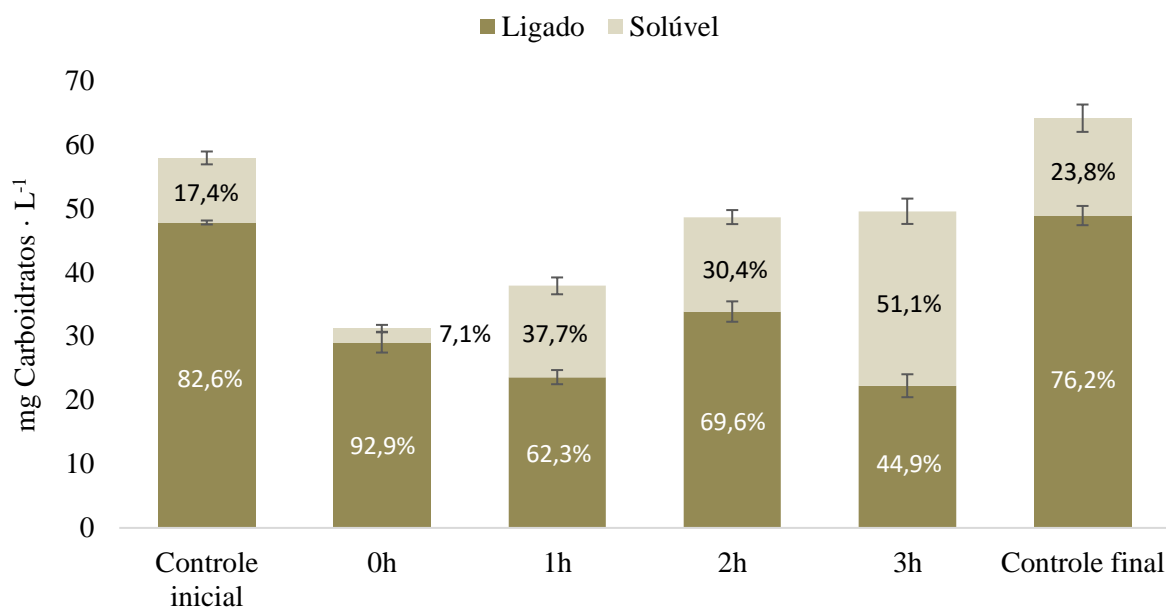
Fonte: Autor (2024).

Com a caracterização de EPS, observou-se que o tratamento com o sobrenadante da bactéria *A. thiooxidans*, diferentemente do lodo anterior, não aumentou as concentrações de carboidratos totais em relação ao controle, bem como as concentrações apresentaram comportamento de aumento ao longo das 3 horas de tratamento e não declínio como com o lodo anterior (Figura 3.14). No entanto, em relação as concentrações de carboidratos nas frações de

EPS, observou-se que no lodo controle inicial, a maior parcela dos carboidratos também se encontra na fração ligada ($47,7 \pm 0,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 82,6% dos carboidratos totais ($57,8 \pm 1,3$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹). Assim como com o lodo da ETE 1 o tratamento do lodo com o sobrenadante da *A. thiooxidans* proporcionou liberação dos carboidratos da fração ligada, resultando em um maior percentual de carboidratos na fração solúvel ($27,3 \pm 2,0$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), equivalente a 51,1% dos carboidratos totais ($49,5 \pm 3,8$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹), embora a conversão tenha sido mais eficiente com o lodo da ETE1, 77,7% de carboidratos na fração solúvel, refletindo em um menor tempo de filtração ($1,5 \pm 0,1$ min) e melhor resultado de desaguamento.

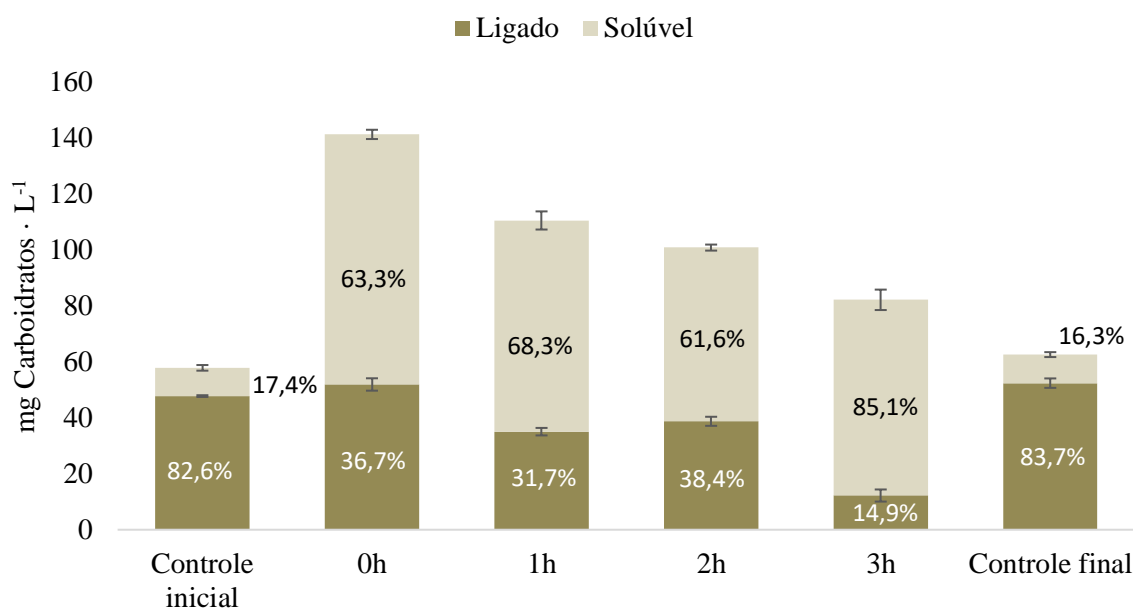
O tratamento com ácido sulfúrico (Figura 3.15), por sua vez, aumentou a concentração de carboidratos totais em EPS, mas teve tendência de declínio ao longo do tratamento, atingindo $82,1 \pm 5,8$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹ em 3 horas. A conversão de carboidratos da fração ligada para a solúvel teve eficiência superior ao sobrenadante, atingindo o percentual de 85,1% de carboidratos na fração solúvel em relação a concentração de carboidratos totais.

Figura 3.14. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (*A. thiooxidans*)



Fonte: Autor (2024).

Figura 3.15. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o ácido sulfúrico

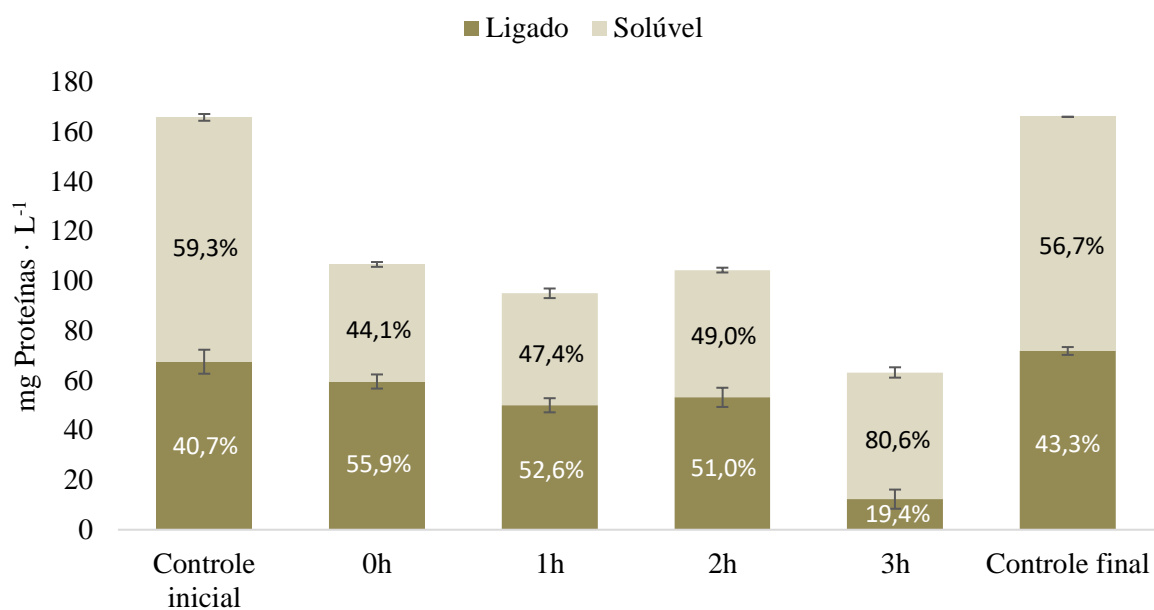


Fonte: Autor (2024).

Diferentemente ao observado com o lodo anterior, tanto o tratamento com o sobrenadante da *A. thiooxidans*, quanto o tratamento com ácido sulfúrico, não aumentaram as concentrações de proteínas totais (Figuras 3.16 e 3.17) e com o sobrenadante neste caso, houve uma tendência de diminuição ao longo do período de tratamento. Em relação as concentrações de proteínas nas frações de EPS no tratamento do lodo com o sobrenadante da *A. thiooxidans*, assim como com o lodo anterior, houve aumento da concentração de proteínas na fração solúvel de EPS ($50,9 \pm 2,1$ mg de proteínas \cdot L⁻¹) em 3 horas de tratamento, equivalente a 80,6% das proteínas totais ($63,2 \pm 5,9$ mg de proteínas \cdot L⁻¹) e diminuição da concentração de proteínas na fração ligada ($12,3 \pm 3,9$ mg de proteínas \cdot L⁻¹), equivalente a 19,4% das proteínas totais.

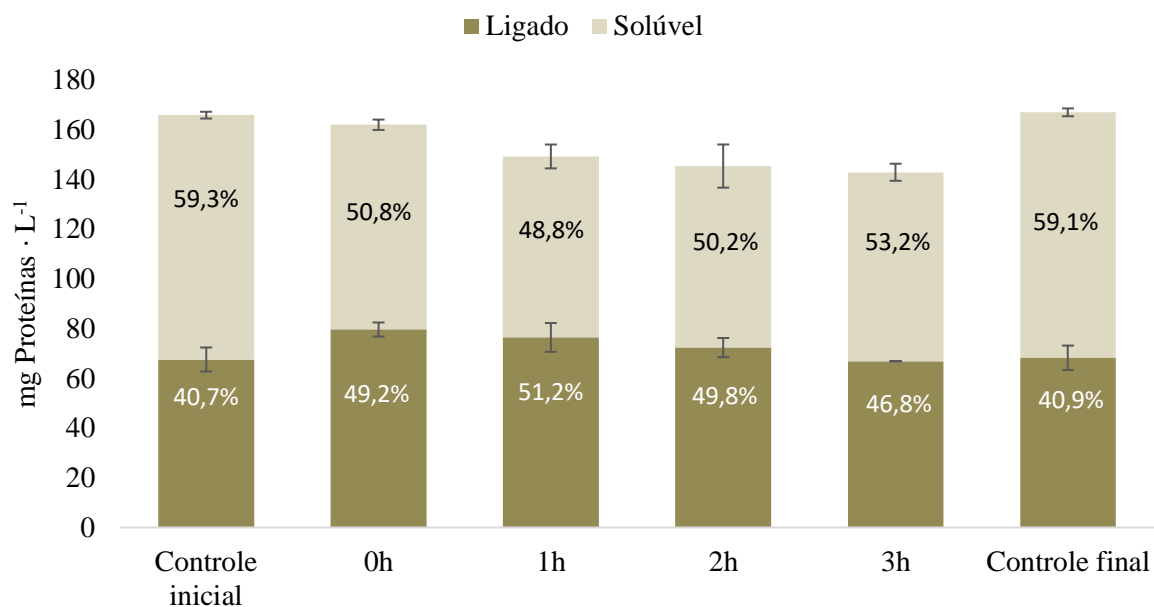
O tratamento com o ácido sulfúrico, por sua vez, resultou em uma pequena diminuição da concentração de proteínas totais, mas não apresentou variação significativa nas concentrações de proteínas solúveis e ligadas em comparação com o lodo controle. Desta forma, foi observada uma conversão mais eficiente de carboidratos da fração ligada para solúvel com o tratamento do ácido sulfúrico do que com o sobrenadante da *A. thiooxidans* e uma conversão mais eficiente de proteínas da fração ligada para solúvel com o tratamento do sobrenadante do que com o ácido sulfúrico, mas ambos refletiram em reduções semelhantes de tempo de filtração e promoção de desaguamento.

Figura 3.16. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o sobrenadante da bactéria (*A. thiooxidans*)



Fonte: Autor (2024).

Figura 3.17. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) ao longo das 3 horas de tratamento com o ácido sulfúrico



Fonte: Autor (2024).

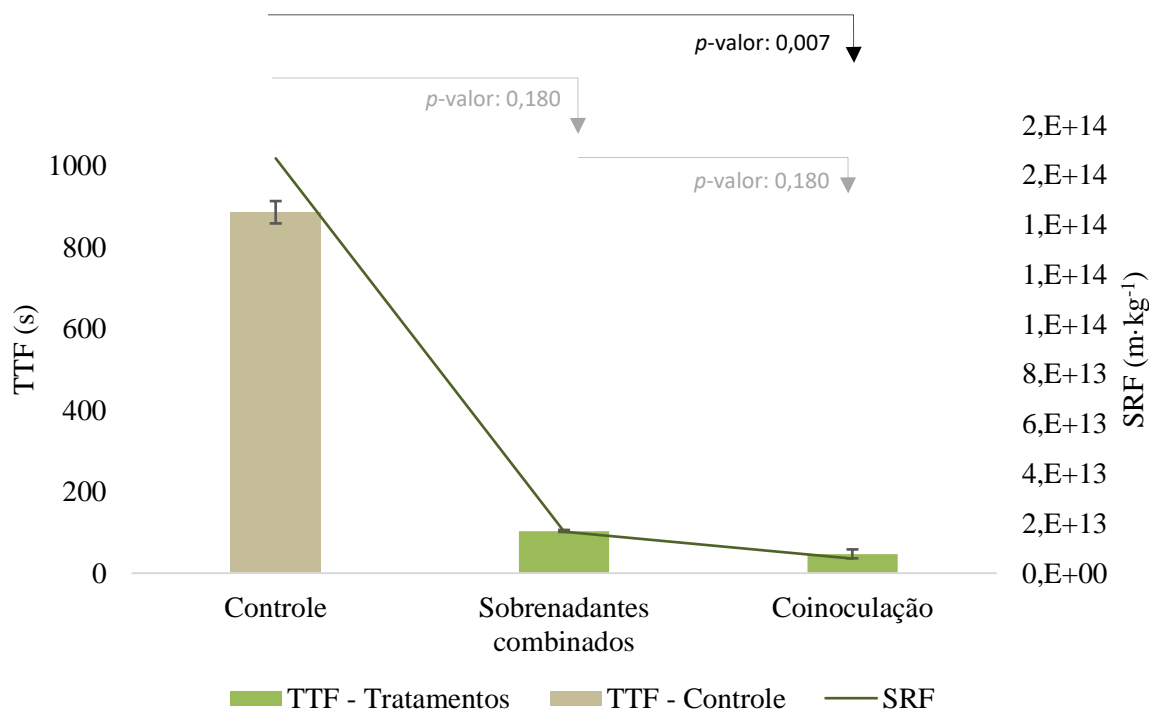
O ensaio com melhor resultado de desaguamento obtido nas Etapas I e II, isto é, a coinoculação de 15% de inóculo de *A. thiooxidans* e 5% de inóculo de *R. mucilaginosa*, foi

replicado com lodo de outra ETE2. O novo ensaio, com a mesma duração (96 horas) e condições experimentais do ensaio anterior, teve como objetivo testar a aplicabilidade da coinoculação em outros tipos de lodo. Como os sobrenadantes da bactéria e levedura também apresentam resultados significativos de desaguamento na Etapa I, eles também foram testados com o novo lodo, mas combinados na proporção de 15% de cada sobrenadante. O desaguamento do lodo também foi mensurado pelo TTF e SRF, bem como caracterizado quanto o conteúdo de proteínas e carboidratos nas frações solúvel e ligada de EPS.

Semelhante ao lodo anterior, a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* com a levedura *R. mucilaginosa* resultou em redução do TTF e SRF (Figura 3.18 e Tabela 3.8). Em comparação com os sobrenadantes da bactéria e levedura combinados, menores valores de TTF ($0,7 \pm 0,1$ min) e SRF ($5,8 \cdot 10^{12}$ m · kg⁻¹) foram obtidos com a coinoculação, aproximadamente 96,5% de redução em relação ao lodo controle ($14,8 \pm 0,5$ min; $1,7 \cdot 10^{14}$ m · kg⁻¹). Com os sobrenadantes combinados houve redução do TTF em 90,0% em relação ao lodo controle, atingindo um TTF de $1,7 \pm 0,1$ min. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstraram que, comparado ao controle, a redução no TTF foi significativa para o tratamento com a coinoculação no nível de significância de 5% (p -valor: 0,007), mas não houve diferença entre os TTF dos tratamentos avaliados (p -valor: 0,180). Embora a coinoculação e os sobrenadantes combinados apresentem, neste estudo, desempenho de desaguamento semelhantes, é importante ressaltar que o uso dos sobrenadantes podem ser mais vantajosos ao permitir o reaproveitamento da biomassa como inóculo para produção de mais sobrenadante, bem como possuem potencial de promoção do desaguamento em um menor tempo de tratamento.

Assim como observado com o lodo anterior, houve redução do pH ao longo do tempo (Figura 3.19) e a partir de 48 horas iniciou uma redução do pH mais acentuada comparado ao lodo controle, atingindo o pH de 2,9 no final do ensaio, bastante próximo ao pH identificado com o lodo anterior (pH de 2,7). Os resultados reforçaram a inferência anterior quanto a maior atividade das bactérias acidófilas e leveduras consorciadas no final do tratamento.

Figura 3.18. TTF e SRF médios do lodo ao longo das 96 horas de tratamento: coinoculação da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) e sobrenadantes da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) combinados



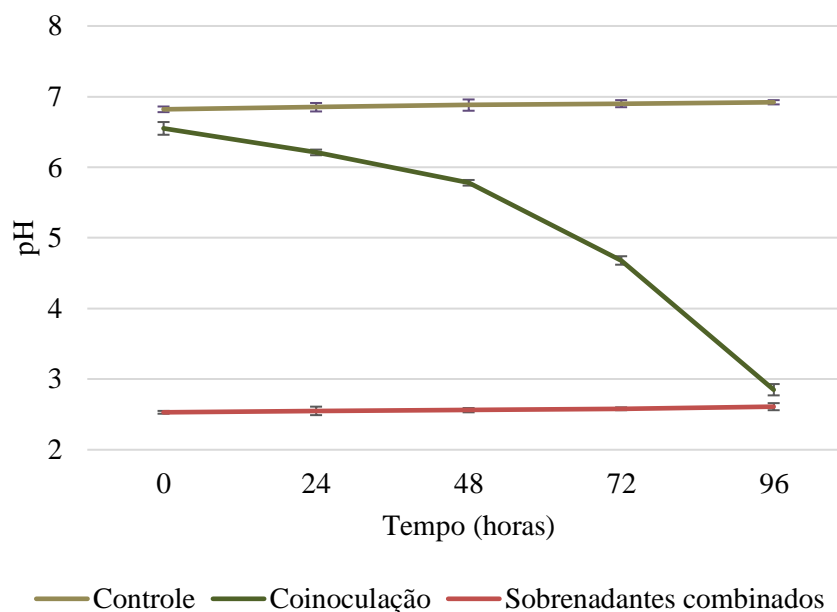
Fonte: Autor (2024).

Tabela 3.8. Variação percentual do TTF em relação ao controle durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) e sobrenadantes da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) combinados

Ensaio	TTF (min)	Variação %	SRF (m·kg ⁻¹)	Variação %
Controle	14,8 ± 0,5	-	1,7 · 10 ¹⁴ m·kg ⁻¹	-
Sobrenadantes Combinados	1,7 ± 0,1	↓ 88,3	1,7 · 10 ¹³ m·kg ⁻¹	↓ 90,0
Coinoculação	0,7 ± 0,1	↓ 95,4	5,8 · 10 ¹² m·kg ⁻¹	↓ 96,5

Fonte: Autor (2024).

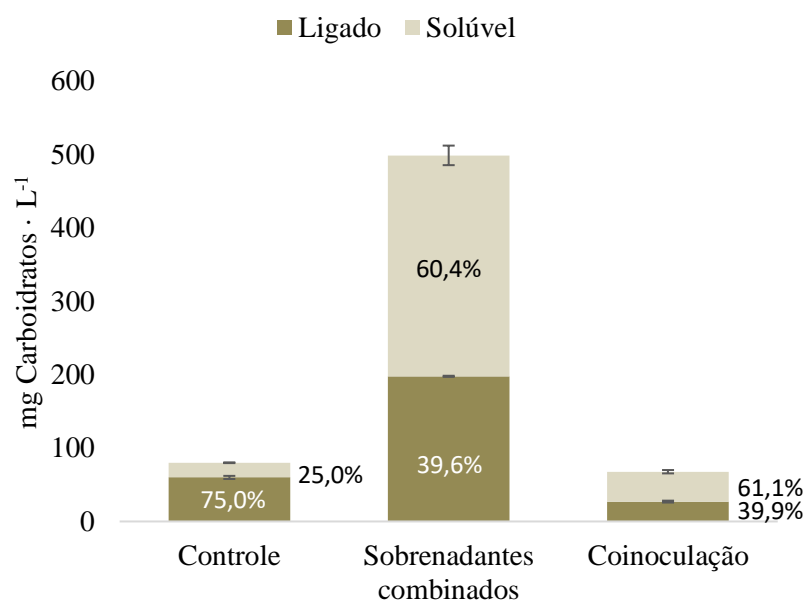
Figura 3.19. Variação do pH do lodo durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) e sobrenadantes da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) combinados



Fonte: Autor (2024).

Em relação a EPS (Figura 3.20), o tratamento com os sobrenadantes combinados resultou em aumento da concentração de carboidratos totais ($498,9 \pm 14,1$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹) em comparação com o lodo controle ($80,0 \pm 2,6$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹) e com a coinoculação ($67,8 \pm 3,6$ mg de carboidratos \cdot L⁻¹). No entanto, a proporção de carboidratos no lodo controle era predominante na fração ligada (75,0%) e após o tratamento dos sobrenadantes combinados foi predominante a fração solúvel (60,4%). Com o tratamento de coinoculação também houve predomínio de carboidratos na fração solúvel (61,1%) em relação a fração ligada (39,9%), indicando, em ambos os tratamentos, que houve uma conversão dos carboidratos da fração ligada para a fração solúvel do EPS, resultado semelhante ao obtido com a coinoculação do lodo avaliado anteriormente.

Figura 3.20. Concentração de carboidratos em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) e sobrenadantes da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) combinados



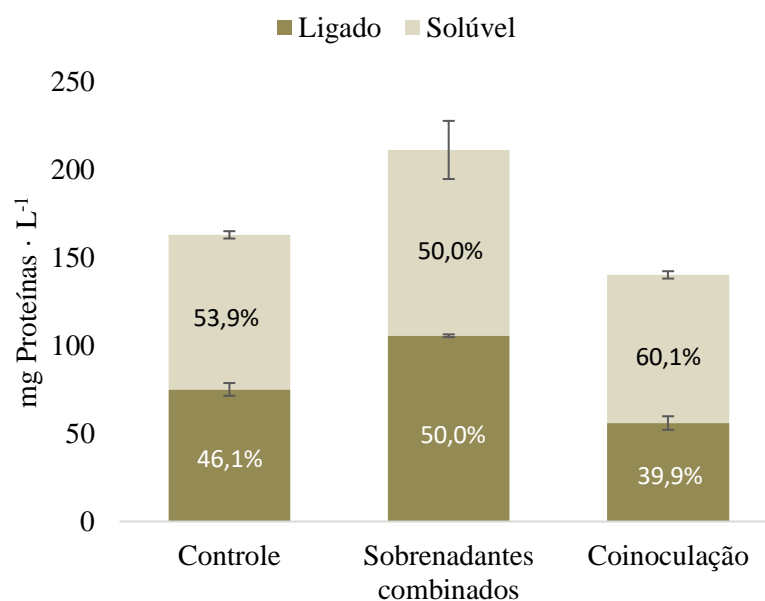
Fonte: Autor (2024).

Semelhantemente ao carboidrato total, com os sobrenadantes combinados também houve aumento na concentração de proteínas totais ($211,0 \pm 17,3$ mg de proteínas \cdot L⁻¹) em comparação com lodo controle ($162,8 \pm 5,7$ mg de proteínas \cdot L⁻¹) e não houve redução significativa nas proteínas da fração ligada (Figura 3.21). O tratamento de coinoculação, entretanto, resultou em diminuição das proteínas totais ($140,1 \pm 5,9$ mg de proteínas \cdot L⁻¹) e diminuição na proporção de proteínas na fração ligada (39,9%) em comparação com o lodo controle (46,1%). No entanto, esta redução foi menos expressiva comparado com o lodo avaliado anteriormente, que resultou em apenas 22,1% de proteínas na fração ligada de EPS.

Os resultados obtidos com a segunda coleta reforçam a hipótese de no tratamento de coinoculação existir uma correlação entre a redução das proteínas ligadas em EPS com a diminuição do TTF para promoção do desaguamento. No entanto, com os sobrenadantes combinados, assim como observado com o sobrenadante da *A. thiooxidans* no lodo avaliado anteriormente, observa-se que o conteúdo de proteínas na fração ligada não foi novamente o fator determinante na promoção do desaguamento, embora, os resultados de TTF e SRF obtidos sejam semelhantes aos obtidos com a coinoculação da bactéria e levedura. Esta constatação reforça a hipótese de que com os sobrenadantes dos inóculos, outros fatores, como a carga superficial dos flocos e mecanismos de floculação podem ter influenciado mais fortemente para

a promoção do desaguamento do que as proporções de carboidratos e proteínas nas frações de EPS.

Figura 3.21. Concentração de proteínas em EPS (frações solúvel e ligada) durante o desaguamento com coinoculação da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) e sobrenadantes da bactéria (*A. thiooxidans*) e levedura (*R. mucilaginosa*) combinados



Fonte: Autor (2024).

3.3.4. Caracterização final do lodo

Após os experimentos, para o melhor resultado de desaguamento obtido, isto é, coinoculação de *A. thiooxidans* e *R. mucilaginosa* (Etapa II), o lodo controle final e o lodo tratado foram submetidos a uma caracterização final, que compreende parâmetros físico-químicos (Tabela 3.9).

Tabela 3.9. Caracterização final do lodo: parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Análise	Controle final	Coinoculação
Físico-químicos	pH	6,0 ± 0,3	2,7 ± 0,1
	Sólidos Totais (ST)	5880,0 ± 156,2 mg · L ⁻¹	4031,7 ± 409,7 mg · L ⁻¹
	Sólidos Totais Voláteis (STV)	4368,3 ± 190,4 mg · L ⁻¹	1976,7 ± 209,3 mg · L ⁻¹

Fonte: Autor (2024).

Os resultados de pH da caracterização final indicam que houve uma variação percentual de 15,5% do pH do lodo controle final em relação ao lodo bruto caracterizado inicialmente. A variação percentual do lodo coinoculado, no entanto, foi mais significativa, 62% em relação ao lodo bruto caracterizado inicialmente.

Os resultados da caracterização final indicam ainda que houve pequena variação nas concentrações de ST e STV do lodo controle em relação ao lodo bruto. O lodo bruto apresentou na caracterização inicial concentrações de $6078,3 \pm 108,7$ mg de ST \cdot L⁻¹ e $4523,3 \pm 368,3$ mg de STV \cdot L⁻¹, enquanto o lodo controle na caracterização final apresentou resultados ligeiramente menores, concentrações de $5880,0 \pm 156,2$ mg de ST \cdot L⁻¹ e $4368,3 \pm 190,4$ mg de STV \cdot L⁻¹, representando uma variação percentual de 3,3 e 3,4% em ST e STV, respectivamente.

A caracterização final da coinoculação, por sua vez, apresentou redução de orgânico e maior variação nas concentrações de ST e STV comparado com os lodos bruto e lodo controle, concentrações de $4031,7 \pm 409,7$ mg de ST \cdot L⁻¹ e $1976,7 \pm 209,3$ mg de STV \cdot L⁻¹, representando uma variação percentual em relação ao lodo bruto de 33,7 e 56,3% em ST e STV, respectivamente.

3.4. CONCLUSÃO

A utilização do sobrenadante da *A. thiooxidans* apresentou menor TTF comparado com a melhor concentração de inóculo da bactéria (15%), atingindo $1,5 \pm 0,1$ min (aproximadamente 81,2% inferior), indicando vantagem do uso do sobrenadante em relação ao inóculo. Além disso, em ensaio de menor duração com o sobrenadante foi possível identificar que o TTF variou em taxa inferior a 5% entre os tempos analisados, indicando que pode ser obtida estabilidade do TFF e conseqüentemente o desaguamento máximo em tempo inferior a quatro dias de tratamento. O lodo acidificado com ácido sulfúrico foi utilizado para comparativo com o sobrenadante e após 3 horas de tratamento obteve redução semelhante de TTF ($4,4 \pm 0,2$ min) indicando forte influência do ácido sulfúrico presente no sobrenadante na redução do tempo de filtração.

A coinoculação da bactéria com a levedura foi o melhor resultado de desaguamento entre os ensaios avaliados (14 segundos em 96 horas, pH = 2,7), redução de 98,7% no TTF em relação ao controle, resultado reforçado com o lodo da segunda ETE. A partir de 72 horas de tratamento foi acentuada a redução da concentração de proteínas ligadas em EPS (79% inferior ao lodo controle) e por análise de Correlação de Kendall foi demonstrada que a concentração de proteínas na fração ligada no EPS possui a maior magnitude de correlação positiva com o

TTF ($\tau = 0,469$) entre as variáveis analisadas reforçando a hipótese de que uma conversão eficiente das proteínas ligadas em EPS para proteínas solúveis favorece o processo de desaguamento. Os sobrenadantes combinados apresentam resultado de desaguamento semelhante à coinoculação e os testes estatísticos indicaram que não houve diferença entre os TTF da coinoculação e sobrenadantes combinados. Portanto, conclui-se que embora a coinoculação apresente neste estudo melhores resultados de desaguamento, os sobrenadantes combinados apresentam resultado bastante semelhante e o uso dos sobrenadantes podem ser mais vantajosos ao permitir o reaproveitamento da biomassa como inóculo para produção de mais sobrenadante, bem como pelo seu potencial de promoção do desaguamento em um menor tempo de tratamento.

3.5. REFERÊNCIAS

- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. **American Public Health Association**, Washington, DC, 2012.
- ARHAN, Y., OZTURK, I., CIFCI, T. Settling and dewatering characteristics of sludge from baker's yeast production wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 459–467, 1996.
- CAMARGO, F. P.; PRADO, P. F.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Bioremediation of toxic metals from sewage sludge by co-inoculation of *Acidithiobacillus* and the biosurfactant-producing yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Journal of environmental management**, v. 211, p. 28-35, 2018.
- CHO, K. S.; RYU, H. W.; CHOI, H. M. Toxicity evaluation of complex metal mixtures using reduced metal concentrations: Application to iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 1298-1307, 2008.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Norma Técnica nº L5.217. Thiobacillus: determinação do número mais provável pela técnica dos tubos múltiplos: método de ensaio. São Paulo, CETESB, 13p. 1991.
- DAI, Q.; MA, L.; REN, N.; NING, P.; GUO, Z.; XIE, L.; GAO, H. Investigation on extracellular polymeric substances, sludge flocs morphology, bound water release and dewatering performance of sewage sludge under pretreatment with modified phosphogypsum. **Water Research**, v. 142, p. 337–346, 2018.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.
- FANG, D.; ZHOU, L. X. Effect of sludge dissolved organic matter on oxidation of ferrous iron and sulfur by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Water Air Soil Pollution**, v. 171, p. 81–94, 2006.
- FANG, D.; ZHOU, L. X. Enhanced Cr bioremediation efficiency from tannery sludge with coinoculation of *Acidithiobacillus thiooxidans* TS6 and *Brettanomyces* B65 in an air-lift reactor. **Chemosphere**, v. 69, p. 303-310, 2007.
- FANG, D.; ZHANG, R.; ZHO, L.; LI, J. A combination of bioremediation and bioprecipitation for deep removal of contaminating metals from dredged sediment. **J. Hazard. Mater**, v. 192, p. 226-233, 2011.

- GAN, M.; SONG, Z.; ZHU, J.; LIU, X. Efficient bioleaching of heavy metals from contaminated sediment in batch method coupled with the assistance of heterotrophic microorganisms. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, p. 457, 2016.
- GU, X. Y.; WONG, J. W. C. Identification of inhibitory substances affecting bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 2934–2939, 2004.
- GU, X. Y.; WONG, J. W. C. Degradation of inhibitory substances by heterotrophic microorganisms during bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. **Chemosphere**, v. 69, p. 311–318, 2007.
- HUO, M.; ZHENG, G.; ZHOU, L. Enhancement of the dewaterability of sludge during bioleaching mainly controlled by microbial quantity change and the decrease of slime extracellular polymeric substances content. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 190–197, 2014.
- JUDD, S. The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors, in water and wastewater treatment. **Elsevier**, 2006.
- KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, GT; SASAKI, A .; TAKEYAMA, Y.; IDEMOTO, Y .; KOURA, N .; YANAGISHITA H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1709–1714, 2001.
- KURADE, M. B.; MURUGESAN, K.; SELVAM, A.; YU, S-M.; WONG. J. W. C. Sludge conditioning using biogenic flocculant produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* for enhancement in dewaterability. **Bioresource Technology**, v. 217, p.179–185, 2016.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LIU, H.; YANG, S.; SHI, J.; XU, X.; LIU, H.; FUA, B. Towards understanding the dewatering mechanism of sewage sludge improved by bioleaching processing. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 53–59, 2016.
- MARCELINO, P. R. F.; PERES, G. F. D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F. C.; ROSA, C. A.; LACERDA, T. M.; DOS SANTOS, J. C.; DA SILVA, S. S. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosichydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops e Products**, v. 129, p. 212–223, 2019.
- MOURA, J. B.; DELFORNO, T. P.; DO PRADO, P. F.; DUARTE, I. C. S. Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panel sinatropical region. **Environmental Microbiology & Microbial Ecology**, v. 368, p. 16, 2021.

- PATHAK, A.; DASTIDAR, M. G.; SREEKRISHNAN, T. R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 2343–2353, 2009.
- VARDANYANA, A.; VYRIDES, I. Acidophilic bioleaching at high dissolved organic compounds: Inhibition and strategies to counteract this. **Minerals Engineering**, v. 143, p. 105943, 2019.
- VILLAR, L. D. Estudo da lixiviação bacteriana de metais presentes em lodo de esgoto sanitário. 2003. 126f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, 2003.
- WANG, S.; ZHENG, G.; ZHOU, L. Heterotrophic microorganism *Rhodotorula mucilaginosa* R30 improves tannery sludge bioleaching through elevating dissolved CO₂ and extracellular polymeric substances levels in bioleach solution as well as scavenging toxic DOM to *Acidithiobacillus* species. **Water Research**, v. 44, p. 5423-5431, 2010.
- WISNIEWSKI, C., GRASMICK, A. Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. **Colloids and Surfaces A**, v. 138, p. 403–411, 1998.
- WONG, J. W. C.; MURUGESAN, K.; YU, S. M.; KURADE, M. B.; SELVAN, A. Improved dewatering of CEPT sludge by biogenic flocculant from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Water Science and Technology**, v. 73, p. 843-848, 2016.
- YANG, W.; ZENG, L.; ZHANG, W.; YANG, Q.; WANG, T.; XIONG, H. The influence of different sludge concentrations on its dewaterability during bioleaching. **Water Science & Technology**, v. 81, p. 2585-2598, 2020.
- ZHENG, G.; ZHOU, L.; WANG, S. An acid-tolerant heterotrophic microorganism role in improving tannery sludge bioleaching conducted in successive multibatch reaction system. **Environmental Science Technology**, v. 43, p. 4151-4156, 2009.
- ZHENG, G., WANG, Z., WANG, D., ZHOU, L. Enhancement of sludge dewaterability by sequential inoculation of filamentous fungus *Mucor circinelloides* ZG-3 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* LX5. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 216-223, 2016.
- ZHOU, J.; ZHENG, G.; WONG, J. W. C.; ZHOU, L. Degradation of inhibitory Substances in sludge by *Galactomyces sp.* Z3 and the role of its extracellular Polymeric substances in improving bioleaching. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 217-223, 2013.
- ZHOU, J.; ZHENG, G.; ZHANG, X.; ZHOU, L. Influences of Extracellular Polymeric Substances on the Dewaterability of Sewage Sludge during Bioleaching. **PLoS ONE**, v. 9, p. 102688, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biolixiviação como estratégia para desaguamento do lodo residual de ETE é promissora considerando aspectos de economia e meio ambiente. No entanto, foi identificada uma forte influência de EPS, principalmente relacionada a concentração de proteínas na fração ligada, que devido à sua alta hidrofiliabilidade afeta negativamente o desaguamento. Neste trabalho foi avaliado o desaguamento de lodo de ETE em ensaios com bactéria do gênero *Acidithiobacillus* (*A. thiooxidans*) e levedura produtora de biosurfactante (*R. mucilaginosa*). Foram comparadas diferentes concentrações de inóculo, o desempenho dos seus sobrenadantes, livre de células de cultivo, com seus respectivos inóculos, bem como o desempenho do sobrenadante da levedura com surfactantes sintéticos comerciais. Por fim, foram avaliados os microrganismos, levedura e bactéria em ensaio de coinoculação. Os ensaios com melhores resultados de desaguamento foram replicados com lodo de outra ETE a fim de identificar a aplicabilidade dos tratamentos em diferentes tipos de lodo.

As três diferentes concentrações de inóculo de *A. thiooxidans* (5, 10 e 15%) indicaram melhoria do desaguamento do lodo com o aumento da concentração de inóculo, houve redução da concentração de proteínas em EPS, em especial na fração ligada. Já nos tratamentos com os inóculos da levedura *R. mucilaginosa*, os melhores resultados de desaguamento foram obtidos com a menor concentração de inóculo (5%), e embora tenha ocorrido aumento nas concentrações de carboidratos e proteínas totais em EPS, não houve crescimento significativo na concentração de proteínas ligadas, fator que pode estar positivamente relacionado aos resultados obtidos de desaguamento com a levedura individualmente.

Os sobrenadantes da bactéria *A. thiooxidans* e da levedura *R. mucilaginosa* promoveram melhoria de desaguamento do lodo. No entanto, com o tratamento do lodo com o sobrenadante da *R. mucilaginosa*, a maior parcela da concentração de proteínas, encontra-se na fração solúvel de EPS (92,5% das proteínas totais), enquanto no tratamento do lodo com o sobrenadante da *A. thiooxidans* foi de 54,8%, demonstrando que entre os dois tratamentos, o sobrenadante da *R. mucilaginosa* teve uma conversão mais eficiente de proteínas da fração ligada para a fração solúvel do lodo, inclusive inferior ao lodo controle. Os sobrenadantes foram avaliados no segundo lodo coletado, mas em ensaios com menor duração (3 horas), nos quais foi identificada a possibilidade de desaguamento em tempo de tratamento inferior a 96 horas.

O melhor resultado de redução de TTF e SRF em relação ao lodo controle foi obtido com a coinoculação da bactéria acidófila *A. thiooxidans* (15%) com a levedura produtora de biosurfactante *R. mucilaginosa* (5%), atingindo TTF de $14 \pm 2,4$ segundos, aproximadamente

98,7% menor que o lodo controle ($17,9 \pm 0,6$ min). A redução do TTF foi significativa (p -valor $< 0,05$) a partir de 72h de tratamento, atingindo no final do processo um pH de 2,7. Os resultados permitiram concluir que a coinoculação foi benéfica para os microrganismos, pois potencializou o desaguamento do lodo devido maior atividade das bactérias acidófilas e leveduras consorciadas. Análise estatística de Correlação de Kendall, aplicada aos resultados de desaguamento via coinoculação, demonstrou que a concentração de proteínas na fração ligada no EPS possui a maior magnitude de correlação positiva com o TTF ($\tau = 0,469$) entre as variáveis analisadas reforçando a hipótese de que a redução das proteínas ligadas em EPS favorece o processo de desaguamento.

O ensaio de coinoculação foi ainda replicado com lodo da segunda ETE demonstrando sua aplicabilidade em outros tipos de lodo. Com o lodo da segunda ETE, os sobrenadantes da *A. thiooxidans* e *R. mucilaginosa* foram avaliados combinados na concentração de 15% de cada sobrenadante e apresentam resultados significativos de desaguamento, com redução do TTF em 90,0% em relação ao lodo controle. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn demonstraram que não houve diferença significativa entre os TTF da coinoculação e sobrenadantes combinados. Portanto, conclui-se que embora a coinoculação e os sobrenadantes combinados apresentem desempenho de desaguamento semelhantes, o uso dos sobrenadantes pode ser vantajoso ao permitir o reaproveitamento da biomassa como inóculo para produção de mais sobrenadante, bem como pelo seu potencial de promoção do desaguamento em um menor tempo de tratamento.

APÊNDICE A

Tabela A1. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com a bactéria acidófila *A. thiooxidans*

	Controle	<i>A. thiooxidans</i> 5%	<i>A. thiooxidans</i> 10%	<i>A. thiooxidans</i> 15%
CONTROLE	1	0,308	0,042	0,002
<i>A. thiooxidans</i> 5%	0,308	1	0,308	0,042
<i>A. thiooxidans</i> 10%	0,042	0,308	1	0,308
<i>A. thiooxidans</i> 15%	0,002	0,042	0,308	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0083

Tabela A2. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com a levedura *R. mucilaginosa*

	Controle	<i>R. mucilaginosa</i> 5%	<i>R. mucilaginosa</i> 10%	<i>R. mucilaginosa</i> 15%
Controle	1	0,002	0,042	0,308
<i>R. mucilaginosa</i> 5%	0,002	1	0,308	0,042
<i>R. mucilaginosa</i> 10%	0,042	0,308	1	0,308
<i>R. mucilaginosa</i> 15%	0,308	0,042	0,308	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0083

Tabela A3. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com os surfactantes sintéticos SDS e CTAB

	Controle	CTAB	SDS
Controle	1	0,180	0,180
CTAB	0,180	1	0,007
SDS	0,180	0,007	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0167

Tabela A4. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com os sobrenadantes da bactéria *A. thiooxidans* e da levedura *R. mucilaginosa*

	Controle	Sobrenadante <i>A. thiooxidans</i>	Sobrenadante <i>R. mucilaginosa</i>
Controle	1	0,011	0,007
Sobrenadante <i>A. thiooxidans</i>	0,011	1	0,180
Sobrenadante <i>R. mucilaginosa</i>	0,007	0,180	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0167

Tabela A5. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa*

	0h	24h	48h	72h	96h	Controle Final	Controle Inicial
0h	1	0,843	0,262	0,025	0,005	0,843	0,429
24h	0,843	1	0,356	0,041	0,008	1,000	0,553
48h	0,262	0,356	1	0,262	0,086	0,356	0,742
72h	0,025	0,041	0,262	1	0,553	0,041	0,147
96h	0,005	0,008	0,086	0,553	1	0,008	0,041
Controle Final	0,843	1,000	0,356	0,041	0,008	1	0,553
Controle Inicial	0,429	0,553	0,742	0,147	0,041	0,553	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0024

Tabela A6. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com o sobrenadante da levedura *R. mucilaginosa*

	0h	1h	2h	3h	Controle Final	Controle Inicial
0h	1	0,108	0,022	0,003	0,359	0,819
1h	0,108	1	0,491	0,169	0,491	0,066
2h	0,022	0,491	1	0,491	0,169	0,012
3h	0,003	0,169	0,491	1	0,039	0,001
Controle Final	0,359	0,491	0,169	0,039	1	0,251
Controle Inicial	0,819	0,066	0,012	0,001	0,251	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0033

Tabela A7. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com o sobrenadante da bactéria *A. thiooxidans*

	0h	1h	2h	3h	Controle Final	Controle Inicial
0h	1	0,284	0,194	0,320	0,491	0,126
1h	0,284	1	0,819	0,939	0,079	0,009
2h	0,194	0,819	1	0,760	0,047	0,005
3h	0,320	0,939	0,760	1	0,092	0,012
Controle Final	0,491	0,079	0,047	0,092	1	0,400
Controle Inicial	0,126	0,009	0,005	0,012	0,400	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0033

Tabela A8. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com o ácido sulfúrico

	0h	1h	2h	3h	Controle Final	Controle Inicial
0h	1	0,419	0,090	0,036	0,718	0,258
1h	0,419	1	0,374	0,196	0,278	0,052
2h	0,090	0,374	1	0,686	0,060	0,005
3h	0,036	0,196	0,686	1	0,025	0,001
Controle Final	0,718	0,278	0,060	0,025	1	0,515
Controle Inicial	0,258	0,052	0,005	0,001	0,515	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0033

Tabela A9. *P* – valores do teste de significância (Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%) entre os resultados de TTF no tratamento de desaguamento com a coinoculação da bactéria *A. thiooxidans* e levedura *R. mucilaginosa* e seus sobrenadantes combinados

	Coinoculação	Controle	Sobrenadantes Combinados
Coinoculação	1	0,007	0,180
Controle	0,007	1	0,180
Sobrenadantes Combinados	0,180	0,180	1

Bonferroni corrected significance level: 0,0167